



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

อิทธิพลของคอลลาเจนต่อการแสดงออกของเอนไซม์

MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ไลน์ที่เตรียมจาก

มะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา

โดย

นیرชา สารชวณะกิจ

ประสิทธิ์ ภาวสันต์

อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

616.0277
ว713๒

กันยายน ๒๕๔๖

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

อิทธิพลของคอลลาเจนต่อการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9
ในเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็ง สแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา

Influence of collagen on the expression of MMP-2 and MMP-9
in squamous carcinoma cell lines

โดย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นันทิชา สารชวณะกิจ ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และ อาทิพันธ์ุ พิมพ์ขาวทำ

กันยายน 2546

ร ๒16๐๓45๓

17 ส.ค. 2548

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อเนื้องอกจากผู้ป่วย รวมทั้งขอขอบคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ โดยเฉพาะขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ทัศนแพทย์หญิง ดร.วันดี อภินทสมิต หัวหน้าภาควิชา ที่ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณ คุณสุชาติ กาลวสุกุล และคุณสังคม พิมล นักวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างมากในการตัด section ของเซลล์ และท้ายที่สุดขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย อิทธิพลของคอลลาเจนต่อการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ใน
เซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็ง สแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา

ผู้วิจัย นิรชา สารชวณะกิจ ประสิทธิ์ ภวสันต์ และ อาทิตพันธ์ พิมพ์ขาว

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2546



บทคัดย่อ

มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์เป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยมากในบริเวณช่องปากและใบหน้า และมีอัตราการแพร่กระจายที่สูง ดังนั้นการเข้าใจธรรมชาติของมะเร็งชนิดนี้มากขึ้นน่าจะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำนายการดำเนินไปของโรครวมทั้งแนวทางในการรักษาต่อไป วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ในกลุ่มเจลาติเนส (MMP-2 และ MMP-9) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการแทรกซึมและแพร่กระจายของมะเร็งโดยทั่วไป โดยใช้เซลล์ไลน์ที่เตรียมได้จากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ (HSCs; HSC-3, 6 และ 7) ทดสอบกับโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ คือคอลลาเจน และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคือ ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ (HGF) รวมทั้งศึกษาถึงอิทธิพลของคอลลาเจนที่มีต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ HSCs ผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่มีโครงสร้างสามมิติ (เจล) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ใน HSC-3, 6 และ 7 ได้ดีกว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 ทราย ในขณะที่คอลลาเจนชนิดที่ IV ทรายไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 นอกจากนี้คอลลาเจนทุกชนิดและรูปแบบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่ทำให้เกิดแอคทีฟ MMP-9 ผลการทดลองยังแสดงว่าระดับของแอคทีฟ MMP-2 ที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเอนไซม์ MT1-MMP อีกด้วย นอกจากนี้รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์บนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่มีโครงสร้างสามมิติ (เจล) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนโดย HSC-3 จะแผ่กระจายไปทั่วพื้นผิวคอลลาเจน ในขณะที่ HSC-6 และ HSC-7 จะรวมตัวอยู่เป็นกลุ่มๆ สำหรับการเลี้ยงเซลล์ HGF ร่วมกับเซลล์ HSC-3 หรือ HSC-7 โดยให้มีการสัมผัสกันระหว่างเซลล์ พบว่าทำให้เกิดแอคทีฟ MMP-2 ในขณะที่การเลี้ยงร่วมกับ HSC-6 ส่งผลให้มีการหลั่งเอนไซม์ MMP-9 เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าทั้งคอลลาเจนและ HGF มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ใน HSCs สำหรับอิทธิพลของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ IV ต่อการเคลื่อนที่นั้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ไลน์พบว่า จำนวนเซลล์ของ HSC-3 ที่เคลื่อนที่ผ่านคอลลาเจนทั้งสองชนิดมีมากกว่า HSC-6 และ HSC-7 ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาในด้านรูปร่าง การเรียงตัว และความสามารถในการเคลื่อนที่ผ่านคอลลาเจนทั้งสองชนิด ชี้ให้เห็นในเบื้องต้นว่า HSC-3 มีพฤติกรรมที่แสดงออกถึงความรุนแรง และอยู่ในระยะของดีฟเฟอเรนซ์เอชซีที่ต่ำกว่า HSC-6 และ HSC-7 ตามลำดับ ทั้งนี้สอดคล้องกับระดับของแอคทีฟ MMP-2 ที่เซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการแพร่กระจายต่อไป

Project Title : Influence of collagen on the expression of MMP-2 and MMP-9 in squamous carcinoma cell lines

Name of Investigators : Neeracha Sanchavanakit, Prasit Pavasant and Artiphan Pimkhaokham

Year : September 2003

Abstract

Squamous cell carcinoma is the most found tumor of the oro-facial area with high incidence of metastasis. More understanding in the nature of this tumor could provide the useful information for predicting outcome and proper treatment. The purpose of this study was to investigate the expression of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), which were implicated in the invasion and metastasis of cancer, in human squamous carcinoma cell lines (HSCs; HSC-3, 6 and 7) by stimulating with various types and forms of collagen and co-culturing with human gingival fibroblasts (HGFs). In addition, the influence of collagen on cell migration was also observed. The result revealed that the activation of MMP-2 was induced by 3-dimensional type I better than dry type I collagen in all cell lines, but could not be induced by dry type IV collagen. Any collagen could induce the activation of MMP-9. Moreover, those levels of active MMP-2 well correlated with the levels of MT1-MMP mRNA. Morphology and arrangement among HSCs when cultured on 3-dimensional type I collagen showed remarkably differences. HSC-3 arranged in monolayer and covered the whole surface of collagen gel, whereas HSC-6 and HSC-7 arranged in cord-like and clumps of multiple cell layers, respectively. Co-culture of HGF and HSC-3 or HSC-7 by having cell-cell contact activated MMP-2, but not MMP-9, whereas that of HSC-6 resulted in increasing the secretion of MMP-9. These results confirmed the influences of collagen and HGF on the activation of MMP-2 in HSCs. For the migration assay, HSC-3 showed the highest migration ability through type I and IV collagen by cell number to those of HSC-6 and HSC-7, respectively. Taken together, the results of cell morphology and arrangement on 3-dimensional type I collagen including the migration ability suggested that HSC-3 performed the highest invasive phenotype and the poorest differentiation stage compared to HSC-6 and HSC-7, respectively. These behaviors correlated with the ability to activate MMP-2, which could possibly drive cells into the metastatic process.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการทดลอง	16
วิเคราะห์ผลการทดลอง	27
สรุป	40
เอกสารอ้างอิง	41



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพจากเจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSCs ในสภาวะที่เซลล์ไม่ได้รับการกระตุ้น	50
รูปที่ 2 ภาพจากเจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSCs เมื่อเลี้ยงเซลล์บนคอลลาเจน	52
รูปที่ 3 ภาพ PCR product ของ MT1-MMP และ GAPDH ในเซลล์ HSCs ในสภาวะปกติและเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคอลลาเจน	54
รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องเฟสคอนทราสต์แสดงการเรียงตัวของเซลล์บนคอลลาเจน	56
รูปที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องเฟสคอนทราสต์แสดงรูปร่างของเซลล์บนคอลลาเจน	58
รูปที่ 6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการเรียงตัวของเซลล์จาก section ของเซลล์ HSCs เมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนเจล	60
รูปที่ 7 ภาพจากเจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยง HSCs ร่วมกับ HGF ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม	62
รูปที่ 8 ภาพจากเจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยง HSCs ร่วมกับ HGF ใน Transwell	64
รูปที่ 9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ HSCs ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติก	66
รูปที่ 10 กราฟแสดงจำนวนเท่าของเซลล์ HSCs ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV	68
รูปที่ 11 กราฟแสดงจำนวนเท่าของเซลล์ HSCs ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนเนตที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจนใน 48-well microchemotaxis chamber	70
รูปที่ 12 กราฟแสดงจำนวนเท่าของเซลล์ HSCs ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนเนตที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ใน 48-well microchemotaxis chamber	72



บทนำ

มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ (Squamous cell carcinoma) เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 1 ในประชากรไทย มะเร็งชนิดนี้เป็นมะเร็งที่มีการพยากรณ์โรคไม่ดี (poor prognosis) เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแทรกตัวไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ดี รวมทั้งมีอุบัติการณ์ของการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะที่อยู่ห่างออกไปสูง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงด้วย (Zbaren and Lehmann, 1987; Vokes et al., 1993; Sliotweg et al., 1996)

ความสามารถในการแทรกตัวและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จะสัมพันธ์กับปัจจัยหลักสองประการคือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ (migration) และความสามารถในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (proteolysis) เพื่อเปิดทางสำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Price et al., 1997)

ในกรณีการเคลื่อนที่ของเซลล์พบได้ทั่วร่างกายในสภาวะปกติ เช่น การเคลื่อนตัวของเซลล์ fibroblasts หรือ epithelium เข้ามายังบริเวณที่มีบาดแผล เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย หรือการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว เข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบ เป็นต้น (Mignatti and Rifkin, 1993) การเคลื่อนที่นี้มักเกิดจากการเหนี่ยวนำของ growth factors, cytokines และโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix หรือ ECM) ซึ่งการเหนี่ยวนำโดยสารเหล่านี้ จะมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อสารเหล่านี้ จะต่างจากเซลล์ปกติ โดยเซลล์มะเร็งจะตอบสนองในลักษณะที่ไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของร่างกาย (MacDonald and Steeg, 1993; Jiang et al., 1994)

ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ กับความสามารถในการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง โดยทำการศึกษาในเซลล์ไลน์ (cell lines) ของมะเร็งหลายชนิด พบว่าโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น vitronectin , fibronectin, laminin , type I collagen , type IV collagen ทั้งในสภาพสมบูรณ์ (intact) และในสภาวะที่ถูกตัดย่อย (degradation) ด้วย proteolytic enzymes ที่สร้างขึ้นโดยเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ปกติที่อยู่โดยรอบ สามารถเหนี่ยวนำการ

เคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง และเป็นผลให้ระดับของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกายเพิ่มสูงขึ้น (Basara et al., 1985; Aznavoorian et al., 1990; Aresu et al., 1991; Faassen et al., 1992) ซึ่งจะเห็นได้ว่ากลไกการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ดังกล่าวนี้ ส่วนหนึ่งสัมพันธ์กับการสร้างและหลัง proteolytic enzymes (Price et al., 1997)

ในส่วนของความสามารถในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนั้น proteolytic enzymes ที่มีบทบาทอย่างมากในการย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ คือเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) (Sternlicht and Werb, 2001) โดยเอนไซม์ในกลุ่มย่อย gelatinases ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 มีบทบาทอย่างมากในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิด (Rao et al., 1993; Tryggvason et al., 1993; Itoh et al., 1998; Kupferman et al., 2000) ทั้งนี้เนื่องด้วยความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ basement membrane และการทำลาย basement membrane นั้น นับเป็นขั้นตอนแรกสุดในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Chambers and Matrisian, 1997)

เอนไซม์ในกลุ่ม MMPs นี้ จะถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่ยังไม่พร้อมทำงาน หรือเรียกว่ารูปเลเทนต์ (latent form) ในสภาวะปกติ และต้องการการกระตุ้นโดยการตัดโดเมน (domain) ส่วนโปรเปปไทด์ (pro-peptide) ออก รวมทั้งต้องการอะตอมของสังกะสี (zinc atom) ที่ตำแหน่งแคทาลิติก โดเมน (catalytic domain) เพื่อให้อยู่ในรูปแอคทีฟ (active form) จึงจะสามารถทำงานได้ และในกระบวนการกระตุ้นการทำงานนี้ อาจจะมีเอนไซม์ในรูป อินเตอร์มีเดียต (intermediate form) ซึ่งมีการตัดโปรเปปไทด์ไปแล้วบางส่วน (Nelson et al., 2000)

ในมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอ (head and neck squamous cell carcinoma) แม้จะมีรายงานที่แสดงถึงความสำคัญของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง แต่จำนวนของการศึกษาในเรื่องนี้ยังมีอยู่น้อย และยังไม่มีความชัดเจนนัก การศึกษาในชิ้นเนื้อมะเร็งที่ตัดได้จากผู้ป่วย พบการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 และ MMP-9 ทั้งในระดับของ

mRNA โปรตีน รวมทั้งระดับของ enzymatic activity โดยมีความสัมพันธ์กับระดับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง (Kusukawa et al., 1993; Kawamata et al., 1998; O Charoenrat et al., 2001)

ผลจากการศึกษาโดยใช้ตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อ MMP-2 และ MMP-9 (specific inhibitor; MMI-166) โดยทำการทดสอบในเซลล์ไลน์จากมะเร็งตับอ่อน (Matsushita et al., 2001) และ มะเร็งลำไส้ (Ohta et al., 2001) พบว่าตัวยับยั้งสามารถลดอัตราการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการเจริญ (tumor growth) ของก้อนมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ในสัตว์ทดลองด้วย (Katori et al., 2002) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว สนับสนุนบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองนี้ในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามหากจะเปรียบเทียบบทบาทของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในแง่ของการแพร่กระจายแล้ว ปรากฏมีทั้งรายงานที่แสดงว่า MMP-9 มีบทบาทในแพร่กระจายและการรุกรานของเซลล์มะเร็งมากกว่า MMP-2 (O Charoenrat et al., 1999; Hong et al., 2000; O Charoenrat et al., 2000a; O Charoenrat et al., 2000b) และที่พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีบทบาทใกล้เคียงกัน (Charous et al., 1997) รวมทั้งที่พบว่า MMP-2 มีบทบาทมากกว่า MMP-9 (Kusukawa et al., 1993; Kawamata et al., 1998) ดังนั้นจึงยังไม่ชัดเจนว่าเอนไซม์ MMP-2 หรือ MMP-9 จะมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดนี้มากกว่ากัน เอนไซม์ MMP-2 ยังมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเอนไซม์ MMP อื่นๆ คือมีกลไกที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานที่แตกต่างออกไป รวมทั้งต่างจาก MMP-9 ด้วย โดย MMP-2 ต้องการเอนไซม์ MT-MMP (membrane-type MMP) ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังนั้นจึงเป็นอีกกรณีที่น่าสนใจว่า จะมีความสัมพันธ์ระหว่าง MT-MMP กับรอยโรคมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ด้วยหรือไม่

อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการอธิบายลักษณะโดยรวมของรอยโรค เนื่องจากศึกษาจากชิ้นเนื้อหึ่งชิ้นจากผู้ป่วยซึ่งประกอบขึ้นจากทั้งเซลล์มะเร็งเองรวมทั้งเซลล์และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยรอบหึ่งที่ปกติและผิดปกติ ทำให้มีตัวแปรเข้ามาเกี่ยวข้องเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาโดยใช้

เซลล์ไลน์จะสามารถจำกัดปัจจัยอันเนื่องมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแวดล้อม จึงมีประโยชน์ในการที่จะเข้าใจถึงธรรมชาติของเซลล์มะเร็งชนิดสควแอมัสเซลล์มากขึ้น

อย่างไรก็ดีแม้จะเลือกใช้เซลล์ไลน์ของมะเร็งในการศึกษา แต่การศึกษาเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (stromal cells หรือ fibroblasts) ร่วมด้วยก็น่าจะเสริมให้เกิดความเข้าใจธรรมชาติของมะเร็งชนิดนี้ในภาวะใกล้เคียงธรรมชาติมากขึ้นในด้านผลที่เกิดขึ้นจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ เนื่องจากพบว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบๆรอยโรคมะเร็งนั้นเป็นเซลล์หลักที่สร้าง MMP-2 ในเนื้อเยื่อมะเร็งหลาย ๆ ชนิด (Poulsom et al., 1992; Pyke et al., 1993; Soini et al., 1993) โดยเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหล่านี้ในสภาวะปกติ จะเป็นเซลล์นิ่ง (quiescent fibroblasts) และสร้าง MMP-2 ในปริมาณที่ต่ำ ต่อเมื่อได้รับการกระตุ้นจากเซลล์มะเร็งที่อยู่ข้างเคียงก็จะตอบสนองโดยการเพิ่มการสร้าง MMP-2 และ MT-MMP มากขึ้น (Guo et al., 1997; Sameshima et al., 2000) มีรายงานแสดงว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสควแอมัสเซลล์ที่ไม่สามารถสร้าง MMP-2 ร่วมกับ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบว่า MMP-2 ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบที่ทำงานได้ (active) ซึ่งแสดงว่าเกิดการชักนำระหว่างเซลล์มะเร็งกับ fibroblasts ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายเนื้อเยื่อ (Sameshima et al., 2000; Tokumar et al., 2000) และมีรายงานพบความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ ในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ด้วย เช่นใน HT1080 และ renal carcinoma (Munaut et al., 1995) โดยในบางรายงานระบุว่า ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้ ไม่จำเป็นต้องมีการสัมผัสกันของเซลล์ (Tokumar et al., 2000) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับกรณีนี้ในมะเร็งชนิดสควแอมัสเซลล์ยังไม่มีความชัดเจน

จากการศึกษาที่ผ่านมาของการแสดงออกของ MMP-2, MMP-9 และ MT-MMP ในหลายๆเซลล์ไลน์ที่ได้จากมะเร็งชนิดสควแอมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอ พบว่าเซลล์เหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยพบได้ตั้งแต่เซลล์ที่สามารถสร้าง MMP-2, MMP-9 และ MT1-MMP ได้เอง (Kusukawa et al., 1993; Yoshizaki et al., 2001; Katori et al., 2002) สร้างได้เฉพาะ MMP-9 จนถึงไม่สามารถสร้าง MMP ได้ (Tokumar et al., 2000) ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์ไลน์ที่ได้ มาจากระยะที่แตกต่างกันของ

มะเร็งชนิดเดียวกันได้ (stages of differentiation) ซึ่งอาจจะย้อนกลับไปถึงความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งก็ได้ ดังนั้นการมีเซลล์ไลน์ที่มี stage of differentiation ต่างๆกันใช้ในการศึกษา จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการเป็นตัวแทนของพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งในแต่ละระยะ

นอกจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ หรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แล้ว ความสามารถในการเคลื่อนที่ (migration) ก็เป็นตัวชี้วัด invasiveness ของเซลล์มะเร็งด้วยเช่นกัน มีรายงานที่แสดงว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ เกี่ยวข้องกับการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 เนื่องจากการใช้ specific MMP-2 และ MMP-9 inhibitor สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HSC-4 (tongue carcinoma cell line) ผ่าน membrane ใน Boyden chamber assay ได้ (Baba et al., 2000) นอกจากนี้เมื่อเห็นว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ไลน์ HSC-4 และ SAS (human oral squamous carcinoma cell lines) จะสามารถเพิ่มอัตราการแทรกตัวของเซลล์เข้าสู่ Matrigel ใน in vitro invasion assay ได้ และการแทรกตัวนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) (Sato et al., 1999) จะเห็นว่าผลการทดลองที่กล่าวถึงนั้น สนับสนุนบทบาทของ MMP-2 ในการเคลื่อนและแทรกตัวของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามการทดลองในเซลล์ไลน์ LICR-HN-5, 6,15 และ อีก 10 เซลล์ไลน์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่โดยคณะของ O-Charoenrat กลับพบว่าความสามารถในการเคลื่อนของเซลล์สัมพันธ์กับระดับการสร้าง MMP-9 โดยไม่เกี่ยวกับ MMP-2 (O Charoenrat et al., 2000b) ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้ จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบบทบาทของ MMP-2 และ MMP-9 ในการเคลื่อนที่ของเซลล์

เมทริกซ์นอกเซลล์เป็นอีกปัจจัยที่มีผลส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ไลน์ที่มีการสร้าง MT1-MMP (Azzam et al., 1993; Maquoi et al., 2000) และใน fibroblasts (Ruangpanit et al., 2001) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่าคอลลาเจนชนิดที่ IV สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ Hep-2 (เตรียมได้จากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอ) ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์

fibroblasts (Tokumar et al., 2000) ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นี้ น่าจะส่งผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์ด้วย

จากที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นว่าการศึกษาในเซลล์ไลน์ของมะเร็งนั้น จะสามารถกำหนดหรือควบคุมตัวแปรได้ดี รวมทั้งสามารถตรวจวัดการตอบสนองหรือพฤติกรรมของเซลล์ต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่คล้ายกับที่พบจริงในสภาวะธรรมชาติได้อย่างชัดเจน เช่น อิทธิพลของเมทริกซ์นอกเซลล์ (Aznavorian et al., 1990), Growth factors (Ara et al., 2000) รวมทั้งเป็นประโยชน์ในการศึกษากลไกการเกิดจากการเล่นเซลล์มะเร็งร่วมกับเซลล์ปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วย (Sato et al., 1999; Tokumar et al., 2000) การศึกษาในระดับของเซลล์ไลน์นี้ จะช่วยให้เรามีความเข้าใจถึงบทบาทของ MMP-2 และ 9 ในเคลื่อนที่ และในการแพร่กระจายได้ดีขึ้น และเนื่องจากปริมาณของเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากชิ้นเนื้อมะเร็งยังมีไม่มากนัก รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ MMP ในการเคลื่อนที่ หรือแทรกตัวของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ยังมีไม่มากนักเมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่นๆ ดังนั้นจะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มความเข้าใจในกระบวนการดังกล่าวซึ่งเป็นกระบวนการหลักในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกาย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ (HSCs; human squamous carcinoma cell lines) และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ (HGF; human gingival fibroblasts)

เซลล์ไลน์ HSC-3, 6 และ 7 เตรียมได้จากชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์จากผู้ป่วย และได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Teruo Amagasa, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan สำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ (HGF) เตรียมจากชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วย ที่มาตอนฟันกรามที่สุดท้ายที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฟันที่ถอนนั้นเนื่องจากการจัดฟันหรือเป็นฟันคุดโดยไม่มีอาการอักเสบของฟันหรือเหงือก ชิ้นเนื้อเหงือกที่ติดอยู่กับคอฟันที่ถูกถอนจะถูกตัดออกมาเพาะเลี้ยงตามวิธีที่เคยรายงานไว้แล้ว (Darongsuwan and Pavasant, 1997) และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-5

เซลล์ไลน์ทั้งสามชนิดและเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่ประกอบด้วย 10% ซีรัมจากฟัตัสของวัว (Fetal Bovine Serum), กลูตามีน (L-Glutamine) 2 mM, เพนนิซิลลิน (Penicillin) 100 IU/ml, สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) 100 µg/ml และแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) 0.25 µg/ml โดยอาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดจะได้จาก GibcoBRL (NY, USA) เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% การขยายจำนวนเซลล์จะทำได้โดยการถ่ายเซลล์ (subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:5 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) โดยเซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

การศึกษามลพิษพิษพลของคอลลาเจนต่อการหลั่ง MMP-2 และ MMP-9 และผลต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์ HSCs

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม และเลี้ยงต่อไปอีก 48 ชั่วโมง ในการทดลองจะเป็นการเปรียบเทียบเซลล์ที่เลี้ยงในหลุมที่ไม่ได้เคลือบคอลลาเจน กับหลุมที่เคลือบคอลลาเจน ชนิดที่ I หรือชนิดที่ IV โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของเซลล์ในหลุมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง การติดตามการเปลี่ยนแปลงจะทำโดยใช้กล้อง phase contrast microscope และทำการถ่ายภาพเซลล์เพื่อประกอบการวิเคราะห์

นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงจะถูกนำมาวิเคราะห์หกระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค gelatin zymography

การเคลือบคอลลาเจนในจานเลี้ยงเซลล์จะทำในสองลักษณะคือ

ก. การเคลือบด้วยสารละลายของคอลลาเจนชนิดที่ I และชนิดที่ IV โดยการหดยสารละลายคอลลาเจนความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ลงในแต่ละหลุม และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดส่วนเกินออก แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เชลยอน์ (PBS) ที่ปราศจากเชื้อสองครั้งก่อนที่จะนำไปใช้เลี้ยงเซลล์

ข. การเตรียมคอลลาเจนเจล (3-dimensional collagen gel) ซึ่งทำได้เฉพาะคอลลาเจนชนิดที่ I เท่านั้น

เจลของคอลลาเจนชนิดที่ I ความเข้มข้น 2 mg/ml เตรียมขึ้นจากการผสมสารละลายของคอลลาเจน ((Vitrogen) Cohesion, CA, USA) ความเข้มข้น 3 mg/ml ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.012 M 330 μl กับ สารละลาย 10xPBS 50 μl และน้ำกลั่น 113.27 μl จะได้สารละลายผสมคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg/ml จากนั้นสภาพความเป็นกรดของสารละลายคอลลาเจนถูกปรับให้เป็นกลางด้วย 3.7 μl ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วหยดลงในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในปริมาตรหลุมละ 0.5 ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง

สารละลายผสมคอลลาเจนจะเปลี่ยนสภาพเป็นเจล ล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml หนึ่งครั้งก่อนนำไปใช้เลี้ยงเซลล์

การศึกษาการเรียงตัวของเซลล์บนคอลลาเจนนอกจากจะทำการถ่ายภาพเช่นเดียวกับข้างต้นแล้ว โดยที่คอลลาเจนเจลมีมิติของความหนา ซึ่งอาจทำให้การศึกษาการเรียงตัวทำได้ลำบาก จึงจะทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำคอลลาเจนเจลไปเตรียมเป็น slide section ด้วย

การเตรียมแหล่งของ เลแทนท์ MMP-2 จากภายนอกให้กับเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์

เนื่องจากเซลล์มะเร็ง HSCs มีระดับของการสร้าง MMP-2 ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการศึกษาความสามารถของเซลล์ ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จึงจำเป็นต้องเติม MMP-2 จากภายนอกลงไป แหล่งของ MMP-2 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะได้จากเซลล์ U2OS ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งชนิดออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ (human osteosarcoma cell line) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Kazuhiro Eto และ Associate Professor Dr. Masa-Aki Ikeda, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

วิธีการเตรียมแหล่งของ MMP-2 จากภายนอก จะทำดังนี้คือเซลล์ U2OS จะถูกถ่ายลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm. จำนวน 10 จาน ที่ความหนาแน่น 10,000 เซลล์/cm² เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมอีกครั้งหนึ่งในปริมาตร 3 ml/จาน และเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละจานเลี้ยงเซลล์รวมกันแล้วนำไปแยกส่วนของเศษเซลล์ที่อาจปะปนมาออกด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง แยกส่วนใสออกไปเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และจะเรียกส่วนนี้ว่า U2OS conditioned medium

ปริมาณของ เลแทนท์ MMP-2 ใน U2OS conditioned medium จะถูกตรวจสอบโดยเทคนิคเอลลิตินไซโมกราฟฟี และสัดส่วนของ U2OS conditioned medium ที่นำไปเติมเพื่อเป็นแหล่งภายนอก

ของ MMP-2 สำหรับเซลล์มะเร็งชนิดสควมัสเซลล์ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมปกติ 1 ส่วน ต่อ U2OS conditioned medium 1 ส่วน และจะเรียกส่วนผสมนี้ว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม (50% serum free medium + 50% U2OS-conditioned medium)

การวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค gelatin zymography

อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gelatin zymography (Ruangpanit et al., 2001) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ในเจลที่มีความเข้มข้นของอคริลามายด์ (acrylamide) 10% และเจลาติน (gelatin) ความเข้มข้น 0.1% โดยเจลาตินจะเป็นซับสเตรท (substrate) สำหรับ MMP-2 เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว เจลจะถูกล้างด้วยสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้น 2.5% สามารถรอบ รอบละ 10 นาที ก่อนนำไปบ่มในสารละลาย developing buffer (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Brij35) เป็นเวลา 2 คืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, MO, USA) ความเข้มข้น 0.5% ในสารละลายผสมของเมทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้น 40% และ 10% ตามลำดับ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายผสมของเมทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้น 5% และ 7.5% ตามลำดับ) บริเวณที่มี MMP-2 จะปรากฏเป็นแถบใสบนเจลสีน้ำเงิน ตำแหน่งของเอนไซม์ MMP-2 บนเจลจะตรวจสอบกับระดับของเอนไซม์ MMP-2 ที่หลังจากเซลล์ไลน์ HT-1080 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดไฟโบรซาร์โคมาของมนุษย์ (human fibrosarcoma cell line) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก (positive control) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gelatin zymography เซลล์ไลน์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Associate Professor Erik W. Thompson, St. Vincent's Institute of Medical Research, Melbourne, Australia

การวิเคราะห์ระดับของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของ MT1-MMP ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเตรียมโดยใช้ TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต และนำไปสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription) ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega, WI, USA) และ oligodT primer (Promega, WI, USA) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนในแต่ละรอบดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จากนั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที ตามด้วย annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที โดยการใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของ MT1-MMP และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคุมกันไป เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยกระบวนการ PCR สำหรับ MT1-MMP และ GAPDH คือ 32 และ 30 ตามลำดับ สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MT1-MMP และ GAPDH สามารถตรวจสอบได้จาก GenBank ผ่านทาง website ของ NIH และลำดับของนิวคลีโอไทด์ ของ primers ที่ใช้คือ

MT1-MMP sense 5' GTCATCATCGGGCAGCAC 3'

antisense 5' CATCGCTGCCATGCAGAAGT 3'

GAPDH sense 5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'

antisense 5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 2%

การเตรียม section ของเซลล์บนคอลลาเจนเจล

เซลล์ถูกถ่ายลงบนคอลลาเจนเจลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรึงด้วยด้วย 4% formaldehyde เป็นเวลา 30 นาที หลังจากล้างด้วย PBS แล้ว เซลล์พร้อมทั้งคอลลาเจนเจล จะถูกยกออกจากจานเลี้ยง เพื่อนำไปผ่านกระบวนการฝังในพาราฟิน เพื่อตัด section ตามแนวขวางหนาประมาณ 5 μm และย้อมด้วย Hematoxylin-Eosin เพื่อนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

การเลี้ยงเซลล์ร่วมกันระหว่างเซลล์ HSCs กับ HGF ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยเลี้ยงเซลล์ HSCs แต่ละไลน์กับ HGF ในหลุมเดียวกัน โดยในแต่ละหลุมมี 50,000 เซลล์ ซึ่งสัดส่วนของ เซลล์ HSC ต่อ HGF คือ 1:1 (25,000 เซลล์ : 25,000 เซลล์) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ไม่มีซีรัม แล้วเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค gelatin zymography

การเลี้ยงเซลล์ร่วมกันระหว่างเซลล์ HSCs กับ HGF โดยใช้ Transwell

Transwell (Nunc, IL, USA) ที่มีลักษณะเป็นหลุมที่สามารถถอดเข้าออกได้ (removable well) และสามารถสวมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยมีส่วนของขาเล็กๆ 3 จุดที่สัมผัสกับก้นหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ทำให้ก้นหลุมของ Transwell มีระยะห่างและไม่สัมผัสกับก้นหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ก้นหลุมของ Transwell เป็นแผ่นเมมเบรน ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.02 μm ซึ่งเป็นขนาดมาตรฐานที่เล็กพอที่เซลล์ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถลอดผ่านได้ แต่สารหลังต่างๆจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์สามารถผ่านเข้าออกได้

เซลล์ HSCs ถูกถ่ายลงใน Transwell จำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลุม ซึ่งเป็นจำนวนที่ทำให้เซลล์แน่นเต็ม Transwell ที่สวมอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่ไม่มีเซลล์ ในขณะที่เดียวกัน เซลล์ HGF ถูก

ถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 30,000 เซลล์ต่อหลุม อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม ถูกเติมให้กับเซลล์ในการเลี้ยงทั้งสองลักษณะเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น ชนิดที่ไม่มีซีรัมปริมาตร 150 μ l ให้กับเซลล์ HSCs และ HGF แล้วย้าย Transwell จากจานเลี้ยงเซลล์ แบบ 24 หลุมที่ไม่มีเซลล์อยู่ที่ก้นหลุม ไปสวมอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่มีเซลล์ HGF อยู่ แล้ว เลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วย เทคนิค gelatin zymography

การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์

จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมถูกเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ที่ความเข้มข้น 40 μ g/ml ปริมาตร 100 μ l เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายคอลลาเจนออก แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งก่อนนำมาใช้

เซลล์ HSC ถูกทำให้หลุดออกจากจานเลี้ยงเซลล์เดิมด้วย สารละลาย 0.2mg/ml EDTA ใน PBS จากนั้นย้ายเซลล์มาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ไม่มีซีรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ receptor บนผิวเซลล์กลับคืนสู่สภาพปกติพร้อมที่จะใช้ในการยึดเกาะ จากนั้นทำการถ่ายเซลล์จำนวน 200,000 เซลล์ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยคอลลาเจน และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้เลี้ยงเซลล์ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วตรึงเซลล์ด้วย 4% formaldehyde เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมเซลล์เพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ ด้วยสี methylene blue โดยคำนวณหาจำนวนเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 667 nm. โดยเทียบกับ standard curve ของจำนวนเซลล์ การทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง จะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์

การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้ 48-well microchemotaxis chamber assay (Neuroprobe, Cabin John, MD, USA) ซึ่งมีลักษณะเป็น multi well culture chamber โดยแต่ละ chamber จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนด้วยแผ่นโพลีคาร์บอเนตที่ปราศจากโพลีไวนิล ไพโรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone-free polycarbonate filter) ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 μm กั้นอยู่ตรงกลาง ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์พิจารณาจากจำนวนเซลล์ใน upper chamber ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตไปสู่อีกด้านของแผ่นในฝั่งของ lower chamber

วิธีการศึกษา จะแบ่งออกเป็นสองส่วน ในส่วนแรกจะใช้แผ่นโพลีคาร์บอเนตธรรมดาที่กั้นระหว่าง upper และ lower chamber เซลล์ถูกทำให้หลุดจากจานเลี้ยงเซลล์เดิมด้วยสารละลาย 0.2 mg/ml EDTA ใน PBS และถูกพักอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ไม่มีซีรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ก่อน เพื่อให้ receptor บนผิวเซลล์กลับคืนสู่สภาพปกติพร้อมที่จะใช้ในการยึดเกาะ จากนั้นถ่ายเซลล์ที่ความหนาแน่น 1,000,000 เซลล์/ml ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DME ที่ไม่มีซีรัม แต่มี bovine serum albumin (BSA) 0.1% ปริมาตร 56 μl ลงใน upper chamber แล้วเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงแยกเอาแผ่นโพลีคาร์บอเนตมาตรึง (fix) ด้วย 4% formaldehyde เป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้อมด้วย Hematoxylin จากนั้นยัด (mount) แผ่นโพลีคาร์บอเนตด้านที่หันเข้าหา lower chamber ที่มีเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตออกมาไว้บนแผ่นสไลด์กระจก (glass slide) ส่วนเซลล์ที่ไม่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตที่อยู่ด้านตรงข้ามจะถูกขีดออกด้วยสำลี บริเวณอย่างน้อย 4 บริเวณในแต่ละหลุมถูกสุ่มเพื่อใช้นับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุเท่ากับ 20X ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

ในส่วนที่สอง แผ่นโพลีคาร์บอเนตจะถูกแช่ในสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ I หรือ ชนิดที่ IV ที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ บน orbital shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หึ่งให้แห้ง ก่อนที่จะนำไป

ประกอบกับ apparatus แล้วทำการทดลองเหมือนข้างต้น เพื่อศึกษาอิทธิพลของคอลลาเจนชนิดที่ I และ ชนิดที่ IV ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนเนต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

ความสามารถของเซลล์ที่แตกต่างกันในการสร้างเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในจานเลี้ยงเซลล์

ปริมาณและสภาวะของ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ไลน์ HSC-3, 6 และ 7 ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ถูกนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค gelatin zymography ดังปรากฏในรูปที่ 1A โดยวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่ไม่มีซีรัม

ผลการทดลองพบว่าเซลล์ทั้งสามชนิด มีความสามารถในการสร้าง MMP-2 และ MMP-9 แตกต่างกัน โดยใน HSC-3 พบมี MMP-2 ทั้งในรูปเลเทนท์ (72 kD) และ อินเตอร์มีเดียด (68 kD) ในขณะที่ใน HSC-6 จะพบเฉพาะ MMP-2 ในรูปเลเทนท์ (72 kD) ในระดับที่น้อย และเกือบไม่พบเลยในเซลล์ HSC-7 และเนื่องจากระดับเอนไซม์ที่ค่อนข้างต่ำ จึงต้องใช้เวลาบ่มเจล เพื่อให้เกิดการย่อย gelatin ในเจลเป็นเวลา 2 คืน เมื่อเทียบกับการบ่มเพียง 1 คืน เมื่อศึกษาเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั่วๆไป

HSC-3 และ HSC-6 ยังพบการหลั่ง MMP-9 ด้วย แต่ไม่พบใน HSC-7 และจะพบเฉพาะเลเทนท์เอนไซม์ (92 kD) เท่านั้น โดยระดับของเอนไซม์ที่พบใน HSC-6 มีมากกว่าใน HSC-3

เนื่องจากระดับของเอนไซม์จาก HSC ค่อนข้างต่ำ ในการทดลองต่อไป คณะผู้วิจัยได้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ U2OS (U2OS conditioned medium) ซึ่งมีระดับเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงพอสมควร ใช้เป็นแหล่งของเลเทนท์ MMP-2 และ MMP-9 ภายนอกที่เติมให้กับ HSC โดยที่เซลล์ไม่ต้องสร้างเอง เพื่อจะดูความสามารถศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ได้ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมในปริมาณครึ่งหนึ่ง (50% serum free medium + 50% U2OS-conditioned medium) และเรียกอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม

รูปที่ 1B วิเคราะห์โดยเทคนิค gelatin zymography แสดงระดับของ MMP-2 และ 9 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม ภายหลังจากนำมาบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีเซลล์เป็นเวลา 48

ชั่วโมง เพื่อแสดงระดับของเอนไซม์ทั้งสองที่ 48 ชั่วโมงของการทดลอง เพื่อใช้เป็นระดับเอนไซม์อ้างอิง
เปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง

อิทธิพลของคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ต่อการหลังและการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงาน
ของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ใน HSC-3, 6 และ 7

รูปที่ 2 แสดงอิทธิพลของคอลลาเจนที่มีต่อเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ HSC-3, 6
และ 7 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์โดยเทคนิค gelatin zymography
ในแถวซ้ายของรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ระดับการหลังเอนไซม์ในรูปแบบเลเทินท์ของทั้ง MMP-2 และ MMP-9
ในเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ระหว่างสภาวะที่เลี้ยงบนจานที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิด
ที่ I ทราย (I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (IV dry) เทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์
พลาสติก (-) แต่เซลล์ที่เลี้ยงบนจานที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) จะพบมีการเพิ่มขึ้นของ
เอนไซม์ MMP-2 (72 kD) อย่างชัดเจนในเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิด รวมทั้งพบมีเอนไซม์ MMP-2 ในรูปอินเตอร์
มีเดียด (68 kD) และ แอคทีฟ (59 kD) ด้วย นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ MMP-9 ในรูปแอคทีฟ (82 kD) ใน
HSC-3 อย่างชัดเจน (ผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ได้นำเสนอ
เนื่องจากระดับของเอนไซม์ต่ำมาก เห็นได้ไม่ชัดเจน)

อิทธิพลของคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ
เอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ใน HSC-3, 6 และ 7 เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์ MMP-2
และ MMP-9

ในรูปที่ 2 แถวขวา แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ที่เลี้ยงใน
อาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสม เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงว่า คอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I
gel) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ชัดเจน โดยพบแถบสว่าง
ของ แอคทีฟ MMP-2 ที่ตำแหน่ง 59 kD ในเซลล์ HSC-3 และ 7 แต่ไม่ปรากฏผลชัดเจนใน HSC-6

ส่วนคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย (I dry) เหนียวนำไปเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ใน HSC-3 และ 7 เช่นกัน แต่พบในระดับที่ต่ำกว่าการเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) และไม่พบมีการเหนียวนำไปใน HSC-6 นอกจากนี้ ผลการทดลองแสดงว่าคอลลาเจนชนิดที่ I ทั้งสองแบบ ไม่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9

ในขณะเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (IV dry) ไม่สามารถเหนียวนำไปเกิดการกระตุ้นการทำงานของทั้งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในทุกเซลล์ไลน์ โดยให้ผลไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (ผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ได้นำเสนอเนื่องจากระดับของ แอคทีฟเอนไซม์ต่ำมาก เห็นได้ไม่ชัดเจน)

อิทธิพลของคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ต่อระดับของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเอนไซม์ MT1-MMP ใน HSC-3, 6 และ 7

เพื่อตรวจสอบว่า การเกิดแอคทีฟ MMP-2 จะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ MT1-MMP ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ถูกเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่ไม่มีซีรัม ในสภาวะที่เคลือบ หรือไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน และทำการสกัด RNA จากเซลล์ เพื่อตรวจหาระดับของการแสดงออกของ MT1-MMP mRNA โดยเทคนิค RT-PCR

ในรูปที่ 3A แสดงระดับการแสดงออกตามปกติของ MT1-MMP ในเซลล์ทั้งสามไลน์ ผลการตรวจสอบพบการแสดงออกของ MT1-MMP ใน HSC-3 มากกว่า HSC-7 อย่างชัดเจน ในขณะที่ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกใน HSC-6 ได้ ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ GAPDH

ส่วนในรูปที่ 3B พบว่า ระดับการแสดงออกของ MT1-MMP ในเซลล์ไลน์เหล่านี้ มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ต่างกัน โดยเปรียบเทียบต่อระดับ mRNA ของเอนไซม์ GAPDH ที่เท่ากัน ดังนี้

ใน HSC-3 พบมีการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP mRNA เฉพาะเมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย (I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (IV dry) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำการเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติกที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน (-)

ในขณะที่ HSC-6 ซึ่งปกติไม่พบมีการแสดงออกของเอนไซม์ ก็พบมีการแสดงออกอย่างชัดเจนของ MT1-MMP mRNA เมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใดเมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย (I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (IV dry)

สำหรับใน HSC-7 ก็พบมีการแสดงออกของ MT1-MMP mRNA เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำการเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน (-) และพบมีการลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้เมื่อเลี้ยงเซลล์บนคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย (I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (IV dry)

ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ที่ปรากฏภายใต้กล้องเฟสคอนทราสเมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจน

จากการสังเกตการเรียงตัวของเซลล์ภายหลังการตอบสนองต่อคอลลาเจนในรูปแบบและชนิดต่างๆ ทางกล้องเฟสคอนทราส ที่กำลังขยายต่ำพบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวที่เวลา 48 ชั่วโมงดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนี้

การเรียงตัวของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ในภาวะปกติ (No coll) รวมทั้งบนคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย (Coll I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (Coll IV dry) มีการจัดเรียงตัวไม่แตกต่างกันคือการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ กระจายอยู่ทั่วไป โดยมีความหนาแน่นประมาณ 80-90% ยกเว้นเซลล์ที่เลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (Coll I gel) เท่านั้นที่มีการจัดเรียงตัวที่ต่างออกไป โดย HSC-3 เรียงตัวชิดกันและหนาแน่นครอบคลุมพื้นที่เกือบทั้งหมดในจานเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่ HSC-6 และ HSC-7 นั้น จะ

รวมกันเป็นกลุ่ม ไม่กระจายครอบคลุมไปในพื้นที่ที่มีอยู่ ลักษณะกลุ่มเซลล์ของ HSC-6 มีลักษณะคล้ายคอร์ด (cord-like) หรือกระจายอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ส่วนกลุ่มเซลล์ของ HSC-7 จะเกาะเป็นกลุ่ม ลักษณะกลมใหญ่ชัดเจน ร่วมกับบางส่วนของที่กระจายอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆเหมือนที่พบใน HSC-6 (ผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ได้นำเสนอเนื่องจากยังไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน)

ลักษณะรูปร่างของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ที่ปรากฏภายใต้กล้องเฟสคอนทราสต์เมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจน

สำหรับรูปร่างของเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง ภายหลังจากตอบสนองต่อคอลลาเจนในรูปแบบและชนิดต่างๆ ทางกล้องจุลทรรศน์นั้น จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้กำลังขยายที่สูงขึ้น ดังที่แสดงในรูปที่ 5 โดยรูปร่างของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ในภาวะปกติ (No Coll) รวมทั้งบนคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย (Coll I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (Coll IV dry) มีการจัดรูปร่างที่คล้ายคลึงกันคือเซลล์มีรูปร่างกลม หรือรี แต่ไม่ยาวมาก เซลล์ส่วนใหญ่มีส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic process) ยื่นออกจากตัวเซลล์ 2-3 อัน

ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (Coll I gel) นั้นที่มีรูปร่างที่ต่างออกไปอย่างชัดเจน โดยใน HSC-3 พบมีจำนวนของไซโตพลาสซึมเล็ก ๆ ยื่นออกจากตัวเซลล์มากขึ้น มีการสัมผัสระหว่างเซลล์มากขึ้น เซลล์เรียงตัวชิดกันมากขึ้น แต่ยังไม่เห็นขอบเขตของแต่ละเซลล์ ในขณะที่ HSC-6 และ 7 นั้นในส่วนที่เซลล์เรียงตัวเป็นกลุ่ม ไม่สามารถเห็นขอบเขตของแต่ละเซลล์ได้เลย เซลล์เรียงตัวในลักษณะที่พยายามยึดและประชิดกันและกันให้มากที่สุด และจากการที่เซลล์เบียดกันอย่างหนาแน่นนี้ทำให้เห็นได้ว่าการเรียงตัวของเซลล์นั้นมีมากกว่า 1 ชั้น โดยสังเกตเห็นกลุ่มของเซลล์ที่ขึ้นขึ้นมาจากพื้นผิวคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (Coll I gel) ซึ่งต่างออกไปจากการเรียงตัวของเซลล์ในงานเลี้ยงเซลล์ทั่วไปที่เซลล์จะเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) ในส่วนของเซลล์ที่เรียงตัวอยู่อิสระซึ่งก็สามารถพบได้ พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม ขอบเขตชัดเจน ไม่มีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นออกจากด้านข้างของตัวเซลล์แต่อย่างใด และ

แต่ละเซลล์กระจายอยู่โดยไม่สัมผัสกัน ดังนั้นจะสังเกตได้ว่ามีพื้นที่ผิวของคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (Coll I gel) ที่ไม่มีเซลล์เหลืออยู่มาก (ผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ได้นำเสนอ เนื่องจากให้ผลคล้ายกับผลที่ 48 ชั่วโมง แต่เห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนเท่า)

การเรียงตัวของ HSC-3, 6 และ 7 บนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล จาก slide section

เพื่อศึกษาการเรียงตัวของเซลล์ในมิติของความลึก section ที่เตรียมขึ้นจากการตรึง (fix) คอลลาเจนชนิดที่ I เจล ที่มี HSC-3, 6 และ 7 เลี้ยงอยู่ด้านบนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถูกย้อมด้วย Hematoxylin-Eosin เพื่อนำมาศึกษาลักษณะที่ปรากฏด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังที่แสดงในรูปที่ 6 พบว่า HSC-3 ซึ่งพบมีการกระจายและทอดตัวครอบคลุมพื้นที่ผิวเกือบทั้งหมดของคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) กลับไม่พบการแทรกตัวในแนวลึกเข้าสู่เนื้อของคอลลาเจนเจลเลย โดยจะสังเกตเห็นการเรียงตัวของเซลล์เพียงชั้นเดียวโดยตลอดบนพื้นผิวคอลลาเจน นอกจากนี้ไม่ปรากฏส่วนของไซโตพลาสซึมที่ยื่นออกจากตัวเซลล์ เข้าสู่เนื้อคอลลาเจนเจลแต่อย่างใด โดยพบว่าขอบเขตเซลล์ด้านล่างที่ติดกับคอลลาเจนเจล จะเรียบ (รูปที่ 6A) สำหรับ HSC-6 ที่เซลล์จัดเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มๆ ในแนวยาว (cord-like) จาก section จะสังเกตเห็นการเรียงตัวของเซลล์ 2 กลุ่มในแต่ละกลุ่มมีการเรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น เฉลี่ยแล้วโดยทั่วไป พบเซลล์เรียงตัวหนา 3-4 ชั้นและดูคล้ายมีเมทริกซ์นอกเซลล์แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ และเซลล์ในชั้นล่างสุดของก้อนของกลุ่มเซลล์นี้ดูคล้ายกับฝังตัวลงไปเนื้อคอลลาเจนเจลเล็กน้อย โดยเปรียบเทียบกับระนาบพื้นผิวของคอลลาเจนเจล (S) อย่างไรก็ตามขอบล่างของเซลล์ที่ติดกับคอลลาเจนเจลมีลักษณะเรียบ (รูปที่ 6B) สำหรับ HSC-7 พบเซลล์จับตัวอยู่เป็นกลุ่มๆ เช่นกัน ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะที่ปรากฏบนผิวของคอลลาเจนเจลจากกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ จาก section จะสังเกตเห็นการเรียงตัวของเซลล์เป็นกลุ่มก้อน (clump) เซลล์เรียงตัวซ้อนกันหลายชั้นขึ้นกับขนาดของกลุ่มเซลล์ เป็นที่สังเกตว่าในกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ พบว่ามีการสะสมของเมทริกซ์นอกเซลล์ในปริมาณที่มาก (*) และเห็นความแตกต่างจากส่วนที่เป็นตัวเซลล์ชัดเจน โดยเมทริกซ์นอกเซลล์นี้ถูกโอบล้อมอยู่ในชั้นของกลุ่มเซลล์

นอกจากนี้ขอบเขตด้านล่างของกลุ่มก้อนเซลล์นี้พบว่าอยู่ในระดับต่ำกว่าพื้นผิวของคอลลาเจนเจล (S) แต่ขอบล่างของเซลล์ชั้นที่ติดกับคอลลาเจนเจลมีลักษณะเรียบเช่นเดียวกับที่พบในเซลล์ไลน์อื่นๆ (รูปที่ 6C)

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ HSC-3, 6 หรือ 7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ HGF อาศัยการสัมผัสกันของเซลล์

เมื่อเลี้ยง HSC-3, 6 หรือ 7 ร่วมกับ HGF พบว่าเกิดแอคทีฟ MMP-2 เฉพาะในการเลี้ยง HGF ร่วมกับ HSC-3 และ 7 เมื่อเลี้ยงให้เซลล์สัมผัสกัน โดยไม่มีผลต่อระดับการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 7 และยืนยันความสำคัญของการสัมผัสนี้ด้วยการทดลองที่ทำใน Transwell ในรูปที่ 8 ซึ่งไม่พบการเพิ่มขึ้นของแอคทีฟ MMP-2 ในขณะที่เลี้ยง HSC-6 ร่วมกับ HGF โดยให้มีการสัมผัสกันของเซลล์ไม่พบการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 แต่พบมีการหลั่งเอนไซม์ MMP-9 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 7

ในรูปที่ 7 พบว่าเซลล์ HGF ซึ่งปกติหลั่งเอนไซม์ MMP-2 ในรูปเลแทนท์ และ เซลล์ HSC-3 ซึ่งปกติหลั่ง MMP-9 ในรูปเลแทนท์ และ MMP-2 ในรูปเลแทนท์ และอาจพบมีรูปอินเตอร์มิเดียตบ้าง จะปรากฏ อินเตอร์มิเดียต และ แอคทีฟ MMP-2 อย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงร่วมกัน ในขณะที่เซลล์ HSC-7 ซึ่งปกติไม่สามารถตรวจพบเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 แต่เมื่อได้สัมผัสกับเซลล์ HGF พบว่ามีอินเตอร์มิเดียต และ แอคทีฟ MMP-2 เช่นกันแต่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งในการเลี้ยงร่วมกันนี้ไม่พบว่าส่งเสริมให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ MMP-9 แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับ HSC-6 นั้นปกติหลั่ง MMP-2 และ MMP-9 ในรูปเลแทนท์ในระดับที่สามารถตรวจวัดได้ เมื่อเลี้ยงเซลล์นี้ร่วมกับ HGF ไม่พบการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองแต่อย่างไรก็ตาม แต่เป็นที่น่าสังเกตว่ามีการหลั่งเอนไซม์ MMP-9 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

เพื่อเป็นการตรวจสอบถึงความจำเป็นที่ต้องมีการสัมผัสระหว่างเซลล์ HSC-3 หรือ 7 กับ HGF ในการเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 รวมทั้งการเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ MMP-9 ใน

HSC-6 คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ Transwell ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ช่วยให้เซลล์สองชนิดอยู่ในหลุมเลี้ยงเซลล์เดียวกัน แต่ไม่มีการสัมผัสกันของเซลล์ ดังผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 8 ในรูปที่ 8D เป็นแบบการทดลองแสดงการเลี้ยงเซลล์ใน Transwell (○) และ/หรือ ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (□) โดย (1) และ (2) เป็นสภาวะที่เลี้ยง HGF และ HSC โดยลำพังตามลำดับ ส่วน (3) เป็น HSC ที่เลี้ยงใน Transwell ที่วางอยู่ในหลุมที่ไม่มีเซลล์ (4) ในขณะที่ (5) เป็น HSC ที่เลี้ยงใน Transwell เช่นเดียวกับ (3) แต่วางไว้ในหลุมที่มี HGF (6)

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลด้วย gelatin zymography ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยวิเคราะห์จากปริมาณที่เท่ากันของอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมทดลอง พบว่าในรูปที่ 8A ซึ่งแสดงผลการทดลองของ HSC-3 พบว่า (1) จาก HGF ที่เลี้ยงโดยลำพังพบเฉพาะ MMP-2 ซึ่งในกรณีนี้ นอกจากเลเทินท์ MMP-2 แล้วพบแอกทีฟ MMP-2 ในระดับต่ำๆ (background) ด้วยซึ่งปกติมีโอกาสพบได้ ส่วน (2) จะพบทั้ง MMP-2 และ 9 โดยพบ MMP-2 ในรูปอินเทอร์มีเดียตในระดับค่อนข้างชัดเจน เมื่อเทียบกับในรูปที่ 7 ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณที่น้อยกว่าของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดลองส่วนนี้ มีข้อสังเกตว่าใน (3) ระดับเอนไซม์ MMP-9 สูงขึ้นใน HSC-3 ที่เลี้ยงใน Transwell โดยลำพัง แม้ว่าจำนวนเซลล์และปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์มีเท่ากับที่ใช้เลี้ยงเซลล์ HSC-3 ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (2) ทั้งนี้อาจเป็นการตอบสนองของเซลล์ในกรณีที่มีความหนาแน่นของเซลล์ใน Transwell มากกว่า และเมื่อตรวจสอบใน (4) ที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากจานเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์ได้ต่อ Transwell ที่เลี้ยง HSC-3 พบมีทั้ง MMP-2 และ MMP-9 ทั้งที่ไม่มีเซลล์ ดังนั้นเอนไซม์ MMP-9 และ MMP-2 ที่ปรากฏจึงน่าจะเคลื่อนผ่านเมมเบรนของ Transwell ลงมา

ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ผลรวมของเอนไซม์ MMP-2 ใน (3) และ (4) ใกล้เคียงกับที่พบใน (2) โดยระดับเอนไซม์ MMP-2 ใน (3) ลดลงอย่างมาก แต่กลับพบเพิ่มขึ้นใน (4) ซึ่งไม่มีเซลล์แทน ซึ่งเป็นไปได้ที่เอนไซม์ MMP-2 ใน Transwell เคลื่อนผ่านเมมเบรนลงมา และแสดงว่าความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นใน Transwell ไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์ MMP-2 แต่มีผลต่อระดับเอนไซม์ MMP-9 เพราะ

ผลรวมของเอนไซม์ MMP-9 ใน (3) และ (4) มากกว่าที่พบใน (2) และเมื่อนำข้อมูลนี้มาวิเคราะห์ผลในส่วนที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกันแต่ไม่สัมผัสกันใน (5) และ (6) พบว่าเอนไซม์ MMP-9 มีมากขึ้นใน Transwell (5) และเคลื่อนผ่านเมมเบรนของ Transwell ลงมาปรากฏที่กันหลุมที่มีแต่ HGF (6) ซึ่งปกติไม่สร้างเอนไซม์ MMP-9 ทำให้ผลรวมของระดับของเอนไซม์ MMP-9 ที่ปรากฏใน (5) และ (6) นี้เป็นไปในลักษณะเดียวกับผลรวมของระดับของเอนไซม์ ที่พบใน (3) และ (4)

สำหรับเอนไซม์ MMP-2 ใน (5) นั้นมีระดับที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับ (3) มีความเป็นไปได้ที่เอนไซม์ MMP-2 ของ HGF ใน (6) เคลื่อนผ่านเมมเบรนเข้าสู่ Transwell ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ในตอนนี้ อย่างไรก็ตามก็ตีสิ่งที่ชัดเจนคือระดับ MMP-2 ที่พบใน (5) ไม่ต่างไปจาก (2) ที่มี HSC-3 โดยลำพัง และระดับของ MMP-2 ที่พบใน (6) ไม่ต่างไปจาก (1) ที่มีแต่ HGF โดยลำพัง ดังนั้นจึงสรุปว่าการเลี้ยงเซลล์ร่วมกันไม่กระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เพิ่มขึ้นถ้าไม่มีการสัมผัสกันของเซลล์ ส่วนใน HSC-7 ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกัน (รูปที่ 8C) สำหรับใน HSC-6 นั้น (รูปที่ 8B) นอกจากไม่พบการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 แล้ว ยังพบว่า การไม่สัมผัสกันของ HSC-6 และ HGF ไม่ทำให้ระดับการหลั่งเอนไซม์ MMP-9 เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยพบว่าผลรวมของ MMP-2 และ MMP-9 ที่พบใน (3) และ (4) มีระดับใกล้เคียงกับที่พบใน (2) และ ผลรวมของ MMP-9 ที่พบใน (5) และ (6) มีระดับใกล้เคียงกับที่พบใน (2) นอกจากนี้ผลรวมของ MMP-2 ที่พบใน (5) และ (6) มีระดับใกล้เคียงกับที่พบใน (1) โดยสรุปผลการทดลองใน HSC-6 ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับการหลั่งและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แต่อย่างใด การปรากฏของระดับเอนไซม์ที่ต่างกันในแต่ละส่วนของหลุมทดลองน่าจะเกิดจากการแพร่ของเอนไซม์จากบริเวณที่มีความเข้มข้นมากไปยังที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า เช่นที่อธิบายไว้ในส่วนของ HSC-3

ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 บนคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ไลน์ทั้งสามบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ ภายในเวลา 1 ชั่วโมงพบว่า จำนวนเซลล์ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์มีจำนวนใกล้เคียงกัน ดังกราฟที่แสดง ในรูปที่ 9 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการยึดเกาะของเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV พบว่าจำนวนเซลล์ของ HSC-3 เกาะเพิ่มมากขึ้นประมาณ 1.93 เท่าบนคอลลาเจนชนิดที่ I และ ประมาณ 2.22 เท่าบนคอลลาเจนชนิดที่ IV เมื่อเทียบกับการเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ ส่วนใน HSC-6 มีความสามารถในการเกาะบนคอลลาเจนชนิดที่ I ประมาณ 1.28 เท่า และ บนคอลลาเจนชนิดที่ IV ประมาณ 0.83 เท่า ใกล้เคียงกับบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ ในขณะที่ HSC-7 จำนวนเซลล์ที่เกาะบนคอลลาเจนชนิดที่ I ประมาณ 0.82 เท่า แต่จำนวนเซลล์ที่เกาะบนคอลลาเจนชนิดที่ IV มีประมาณ 0.37 เท่า โดย ทั้งนี้กำหนดให้จำนวน HSC ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติในแต่ละเซลล์ไลน์เท่ากับ 1 เท่า ดังกราฟที่ แสดงในรูปที่ 10

ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 บนคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านรูของแผ่นโพลีคาร์บอเนตที่ไม่ได้ เคลือบด้วยคอลลาเจนและไม่มีสารดึงดูดเซลล์ (chemoattractant) ที่ lower chamber พบว่าจำนวน เซลล์ที่เคลื่อนผ่านลงมาในเวลา 6 ชั่วโมงของ HSC-3 มีมากที่สุด (~1.76 เท่า) ส่วนใน HSC-6 และ HSC-7 มีจำนวนใกล้เคียงกัน (~1.04 และ 1 เท่าตามลำดับ) ดังกราฟที่แสดงในรูปที่ 11 เมื่อกำหนดให้ จำนวน HSC-7 ที่ เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตเทียบเป็น 1 เท่า จำนวนเท่าของเซลล์ที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 หลุม บริเวณอย่างน้อย 4 บริเวณในแต่ละหลุมถูกสุ่มเพื่อนับจำนวนเซลล์

ในกรณีที่แผ่นโพลีคาร์บอเนตถูกเคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV และกำหนดให้จำนวน เซลล์ของ HSC-7 ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตเทียบเป็น 1 เท่า เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ ไลน์ พบว่า HSC-3 เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตในเวลา 6 ชั่วโมง ในคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ได้

มากที่สุด คือประมาณ 8.22 และ 16.72 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ HSC-6 สามารถเคลื่อนได้ประมาณ 3.82 และ 4.15 เท่า ตามลำดับ ดังกราฟที่แสดงในรูปที่ 12 (A และ B) จำนวนเท่าของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 หลุม บริเวณอย่างน้อย 4 บริเวณในแต่ละหลุมถูกสุ่มเพื่อใช้นับจำนวนเซลล์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ (HSCs) ในด้านระดับการแสดงออกพื้นฐานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 รวมทั้งอิทธิพลของคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกมนุษย์ (HGF) ต่อการแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ตลอดจนความสามารถในการเคลื่อนที่ของ HSCs ผ่านคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่พบในเมทริกซ์นอกเซลล์และ basement membrane

HSC-3, 6 และ 7 เป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งที่มีต้นกำเนิดเป็นเซลล์เยื่อเมือกแล้วถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นเซลล์ไลน์โดยห้องปฏิบัติการของ Professor Teruo Amagasa, Tokyo Medical and Dental University (TMDU) โดย HSC-3 นั้นได้เคยถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในคุณสมบัติด้านความสามารถในการเคลื่อนที่ในขั้นตอนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Niinaka et al., 2002) ในขณะที่ HSC-6 และ 7 ยังไม่เคยถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยแต่อย่างใด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเซลล์ไลน์ทั้งสาม มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้เป็นที่ทราบกันว่าระดับของเอนไซม์ทั้งสองโดยเฉพาะระดับของเอนไซม์ในรูปแอกทีฟมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็งหลายๆชนิด (Azzam et al., 1993; Koshiba et al., 1998; Boyd and Balkwill, 1999; Ikebe et al., 1999; Ellenrieder et al., 2000; Hong et al., 2000; O Charoenrat et al., 2000b) จากการทดลองพบว่าในขั้นตอนการบ่มเจล เพื่อให้เกิดการย่อย gelatin และปรากฏผลเป็นแถบใสบนเจล จะต้องใช้เวลาถึงสองคืน เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ใช้เวลาบ่มเพียง 1 คืน ซึ่งแสดงถึงปริมาณ gelatin ที่ถูกย่อยได้ ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าเซลล์ไลน์ทั้งสามนี้ มีระดับการหลั่งเอนไซม์ทั้งสองค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จะพบอยู่ในรูปเลแทนท์ ยกเว้น HSC-3 ที่พบในรูปอินเตอร์มีเดียด้วย



อย่างไรก็ตามความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดเอนไซม์ในรูปแอกทีฟเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) นอกจากนี้ แม้ตัวเซลล์มะเร็งเองจะมีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ได้น้อย แต่ในสภาวะธรรมชาติ เซลล์มะเร็งเหล่านี้ฝังตัวและเวดล้อมอยู่ด้วยเมทริกซ์นอกเซลล์และปะปนกับเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งมีรายงานว่าเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในร่างกายให้กับเซลล์มะเร็ง (Poulsom et al., 1992; Schutz et al., 2002) ดังนั้นความสามารถที่เซลล์จะกระตุ้นให้เกิดแอกทีฟเอนไซม์ได้จึงมีความสำคัญไม่น้อยกว่าความสามารถในการสร้างหรือหลั่งเอนไซม์

ผลของคอลลาเจนต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

เมทริกซ์นอกเซลล์เป็นอีกปัจจัยแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเซลล์ และมีรายงานว่าเมทริกซ์นอกเซลล์ จะมีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Kijima et al., 2003; Tanaka et al., 2003) ผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เมทริกซ์นอกเซลล์ มีบทบาทต่อพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์เช่นเดียวกัน โดยพบว่า การเลี้ยง HSC-3, 6 และ 7 บนจานเลี้ยงที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (โครงสร้างสามมิติ) และ ดรราย (monolayer) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ดรราย (monolayer) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเอนไซม์ MMP-2, MMP-9 และ MT1-MMP ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์เมื่อเทียบกับการเลี้ยงบนจานพลาสติก

สำหรับคอลลาเจนชนิดที่ IV นั้น การศึกษาครั้งนี้ ใช้โครงสร้างที่เป็น monolayer เท่านั้น ซึ่งเป็นลักษณะโครงสร้างแบบเดียวกับที่พบในธรรมชาติในชั้นของ basement membrane ซึ่งคอลลาเจนชนิดที่ IV นั้นไม่ได้มีโครงสร้างที่เป็นสามมิติเช่นที่พบในคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของร่างกาย แต่มีโครงสร้างเป็นตาข่ายที่มีการจัดเรียงตัวในระนาบเดียวกัน (Prockop and Kivirikko, 1995) ดังนั้นการเตรียมคอลลาเจนชนิดที่ IV ในรูปของเจล จึงไม่สามารถทำได้ สำหรับ

คอลลาเจนชนิดที่ I ทราย นั้นแม้ว่าจะเป็นรูปที่ไม่พบในธรรมชาติ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย เพื่อใช้เปรียบเทียบกับคอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย ในด้านอิทธิพลของชนิดของคอลลาเจน ในกรณีเตรียมให้มีโครงสร้างในลักษณะเดียวกัน

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการชดเชยเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ให้กับเซลล์ โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม ซึ่ง 50% ประกอบขึ้นจากสารหลังของเซลล์ U2OS ที่มีเลแทนท์ และ อินเตอร์มีเดียด เอนไซม์ MMP-2 และ เลแทนท์ MMP-9 เป็นองค์ประกอบ พบว่าลำพังการได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสมเมื่อเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ ไม่มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ทั้งไลน์ทั้งสามแต่อย่างใด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารหลังของเซลล์ U2OS อื่นๆที่ปะปนมาพร้อมกับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 นั้นไม่มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง อย่างไรก็ตามไม่อาจปฏิเสธได้ว่าสารหลังของเซลล์ U2OS อื่นๆ ที่ปะปนมาจะไม่มีผลต่อเซลล์ HSC เลย แต่อาจมีผลต่อเซลล์ในด้านอื่นที่ไม่ได้อยู่ในขอบข่ายที่ทำการศึกษา

เป็นที่น่าสังเกตว่า ผลการทดลองที่แสดงว่าคอลลาเจนชนิดที่ I เจล และ ทราย สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแอกทีฟ MMP-2 ใน HSC-3 และ HSC-7 ได้นั้น จะพบได้เฉพาะในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสมเท่านั้น ส่วนในสภาวะที่ไม่ได้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสมนั้น กลับไม่พบแอกทีฟ MMP-2 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า ในสภาวะที่ไม่มีการชดเชยของเอนไซม์ทั้งสอง ระดับของเอนไซม์ที่สร้างโดยตัวเซลล์มะเร็งเองจะต่ำ ทำให้แอกทีฟ MMP-2 ที่เกิดขึ้นมีระดับที่ต่ำเกินกว่าจะตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคนี้

นอกจากนี้ ยังพบ แอกทีฟ MMP-2 เมื่อเลี้ยงเซลล์ไลน์ทั้งสามบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล ที่ไม่ได้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสมด้วย ซึ่งน่าจะเกิดจากคุณสมบัติของเจลที่อุ้มน้ำได้ ทำให้มีการดูดซับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 จากซีรัมเอาไว้บางส่วน ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังการถ่ายเซลล์ เพราะในการเกาะและแผ่ตัวบนจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จำเป็นต้องอยู่ในสภาวะที่มีซีรัม (Ruangpanit et al., 2001)

ดังนั้นการดูดซับเอนไซม์ด้วยเจลในลักษณะนี้ ทำให้เกิดสภาวะที่คล้ายกับการให้เอนไซม์เพิ่มเติมด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสม

อย่างไรก็ตาม การเติมเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 จากภายนอกให้กับเซลล์ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลในด้านการเพิ่มขึ้นของการหลั่งเอนไซม์ได้ ในกรณีที่มีการเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์เกิดขึ้นในระดับที่ไม่สูงนัก เนื่องจากถูกบดบังจากปริมาณของเอนไซม์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ แต่สามารถเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ในรูปแอกทีฟที่เกิดขึ้นได้

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง ที่พบว่าคอลลาเจนชนิดที่ IV ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของทั้งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ใน HSC ทั้ง 3 ไลน์นั้น จะสอดคล้องกับบทบาทของคอลลาเจนชนิดที่ IV ซึ่งส่วนใหญ่ที่พบในร่างกายเป็นองค์ประกอบของ basement membrane ที่พบแทรกอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์หลัก (parenchymal cells) และ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (stromal cells) ของทุกอวัยวะ และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม differentiation ของเซลล์หลักของอวัยวะนั้นๆ

หากการทำลายของคอลลาเจนชนิดที่ IV ใน basement membrane จะมีผลทำให้เซลล์สามารถติดต่อหรือสัมผัสโดยตรงกับ stromal cells และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ตอนล่าง ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ตอนล่างนี้เองมีคอลลาเจนชนิดที่ I เป็นองค์ประกอบหลักและมีคุณสมบัติในการส่งเสริมให้เกิด differentiation ของเซลล์ parenchyma ให้มีลักษณะของ stromal cells บางประการ

ในขณะที่คอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเฉพาะเอนไซม์ MMP-2 ได้ในเซลล์ส่วนใหญ่ที่เคยมีการศึกษา (Thompson et al., 1994; Boyd and Balkwill, 1999; Preaux et al., 1999) และคอลลาเจนในรูปแบบเจลให้ผลที่ดีกว่าคอลลาเจนในรูปแบบทรายในทุกเซลล์ไลน์ ทั้งนี้ได้มีหลายรายงานแสดงความสำคัญของโครงสร้างสามมิติของคอลลาเจนที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 (Tomasek et al., 1997; Haas et al., 1998) ประกอบกับการที่โครงสร้างสามมิติเป็นโครงสร้างที่พบในธรรมชาติด้วย

อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาในอดีตที่ผ่านมาพบว่าคอลลาเจนชนิดที่ IV สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ในเซลล์บางชนิด (Maquoi et al., 2000; Ruangpanit et al., 2001) และไม่สามารถเหนี่ยวนำได้ในเซลล์บางชนิด (Azzam and Thompson, 1992)

ผลของคอลลาเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของ MT1-MMP

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปแล้วว่า การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เป็นกลไกที่ซับซ้อน โดยต้องการเอนไซม์ MMP บนผิวเซลล์ หรือ membrane type -MMP (MT-MMP) ในกระบวนการกระตุ้นการทำงาน กลไกนี้ถูกเสนอโดย Strongin และคณะในปี 1995 โดยพบว่า เลเทนท์ MMP-2 (72 kD) จะยึดกับเซลล์โดยยึดเกาะผ่านไปกับ MT-MMP ที่อยู่บนผิวเซลล์ และมีโมเลกุลของ TIMP-2 ซึ่งปกติทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานจำเพาะของ MMP-2 ร่วมเกาะอยู่ด้วย โดยเลเทนท์ MMP-2 จะยึดกับส่วนของโมเลกุล TIMP-2 เกิดเป็น tri-molecular complex จากนั้น บางส่วนของ pro-peptide domain ของเลเทนท์ MMP-2 จะถูกตัดออกโดย MT-MMP อีกตัวหนึ่งที่อยู่ใกล้เคียงบนผิวเซลล์ เกิดเป็น อินเตอร์มีเดียด MMP-2 (68 kD) และส่วนของ pro-peptide domain ที่เหลืออยู่ในอินเตอร์มีเดียด MMP-2 จะหลุดออกไปภายหลัง เกิดเป็น แอคทีฟ MMP-2 (59 kD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในรูปที่พร้อมจะทำงาน แอคทีฟ MMP-2 นี้เท่านั้นที่สามารถทำการย่อยสลายสารตั้งต้นต่างๆของเอนไซม์ได้ โดยที่เอนไซม์ในรูป อินเตอร์มีเดียด ไม่มีความสามารถนี้ (Strongin et al., 1995)

เมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ MT1-MMP mRNA ใน HSC-3, 6 และ 7 พบว่ามีระดับที่สูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและสอดคล้องกับการเกิดแอคทีฟ MMP-2 ที่ปรากฏโดยเทคนิค gelatin zymography อย่างไรก็ตามพบว่าใน HSC-7 มีการลดลงของ MT1-MMP mRNA ด้วย ในคอลลาเจนชนิดที่ I ทราย ซึ่งก็ไม่สามารถตรวจพบแอคทีฟ MMP-2 โดย gelatin zymography แต่อย่างไร ใน HSC-6 นั้นระดับการแสดงออกของ MT1-MMP mRNA จากที่

ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคนี้ในภาวะปกติ แต่ก็พบมีระดับเพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อสัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ I เจล และตรวจพบแอกทีฟ MMP-2 โดย gelatin zymography แม้ว่าจะมีระดับที่ค่อนข้างต่ำก็ตาม อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR นี้แสดงผลต่อเอนไซม์เพียงการแสดงออกระดับจีน (gene) เท่านั้น การควบคุมระดับของเอนไซม์นี้ยังสามารถเกิดขึ้นได้อีกในระดับโปรตีน (translation) และการปรับเปลี่ยนโปรตีนภายหลัง (post-translation modification) รวมทั้งตำแหน่งของเอนไซม์ MT1-MMP ในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ซึ่ง MT1-MMP ต้องอยู่บนผิวเซลล์เท่านั้นจึงจะทำการกระตุ้นได้ (Strongin et al., 1995) ซึ่งเป็นการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในอีกระดับหนึ่ง

ส่วนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 นั้น จะเกิดโดยกลไกที่เหมือนกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP ตัวอื่นๆ ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ MMP-2 คืออาศัยเอนไซม์กลุ่ม serine proteinases เพื่อตัด pro-peptide domain ออก เพื่อกลายเป็น แอกทีฟ MMP ซึ่งเป็นกระบวนการที่เอนไซม์ MT1-MMP ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (Curran and Murray, 2000; Nelson et al., 2000)

ผลของคอลลาเจนต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์

สำหรับการศึกษาอิทธิพลของคอลลาเจนต่อรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นพบว่า เซลล์ HSC-3 มีการแผ่กระจายค่อนข้างดีบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล ความสามารถในการแผ่ไปบนคอลลาเจนชนิดที่ I นี้เป็นคุณสมบัติของเซลล์บุผิวทั่วไป ที่จะเกิดปรากฏการณ์ Transition โดยจะมีลักษณะคล้าย mesenchymal cells คือจะมีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่ (migration) และ การแทรกซึม (invasion) มากขึ้นเมื่อสัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ I (Sommers et al., 1991)

อย่างไรก็ตาม ใน section ของ HSC-3 นี้ไม่สามารถบอกได้ว่าการแทรกซึมของเซลล์อย่างชัดเจน ซึ่งในข้อนี้ทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าการเลี้ยง HSC-3 บนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล นั้นส่งเสริมความรุนแรงให้กับเซลล์เมื่อมองในแง่ของรูปร่าง แต่ในขณะเดียวกันการตอบสนองของเซลล์นี้ต่อ

คอลลาเจนชนิดที่ I เจล สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแอกทีฟ MMP-2 ซึ่งบ่งบอกความรุนแรงของเซลล์ในอีก รูปแบบหนึ่ง

สำหรับใน HSC-6 และ HSC-7 นั้นมีการจัดเรียงตัวที่ตรงข้ามออกไปคือ เรียงตัวซ้อนกันหลาย ชั้นและเป็นกลุ่มๆ ลักษณะเป็น cord หรือ clump ที่แยกจากกันโดยเด็ดขาด และไม่พบลักษณะที่แผ่ กระจายไปทั่วพื้นผิวคอลลาเจนชนิดที่ I เจล เซลล์มีแนวโน้มที่พยายามรวมกลุ่มกันมากกว่าที่จะแผ่ กระจายซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่มี well differentiation และพบว่าขอบเขตของก้อนกลุ่มเซลล์ที่มีตัว เซลล์เรียงอยู่โดยรอบมีลักษณะเรียบ ไม่มีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นยาวเข้าไปในเนื้อคอลลาเจน

อย่างไรก็ตามระดับของกลุ่มเซลล์นี้เทียบกับระนาบพื้นผิวคอลลาเจน จะพบว่าฝังอยู่ในคอลลา เจนอย่างชัดเจน โดยเฉพาะใน HSC-7 แต่งานวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่า การที่กลุ่มเซลล์ฝังตัว ลงในคอลลาเจนนี้ เกิดจากการแทรกซึมของเซลล์หรือเกิดจากการตั้งรังคอลลาเจนรอบๆ กลุ่มเซลล์ ซึ่ง หากพิจารณาภาพถ่ายการเรียงตัวของ HSC-7 ภายใต้กล้องเฟสคอนทราสต์ (รูปที่ 5) จะสังเกตเห็นแนว ของคอลลาเจนเจลที่ถูกตั้งรังโดยกลุ่มก้อนเซลล์ (รูปที่ 5, Coll I gel, หัวลูกศร) ความสามารถในการตั้งรัง คอลลาเจนนี้ สอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่า ทิศทางการทอดตัวของเส้นใยคอลลาเจนสามารถถูก ปรับเปลี่ยนได้โดยเซลล์ (Tomasek et al., 1997)

นอกจากนี้ คอลลาเจนเจล ที่เตรียมขึ้น มีความเข้มข้น 2mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ สามารถทำให้เกิดโครงสร้างสามมิติ (เจล) ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมได้ แต่เมื่อเทียบกับในความ เป็นจริงคอลลาเจนในร่างกายมีความหนาแน่นของเส้นใยมากกว่านี้มาก ดังนั้น ในการทดลองนี้เส้นใย คอลลาเจนในเจลจะอยู่กันอย่างหลวมๆ ทำให้ตัวเจลนี้ ย่อมไม่ติดสีใน section แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า มี การติดสีของคอลลาเจนที่บริเวณรอบๆกลุ่มเซลล์ HSC-7 ซึ่งน่าจะเกิดจากการตั้งรังคอลลาเจนโดยรอบ โดยเซลล์เข้าด้วยกัน ทำให้บริเวณนี้มีการสะสมของคอลลาเจนค่อนข้างหนาแน่นกว่าในบริเวณอื่นๆ และ เกิดการติดสีได้ และแรงดึงจากกลุ่มเซลล์นี้ อาจส่งผลให้กลุ่มก้อนเซลล์ดูเหมือนจมลงในเจล อย่างไรก็ตาม ข้อสันนิษฐานเหล่านี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ และยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้จากข้อมูลที่มีอยู่

อิทธิพลของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

การออกแบบการเลี้ยงเซลล์ HGF ร่วมกับเซลล์ HSCs นั้น แยกออกเป็นสองส่วน คือแบบที่เลี้ยงรวมกันโดยตรง และแบบใช้ Transwell ทั้งนี้เพื่อต้องการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ (cell-cell interaction) ว่าต้องการการสัมผัสโดยตรงหรือไม่ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 หรือ MMP-9

ในกรณีของ HSC-3 หรือ 7 กับ HGF นั้น จะพบการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในสถานะที่การสัมผัสกันของเซลล์ทั้งสองชนิด คือเลี้ยงในหลุมเดียวกัน (รูปที่ 7) และไม่พบในสถานะที่ใช้ Transwell (รูปที่ 8) ซึ่งเป็นสถานะที่ไม่มีการสัมผัสกันโดยตรงของเซลล์ทั้งสองชนิด ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ ในขณะที่ การเลี้ยง HSC-6 ร่วมกับ HGF ไม่พบการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 แต่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ MMP-9 (รูปที่ 7)

จะเห็นได้ว่ารูปแบบของปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นใดๆในเซลล์แต่ละชนิดเป็นไปได้ที่จะมีความเหมือนหรือแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงด้วย Transwell จะเป็นผลมาจากสารหลังจากเซลล์ ซึ่งก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เซลล์ที่อยู่ห่างกันในธรรมชาติใช้ในการติดต่อสื่อสารหรือกระตุ้นให้เกิดการตอบสนอง เช่น ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) พบว่าสารหลังจากเซลล์มะเร็งซึ่งประกอบด้วย growth factors หลายชนิดเหนี่ยวนำเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ (phenotype) และการแสดงออกของจีน (gene expression) ที่เกี่ยวข้องได้ (Khodarev et al., 2003)

ในกรณีที่เซลล์ต้องการการสัมผัสกันนั้นหมายถึงการสื่อสารระหว่างเซลล์ที่ต้องอาศัยโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ เช่น การสัมผัสกันของ stromal cells ของไขกระดูก และเซลล์มะเร็งชนิดไมอีโลมา (myeloma) จะสามารถทำให้เซลล์มะเร็งทนต่อยาที่ใช้ในการรักษา (Nefedova et al., 2003) หรือ การสัมผัสกันของ mesenchymal cells ของหลอดเลือดกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) เสริมการทำงานของ vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) แต่จะยับยั้งการทำงานของ

fibroblast growth factor-2 (FGF-2) ซึ่ง growth factor ทั้งสองนี้ต่างก็มีบทบาทในกระบวนการสร้างหลอดเลือดเช่นเดียวกัน (Tilke and Pepper, 2002) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่ HSC และ HGF จะต้องสัมพันธ์กันนี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้หากกลไกที่เหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์นี้ต่อไป

มีข้อสังเกตว่าแม้การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ MT1-MMP mRNA จะบ่งบอกว่าโดยปกติเซลล์ HSC และเซลล์ HGF ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่ม fibroblasts เช่นเดียวกับเซลล์ fibroblasts จากเอ็นดอทีเลียล (Pattamapun et al., 2003) หรือเซลล์ human foreskin fibroblasts (HFF) (Sanchavanakit et al., 2003) มีการแสดงออกของ MT1-MMP แต่โดยลำพังเซลล์เหล่านี้ปกติจะไม่สามารถเกิดแอคทีฟ MMP-2 ได้เอง แต่ที่บางครั้งอาจพบแอคทีฟ MMP-2 ได้ในเซลล์ HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง ดังปรากฏในรูปที่ 8 ในกรณีนี้เป็นไปได้จากการที่ปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้อยกว่าที่ใช้ในการทดลองในส่วนอื่นๆ ทำให้แอคทีฟเอนไซม์ที่เกิดขึ้นได้ในระดับต่ำๆ ปรากฏชัดเจน อย่างไรก็ตามการเกิดแอคทีฟ MMP-2 นั้นเกิดขึ้นได้เองถ้ามีเอนไซม์ MMP-2 และ ระดับของ MT1-MMP ที่มากพอ เช่นในการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ทำให้มีการเพิ่มการสร้างเอนไซม์ MT1-MMP โดยกระบวนการทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์พบมีการกระตุ้นให้เกิดแอคทีฟ MMP-2 ได้ (Deryugina et al., 1997; Ohuchi et al., 1997) และนอกเหนือไปจากนั้น แม้ว่า MT1-MMP จะไม่ได้มีระดับที่สูงมาก แต่ทำให้มีการรวมกลุ่มของเอนไซม์ MT1-MMP ในตำแหน่งและจำนวนที่เหมาะสมด้วยปัจจัยบางประการก็ทำให้เกิดแอคทีฟ MMP-2 ได้ (Chen and Wang, 1999; Deryugina et al., 2001)

จากการศึกษาในส่วนนี้ จะเห็นได้ว่าเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีอิทธิพล และสามารถส่งเสริมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งนอกเหนือไปจากความรุนแรงที่เซลล์มะเร็งมีอยู่เอง ซึ่งเป็นสิ่งที่จะพบได้ในสภาวะธรรมชาติ โดยเฉพาะบริเวณขอบของก้อนมะเร็งที่ต่อเนื่องไปกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันข้างเคียง

การเคลื่อนที่ของเซลล์บนคอλλαเจน

การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านคอλλαเจนชนิดที่ I และ IV จะพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนเนตลงมาใน lower chamber ปัจจัยประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง คือความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์บนคอλλαเจน เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เกาะบนคอλλαเจน จะส่งผลต่อมาถึงจำนวนเซลล์ตั้งต้นสำหรับการศึกษาการเคลื่อนที่ผ่านไปบนอีกด้านหนึ่งของแผ่นโพลีคาร์บอนเนตด้วย การทดลองครั้งนี้ กำหนดระยะเวลาเปรียบเทียบการเกาะที่ 1 ชั่วโมง เพื่อจะได้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนของความสามารถในการเกาะที่แตกต่างกันของเซลล์แต่ละไลน์ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการเคลื่อนที่ จะใช้ที่ 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ได้จากการศึกษานำร่องว่า เป็นเวลาเหมาะที่สุดที่เพียงพอให้เซลล์เคลื่อนที่ผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนเนตได้ ไม่มากหรือน้อยเกินไป จนกระทบกับการนับจำนวนเซลล์ หรือไม่สามารถเห็นความแตกต่างในส่วนของจำนวนเซลล์ที่เกาะ แต่ต้องนานพอที่จะให้เซลล์สามารถแผ่ตัว และเคลื่อนที่ แต่ไม่นานจนทำให้เซลล์มีโอกาสที่จะแบ่งตัว ซึ่งจะทำการแปลผลผิดไป

จากผลการทดลองจะเห็นว่าความสามารถของเซลล์ทั้งสามไลน์ในการเกาะบนคอλλαเจนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งที่ความสามารถในการเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติมีความใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาโดยภาพรวม จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านลงมาในด้าน lower chamber พบว่าเซลล์ที่เกาะได้ดีก็จะมีจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านลงมามากซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์บนแผ่นโพลีคาร์บอนเนตที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอλλαเจน เป็นการกำจัดปัจจัยภายนอกของการเคลื่อนที่ตามทิศทางของแรงดึงดูดโลกออกไป เนื่องจากโดยธรรมชาติแล้ววัตถุมีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่จากที่สูงลงสู่ที่ต่ำเสมอ ถ้าไม่มีปัจจัยจากภายนอกอื่นมากระทำ ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ทั้งสามไลน์เคลื่อนที่ลงสู่ lower chamber โดยที่ HSC-3 มีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่ลงสู่ lower chamber มากกว่าเมื่อเทียบกับ HSC-6 และ HSC-7 (รูปที่ 11)

อย่างไรก็ตามรูปแบบของการศึกษาเรื่องความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ในงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดบางประการ ทำให้การเปรียบเทียบและการแปลผลไม่สามารถทำได้อย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยมีอุปกรณ์ 48-well microchemotaxis chamber เพียง 1 ชุด และในการใช้งานจะประกอบ 48-well microchemotaxis chamber เข้ากับแผ่นโพลีคาร์บอเนต 1 แผ่น โดยแต่ละแผ่นโพลีคาร์บอเนตจะเคลื่อนด้วยคอลลาเจนได้เพียง 1 ชนิด ไม่สามารถแบ่งเพื่อให้เคลื่อนด้วยคอลลาเจน 2 ชนิดบนแผ่นเดียวกันได้ แต่สามารถทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ทั้งสามไลน์ใน 48-well microchemotaxis chamber ได้ ดังนั้นการเปรียบเทียบที่ทำได้ในขณะนี้ จึงเป็นการเปรียบเทียบเฉพาะผลการทดลองที่ได้จากในแผ่นโพลีคาร์บอเนตเดียวกัน คือเปรียบเทียบความสามารถในการเคลื่อนที่ระหว่างสามเซลล์ไลน์ และจะเปรียบเทียบผลระหว่างแผ่นโพลีคาร์บอเนต หรือระหว่างชนิดของคอลลาเจนก็ต่อเมื่อมีค่าความแตกต่างกันที่เด่นชัด ทั้งนี้แม้ว่าจำนวนเซลล์ที่ถ่ายลงหลุมในแต่ละครั้งจะได้ผ่านการคำนวณเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่เท่ากันทุกครั้งก็ตาม แต่ความคลาดเคลื่อนสามารถเกิดขึ้นได้ในแต่ละครั้งของการทดลอง

จากข้อมูลที่มี สามารถเปรียบเทียบความสามารถในการเคลื่อนที่ระหว่างเซลล์ไลน์ทั้งสามได้ในระดับหนึ่ง โดยพิจารณาจากสัดส่วนของจำนวนเซลล์แต่ละไลน์ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตที่เคลือบด้วยคอลลาเจน (รูปที่ 12) เปรียบเทียบต่อสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่เกาะบนคอลลาเจนแต่ละชนิดที่ไม่เท่ากัน (รูปที่ 10) พบว่า บนคอลลาเจนชนิดที่ I นั้น เมื่อเทียบ HSC-3 กับ HSC-7 นั้น จำนวน HSC-3 ที่เคลื่อนลงสู่ lower chamber มีมากกว่าประมาณ 3 เท่า และ เมื่อเทียบ HSC-6 กับ HSC-7 นั้น จำนวน HSC-6 มีมากกว่าประมาณ 2.5 เท่า ในขณะที่บนคอลลาเจนชนิดที่ IV นั้น เมื่อเทียบ HSC-3 กับ HSC-7 นั้น จำนวน HSC-3 มีมากกว่าประมาณ 2.7 เท่า และ เมื่อเทียบ HSC-6 กับ HSC-7 นั้น จำนวน HSC-6 มีมากกว่าประมาณ 1.8 เท่า ดังนั้นโดยภาพรวมแล้ว HSC-3 มีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลลาเจนทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด โดยมากกว่า HSC-6 และ HSC-7 ตามลำดับ

ความสามารถในการเคลื่อนตัวของเซลล์ผ่านคอลลาเจนชนิดที่ I นั้น เป็นคุณสมบัติของ mesenchymal cells หรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยปกติ (Lepekhin et al., 2002; Loftis et al., 2003) ซึ่งมักจะต้องเคลื่อนที่แทรกตัวอยู่ในเมทริกซ์นอกเซลล์ อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติดังกล่าวนี้ ยังอาจพบได้ใน epithelial cells ที่อยู่ใน transitional stage ซึ่งพบได้ในระหว่างกระบวนการสร้างอวัยวะ (morphogenesis) (Berdichevsky et al., 1994; Whelan and Senger, 2003) หรือในระหว่างการซ่อมแซมบาดแผล โดยมีรายงานว่าเมื่อ epithelial cells สัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ I ก็จะเปลี่ยนสภาพเป็น non-polar cell และเริ่มเคลื่อนไปบนคอลลาเจนชนิดที่ I คล้ายกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fujiwara et al., 1995; Daniels et al., 2003).

ในสภาวะปกติ epithelial cells จะวางตัวอยู่บน basement membrane ที่มีคอลลาเจนชนิดที่ IV เป็นองค์ประกอบ โดยคอลลาเจนชนิดที่ IV นี้มีอิทธิพลในการคงรูปร่างและคุณสมบัติของ epithelial cells (Song et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ในระยะพัฒนาการ basement membrane ที่มีคอลลาเจนชนิดที่ IV เป็นองค์ประกอบหลัก สามารถส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนที่ของ epithelial cells เข้าสู่ตำแหน่งที่ถูกต้องของพัฒนาการของอวัยวะหรือโครงสร้างนั้นๆ ได้เช่นกัน เช่น ในกรณีของการเกิดต่อมน้ำลาย (Raitz et al., 2003) หรือ การเกิด cusp ของฟัน (Lisi et al., 2003) เป็นต้น ดังนั้น การที่ HSC สามารถเคลื่อนผ่านคอลลาเจนชนิดที่ IV น่าจะเป็นการ dedifferentiate ของเซลล์มะเร็งกลับสู่ระยะ embryonic stage

กล่าวโดยสรุป การที่ HSC มีการเคลื่อนที่เมื่อสัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ I นั้น น่าจะแสดงออกถึงพฤติกรรมคล้ายกับ mesenchymal cells ในขณะที่ ความสามารถในการเคลื่อนที่เมื่อสัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ IV นั้น น่าจะเกิดจากการที่ HSC ซึ่งเป็น epithelial cells มีคุณสมบัติของ young epithelial cells ในระยะ development ซึ่งคุณสมบัติทั้งสองประการนี้ จะพบได้ชัดเจนใน HSC-3 เมื่อเทียบกับ HSC-6 และ HSC-7 ดังนั้น HSC-3 จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นเซลล์มะเร็งที่มีความรุนแรงที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์อีกสองไลน์ เพราะมีความคล้ายไปทาง mesenchyme มากกว่า มีความสามารถที่จะ

เคลื่อนและแพร่กระจายไปบนคอลลาเจนชนิดที่ 1 เจลได้ดีกว่า ประกอบกับสามารถสร้างเอนไซม์เจลาติเนสได้เอง และเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างขึ้นเปลี่ยนเป็นรูปแอคทีฟได้เมื่อสัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ 1

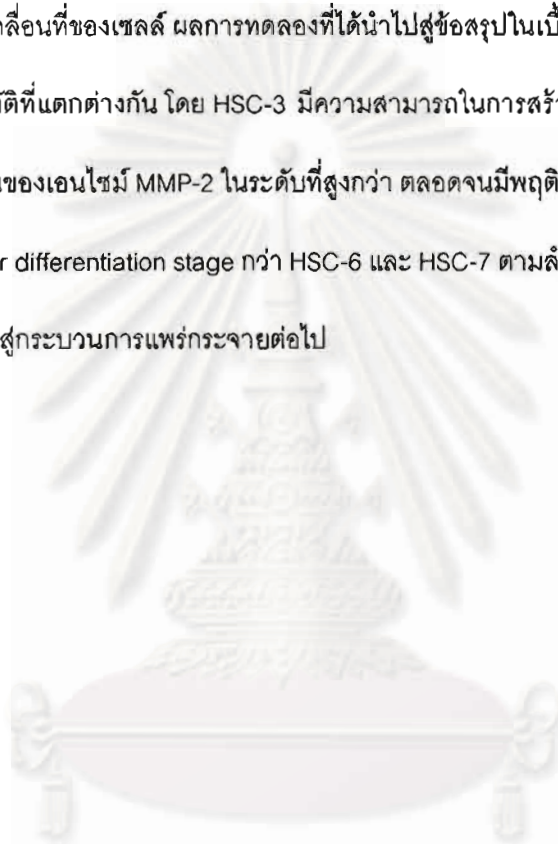
แม้ว่า HSC-3 จะไม่แสดงพฤติกรรมการแทรกซึม (invasion) ในการทดลองครั้งนี้ แต่การผลการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับ HGF ซึ่งพบว่าในสภาวะดังกล่าว มีระดับของ proteolytic enzymes เพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจมากพอที่จะทำให้เกิดกระบวนการแทรกซึมต่อไปได้ นอกจากนี้ HSC-3 ยังจัดว่าเป็นเซลล์ที่มีระดับของ differentiation ที่ต่ำ (poor differentiation) เพราะมีแนวโน้มที่สูญเสีย polarity ไปคือเกิดการเคลื่อนที่เมื่อสัมผัสกับคอลลาเจนชนิดที่ IV ได้ดีเมื่อเทียบกับ HSC-6 และ HSC-7

ในกรณีของ HSC-6 เนื่องจากเซลล์ไลน์นี้มีความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำกว่า HSC-3 บนคอลลาเจนทั้งสองชนิด รวมทั้งมีการเรียงตัวที่เป็นกลุ่มไม่แพร่กระจายบนคอลลาเจนชนิดที่ 1 เจล และไม่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ gelatinases ในทุกการทดลอง จึงน่าจะสรุปว่าเป็นเซลล์ที่มีความรุนแรง (aggressiveness) น้อยกว่า HSC-3 ส่วน HSC-7 นั้น มีพฤติกรรมที่ค่อนข้างนิ่ง ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะมีระดับการสร้างเอนไซม์ต่ำ ถึงแม้ว่าจะสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เมื่อสัมผัสกับเซลล์ HGF แต่ก็อยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับใน HSC-3

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ ที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ไลน์ ส่วนหนึ่งสะท้อนมาจาก ระดับของ differentiation ที่แตกต่างกัน ทำให้เซลล์ตอบสนองต่อปัจจัยภายนอกในที่นี้คือคอลลาเจน 2 ชนิด ในรูปแบบที่ต่างกันออกไป ตลอดจนความสามารถในการสร้าง proteolytic enzymes ของเซลล์เอง ซึ่งจะเสริมความสามารถในการเคลื่อนผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในบริเวณข้างเคียง อย่างไรก็ตามในกระบวนการแทรกซึมของเซลล์ในธรรมชาติ ยังมีปัจจัยร่วมอื่นๆ เช่น ชนิดของ growth factors ที่เกี่ยวข้อง และระดับของ growth factors ที่เหมาะสม เป็นต้น เข้ามาประกอบ และส่งเสริมให้เกิดการแทรกซึมของเซลล์ นอกเหนือไปจากคุณสมบัติของเซลล์ที่มีอยู่เอง ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป

สรุป

ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของคอแลลาเจนซึ่งเป็นตัวแทนของเมทริกซ์นอกเซลล์ และ HGF ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 โดยไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 ในเซลล์ไลน์ที่เตรียมได้จากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ (HSCs; HSC-3, 6 และ 7) ตลอดจนอิทธิพลของคอแลลาเจนชนิดที่ I และ IV ที่มีผลต่อรูปร่าง การเรียงตัว และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผลการทดลองที่ได้นำไปสู่ข้อสรุปในเบื้องต้นว่า เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดย HSC-3 มีความสามารถในการสร้างและถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในระดับที่สูงกว่า ตลอดจนมีพฤติกรรมที่แสดงออกถึงความรุนแรง และอยู่ใน poor differentiation stage กว่า HSC-6 และ HSC-7 ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะส่งเสริมให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการแพร่กระจายต่อไป





เอกสารอ้างอิง

- Ara T, Deyama Y, Yoshimura Y, Higashino F, Shindoh M, Matsumoto A, and Fukuda H. Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Lett* 2000;157:115-21.
- Aresu O, Nicolo G, Allavena G, Melchiori A, Schmidt J, Kopp JB, d'Amore E, Chader GJ, and Albinì A. Invasive activity, spreading on and chemotactic response to laminin are properties of high but not low metastatic mouse osteosarcoma cells. *Invasion Metastasis* 1991;11:2-13.
- Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, and Liotta LA. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J Cell Biol* 1990;110:1427-38.
- Azzam HS, Arand G, Lippman ME, and Thompson EW. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1758-64.
- Azzam HS, and Thompson EW. Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res* 1992;52:4540-4.
- Baba Y, Tsukuda M, Mochimatsu I, Furukawa S, Kagata H, Yoji, Nagashima, Sakai N, Koshika S, Imoto M, and Kato Y. Inostamycin, an inhibitor of cytidine 5'-diphosphate 1,2-diacyl-sn-glycerol (CDP-DG): inositol transferase, suppresses invasion ability by reducing productions of matrix metalloproteinase-2 and -9 and cell motility in HSC-4 tongue carcinoma cell line. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:273-9.
- Basara ML, McCarthy JB, Barnes DW, and Furcht LT. Stimulation of haptotaxis and migration of tumor cells by serum spreading factor. *Cancer Res* 1985;45:2487-94.
- Berdichevsky F, Alford D, D'Souza B, and Taylor-Papadimitriou J. Branching morphogenesis of human mammary epithelial cells in collagen gels. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 12):3557-68.
- Boyd RS, and Balkwill FR. MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts. *Br J Cancer* 1999;80:315-21.
- Chambers AF, and Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1260-70.

- Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Netterville JL, and Burkey BB. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:271-8.
- Chen WT, and Wang JY. Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:361-71.
- Curran S, and Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36:1621-30.
- Daniels JT, Limb GA, Saarialho-Kere U, Murphy G, and Khaw PT. Human corneal epithelial cells require MMP-1 for HGF-mediated migration on collagen I. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1048-55.
- Darongsuwan T, Pavasant P. In vitro effect of hydroxyapatite crystal on gingival and periodontal ligament fibroblasts. *CU Dent J* 1997;20:183-93.
- Deryugina EI, Luo GX, Reisfeld RA, Bourdon MA, and Strongin A. Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res* 1997;17:3201-10.
- Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, and Strongin AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001;263:209-23.
- Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Buchler M, *et al.* Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 2000;85:14-20.
- Faassen AE, Schrage JA, Klein DJ, Oegema TR, Couchman JR, and McCarthy JB. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 1992;116:521-31.
- Fujiwara Y, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K, and Tarnawski A. Role of extracellular matrix in attachment, migration, and repair of wounded rabbit cultured gastric cells. *J Clin Gastroenterol* 1995;21 Suppl 1:S125-30.
- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, and Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1997;272:24-7.

- Haas TL, Davis SJ, and Madri JA. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:3604-10.
- Hong SD, Hong SP, Lee JI, and Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36:207-13.
- Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, and Shirasuna K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:315-23.
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, and Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;58:1048-51.
- Jiang WG, Puntis MC, and Hallett MB. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg* 1994;81:1576-90.
- Katori H, Baba Y, Imagawa Y, Nishimura G, Kagesato Y, Takagi E, Ishii A, Yanoma S, Maekawa R, Yoshioka T, *et al.* Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. *Cancer Lett* 2002;178:151-9.
- Kawamata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, and Sato M. Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol* 1998;13:699-704.
- Khodarev NN, Yu J, Labay E, Darga T, Brown CK, Mauceri HJ, Yassari R, Gupta N, and Weichselbaum RR. Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells. *J Cell Sci* 2003;116:1013-22.
- Kijima T, Maulik G, Ma PC, Madhiwala P, Schaefer E, and Salgia R. Fibronectin enhances viability and alters cytoskeletal functions (with effects on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway) in small cell lung cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7:157-64.
- Koshiba T, Hosotani R, Wada M, Miyamoto Y, Fujimoto K, Lee JU, Doi R, Arai S, and Imamura M. Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998;82:642-50.
- Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, and Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* 2000;157:1777-83.

- Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, and Morimatsu M. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol* 1993;99:18-23.
- Lepekhn E, Gron B, Berezin V, Bock E, and Dabelsteen E. Differences in motility pattern between human buccal fibroblasts and periodontal and skin fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 2002;110:13-20.
- Lisi Š, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, and Lesot H. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 2003;44 Suppl 1:167-70.
- Loftis MJ, Sexton D, and Carver W. Effects of collagen density on cardiac fibroblast behavior and gene expression. *J Cell Physiol* 2003;196:504-11.
- MacDonald NJ, and Steeg PS. Molecular basis of tumour metastasis. *Cancer Surv* 1993;16:175-99.
- Maquoi E, Franken F, Noel A, Krell HW, Grams F, and Foidart JM. Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. *Exp Cell Res* 2000;261:348-59.
- Matsushita A, Onda M, Uchida E, Maekawa R, and Yoshioka T. Antitumor effect of a new selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, on experimental pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2001;92:434-40.
- Mignatti P, and Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993;73:161-95.
- Munaut C, Noel A, Weidle UH, Krell HW, and Foidart JM. Modulation of the expression of interstitial and type-IV collagenases in coculture of HT1080 fibrosarcoma cells and fibroblasts. *Invasion Metastasis* 1995;15:169-78.
- Nefedova Y, Landowski TH, and Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 2003;17:1175-82.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18:1135-49.
- Niinaka Y, Haga A, Negishi A, Yoshimasu H, Raz A, and Amagasa T. Regulation of cell motility via high and low affinity autocrine motility factor (AMF) receptor in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2002;38:49-55.
- Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Oba K, Kaneko T, Syouji T, Igarashi A, and Nakamura S. Effect of combination therapy with matrix metalloproteinase inhibitor MMI-

- 166 and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:688-95.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, and Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997;272:2446-51.
- O Charoenrat P, Modjtahedi H, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, and Eccles SA. Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 2000a;60:1121-8.
- O Charoenrat P, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, and Eccles SA. Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:631-9.
- O Charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, and Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 2000b;86:307-17.
- O Charoenrat P, Rhys-Evans PH, and Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:813-20.
- Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, and Pavasant P. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2003;38:115-21.
- Poulsom R, Pignatelli M, Steller-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, and Stamp GW. Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1992;141:389-96.
- Preaux AM, Mallat A, Nhieu JT, D'Ortho MP, Hembry RM, and Mavier P. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. *Hepatology* 1999;30:944-50.
- Price JT, Bonovich MT, and Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997;32:175-253.
- Prockop DJ, and Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995;64:403-34.
- Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, and Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993;142:359-65.

- Raitz R, Martins MD, and Araujo VC. A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 2003;32:290-6.
- Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, and Sawaya R. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* 1993;53:2208-11.
- Ruangpanit N, Chan D, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Polarek J, Yang C, Bateman JF, and Thompson EW. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol* 2001;20:193-203.
- Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, Kono M, and Wakisaka S. Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Lett* 2000;157:177-84.
- Sanchavanakit N, Suwanchai A, Boonyakiati O, Pimkhaokham A, and Pavasant P. Inhibitory effect of EGCG on collagen induced MMP-2 activation in oral squamous carcinoma cell lines. *CU Dent J* 2003;26:1-14.
- Sato T, Iwai M, Sakai T, Sato H, Seiki M, Mori Y, and Ito A. Enhancement of membrane-type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) production and sequential activation of progelatinase A on human squamous carcinoma cells co-cultured with human dermal fibroblasts. *Br J Cancer* 1999;80:1137-43.
- Schutz A, Schneidenbach D, Aust G, Tannapfel A, Steinert M, and Wittekind C. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumour Biol* 2002;23:179-84.
- Slootweg PJ, Hordijk GJ, and Koole R. Autopsy findings in patients with head and neck squamous cell cancer and their therapeutic relevance. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B:413-5.
- Soini Y, Paakko P, and Autio-Harminen H. Genes of laminin B1 chain, alpha 1 (IV) chain of type IV collagen, and 72-kd type IV collagenase are mainly expressed by the stromal cells of lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993;142:1622-30.
- Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, and Byers SW. Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 1991;2:365-72.

- Song W, Jackson K, and McGuire PG. Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelial-mesenchymal transformation of the endocardial cushions. *Dev Biol* 2000;227:606-17.
- Sternlicht MD, and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, and Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995;270:5331-8.
- Tanaka R, Saito T, Ashihara K, Nishimura M, Mizumoto H, and Kudo R. Three-dimensional coculture of endometrial cancer cells and fibroblasts in human placenta derived collagen sponges and expression matrix metalloproteinases in these cells. *Gynecol Oncol* 2003;90:297-304.
- Thompson EW, Yu M, Bueno J, Jin L, Maiti SN, Palao-Marco FL, Pulyaeva H, Tamborlane JW, Tirgari R, Wapnir I, and et al. Collagen induced MMP-2 activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;31:357-70.
- Tille JC, and Pepper MS. Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 2002;280:179-91.
- Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, and Kanzaki J. Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 2000;150:15-21.
- Tomasek JJ, Halliday NL, Updike DL, Ahern-Moore JS, Vu TK, Liu RW, and Howard EW. Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1997;272:7482-7.
- Tryggvason K, Hoyhtya M, and Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:209-18.
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, and Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-94.
- Whelan MC, and Senger DR. Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A. *J Biol Chem* 2003;278:327-34.
- Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, and Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and

predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;95:44-50.

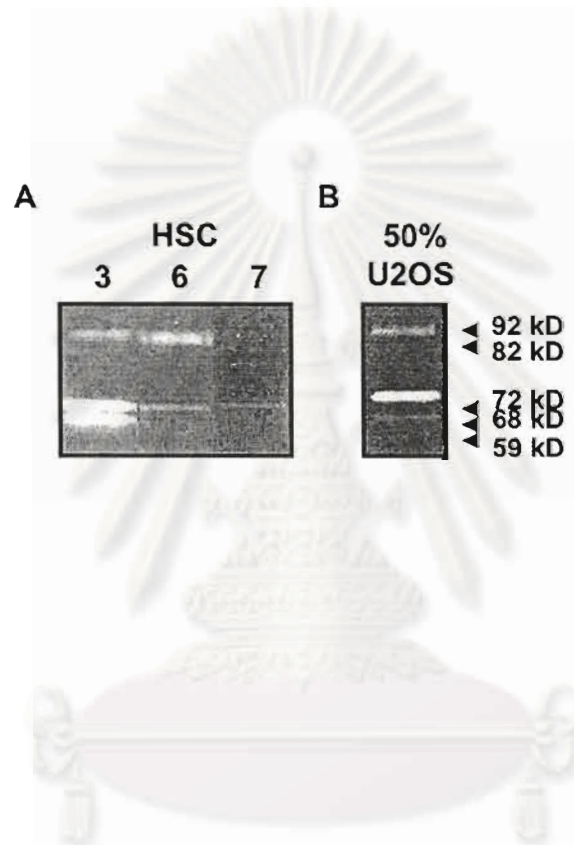
Zbaren P, and Lehmann W. Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;113:762-4.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 (A) ในอาหารเลี้ยงเซลล์จาก HSC-3, 6 และ 7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (B) ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่จะใช้เลี้ยงเซลล์ HSC-3, 6 และ -7 ภายหลังบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลเทนท์) และ 82 kD (แอคทีฟ), และ MMP-2 ที่ 72 kD (เลเทนท์), 68 kD (อินเตอร์มีเดียด) และ 59 kD (แอคทีฟ)

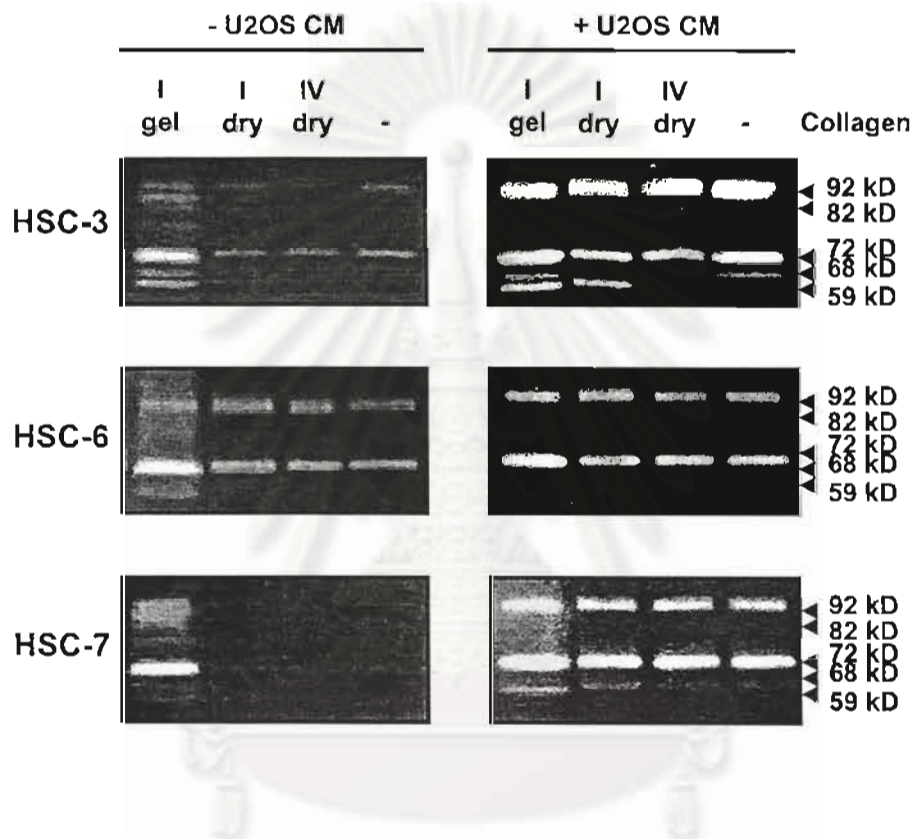
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 เจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 วิเคราะห์จากอาหาร
เลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก HSC-3, 6 และ 7 ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่เซลล์
ถูกเลี้ยงอยู่บนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) และ ทราย (I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย
(IV dry) และกลุ่มควบคุมที่ทำการเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติกที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน
(-) ในสภาวะที่ไม่ได้รับ (-U2OS CM, แกวช่าย) และได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสม (+U2OS
CM, แกวชวา) หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลแทนท์) และ 82 kD (แอคทีฟ),
และ MMP-2 ที่ 72 kD (เลแทนท์), 68 kD (อินเตอร์มีเดียด) และ 59 kD (แอคทีฟ)

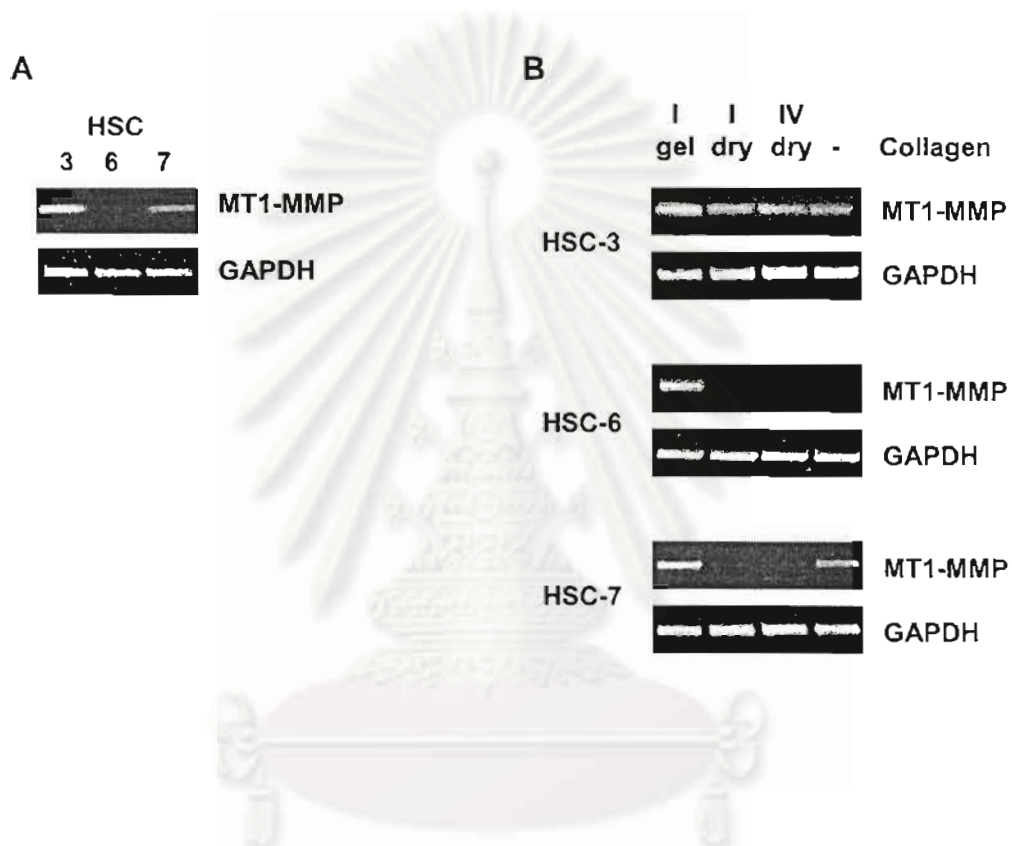
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

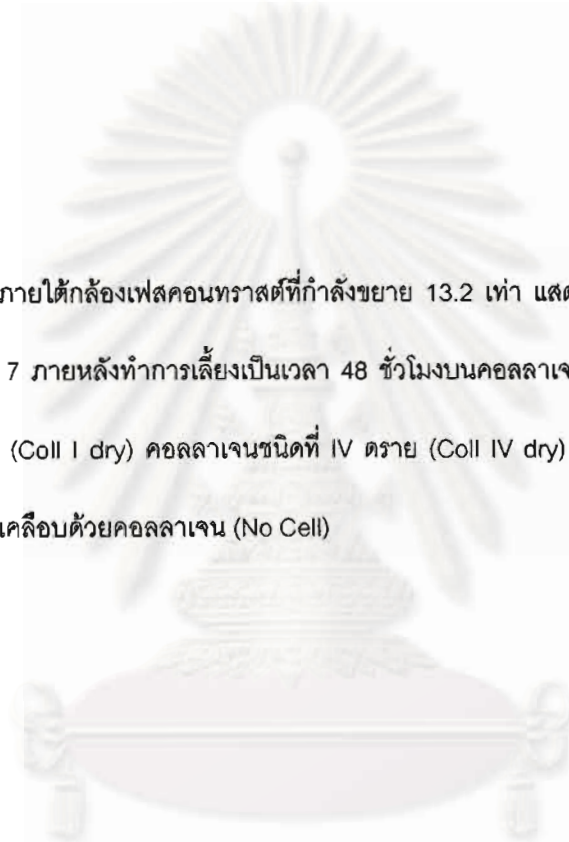
รูปที่ 3 ภาพแสดงระดับของอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ MT1-MMP ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) ในสภาวะที่เซลล์ไม่ได้รับการกระตุ้น (B) ในการตอบสนองต่อคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (I gel) และ ทราย (I dry) และ คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (IV dry) และจานเลี้ยงเซลล์พลาสติกที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน (-) ใน HSC-3, 6 และ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของเอนไซม์ GAPDH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 รูปถ่ายภายใต้กล้องเฟสคอนทราสต์ที่กำลังขยาย 13.2 เท่า แสดงการเรียงตัวของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (Coll I gel) และ ทราย (Coll I dry) คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (Coll IV dry) และบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติกที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน (No Cell)

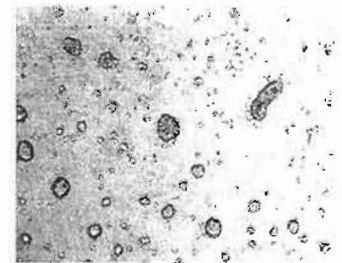
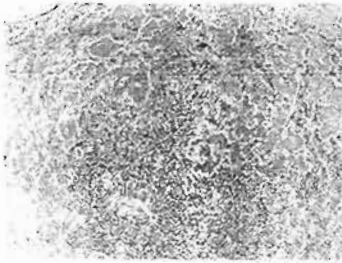
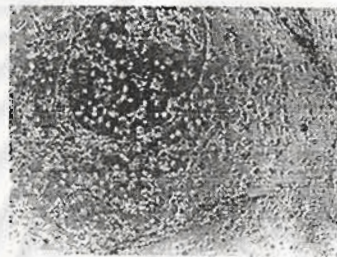
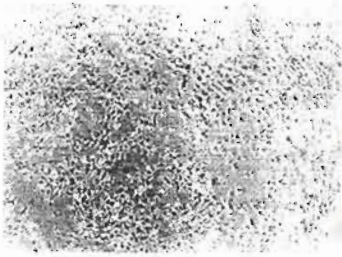
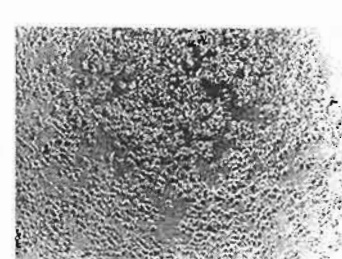
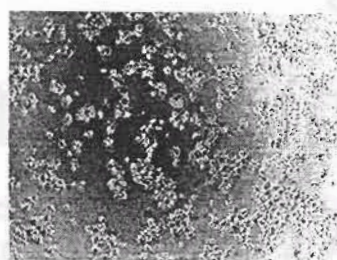
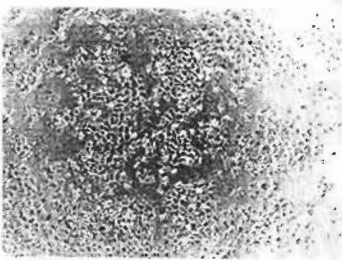


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HSC-3

HSC-6

HSC-7

Coll
I
gelColl
I
dryColl
IV
dryNo
Coll

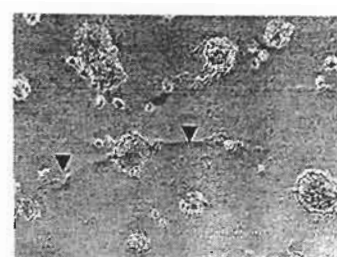
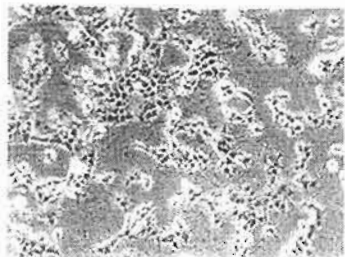
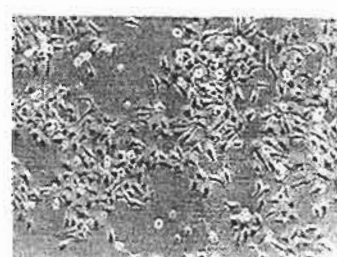
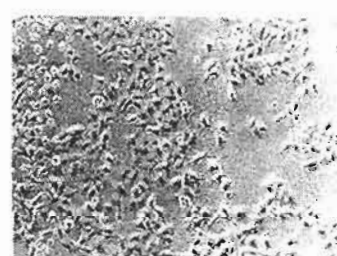
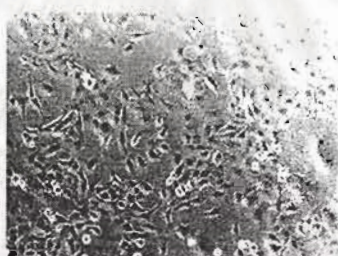
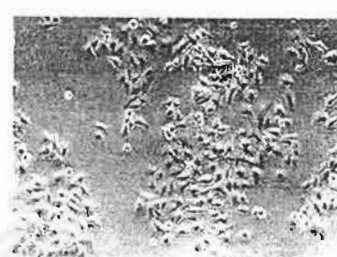
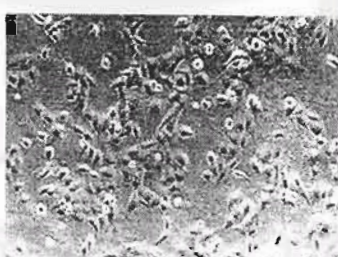
รูปที่ 5 รูปถ่ายภายใต้กล้องเฟสคอนทราสต์ที่กำลังขยาย 33 เท่า แสดงรูปร่างของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล (Coll I gel) และทราย (Coll I dry) คอลลาเจนชนิดที่ IV ทราย (Coll IV dry) และบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติกที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจน (No Cell)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HSC-3

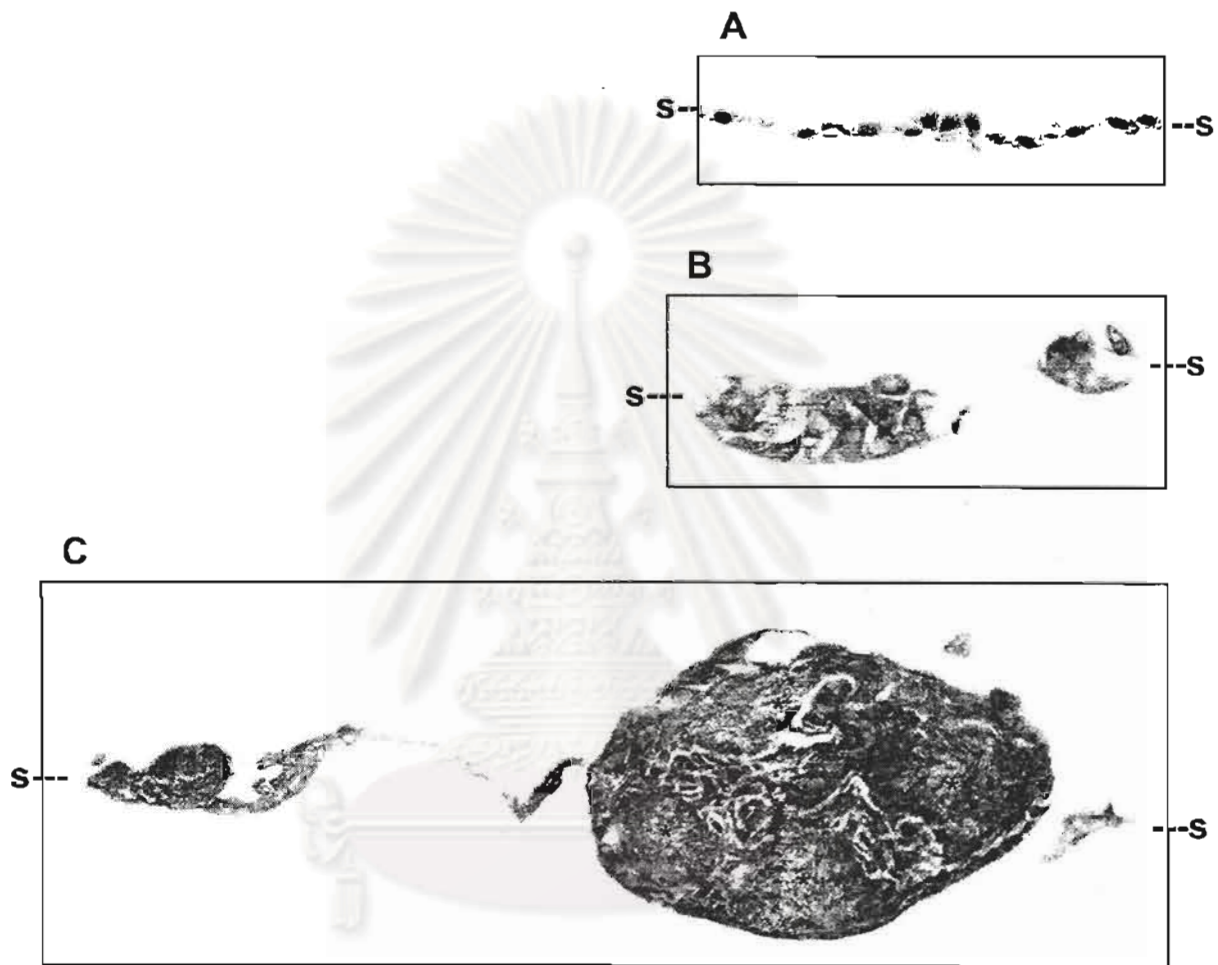
HSC-6

HSC-7

Coll
I
gelColl
I
dryColl
IV
dryNo
Coll

รูปที่ 6 ภาพแสดงการเรียงตัวของเซลล์ HSC-3, 6 และ 7 ในมิติของความลึกบนคอลลาเจนชนิดที่ I เจล ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง section ของเซลล์บนคอลลาเจนชนิดที่ I เจลถูกย้อมด้วย Hematoxilin-Eosin เพื่อนำมาศึกษาลักษณะที่ปรากฏด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 132 เท่า โดยในภาพเซลล์จะวางตัวอยู่ตอนบนและคอลลาเจนเจลอยู่ตอนล่างของภาพ (A) HSC-3, พบเซลล์มีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) ต่อเนื่องกันบนผิวคอลลาเจนเจลโดยตลอด (B) HSC-6 พบเซลล์มีการเรียงตัวเป็นกลุ่มก้อน มีการซ้อนตัวของเซลล์หลายชั้น และแต่ละกลุ่มของเซลล์จะอยู่ห่างกันและไม่เรียงตัวเชื่อมต่อกันในแต่ละกลุ่ม พบมีเมทริกซ์นอกเซลล์แทรกอยู่ระหว่างชั้นของตัวเซลล์ (C) HSC-7 พบเซลล์มีการเรียงตัวเป็น 2 กลุ่มก้อน เล็กและใหญ่ มีการซ้อนตัวของเซลล์หลายชั้น และแต่ละกลุ่มของเซลล์จะอยู่ห่างกันและไม่เรียงตัวเชื่อมต่อกันในแต่ละกลุ่ม ในภาพนี้จะเห็นส่วนของคอลลาเจนที่ย้อมติดสีชัดเจน เชื่อมต่อระหว่างกลุ่มเซลล์ ทำให้เห็นชัดเจนว่าขอบล่างของกลุ่มก้อนเซลล์ขนาดใหญ่ได้แทรกลงไปต่ำกว่าระดับผิวของคอลลาเจนเจล (S) นอกจากนี้พบมีเมทริกซ์นอกเซลล์แทรกอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์ภายในกลุ่มก้อนเซลล์นี้ในปริมาณที่มากและและครอบคลุมพื้นที่ เห็นได้ชัดเจน (*) ในขณะที่ตัวเซลล์พบอยู่ใจกลางกลุ่มก้อนเซลล์นี้และทอดตัวอยู่เป็นขอบโดยรอบกลุ่มก้อนเซลล์ใหญ่

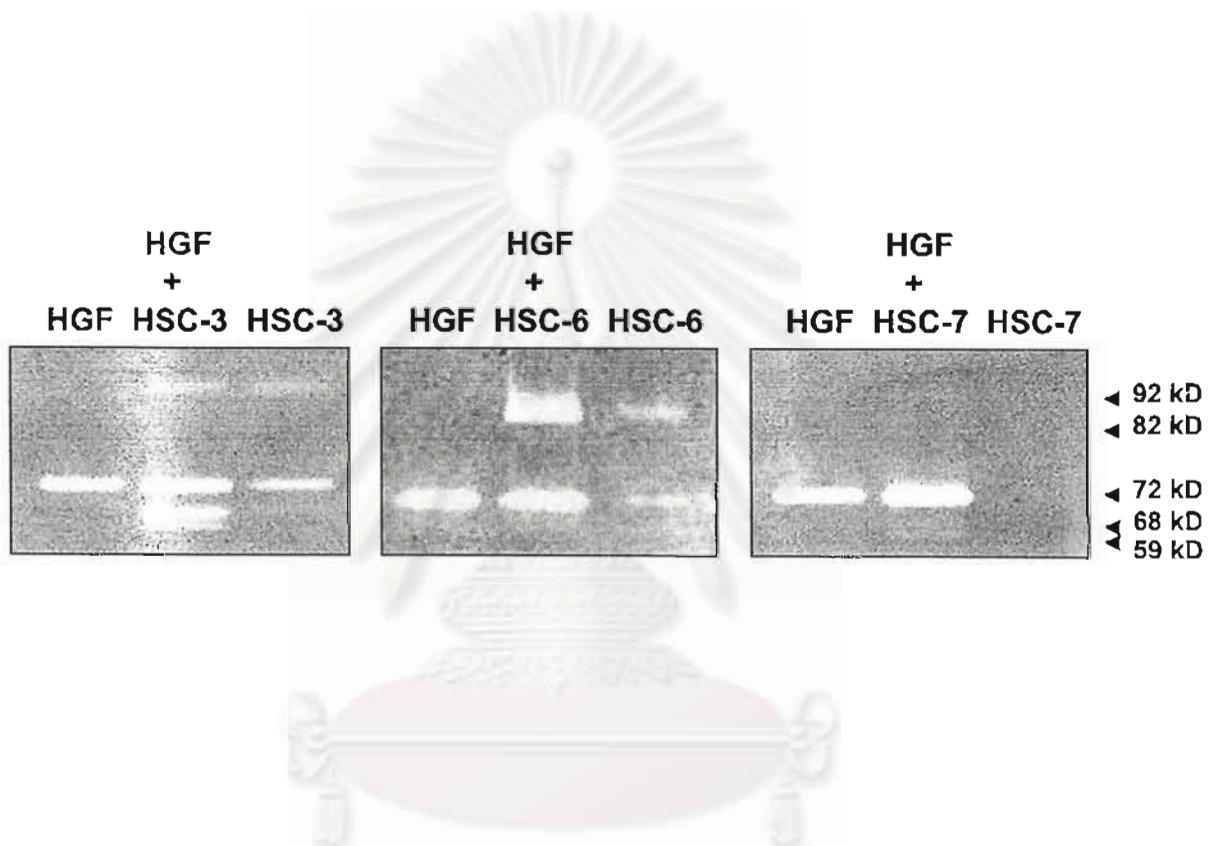
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 วิเคราะห์จากอาหาร
เลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก HSC-3, 6 หรือ 7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยง
เซลล์ที่ไม่มีซีรัม หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลเทนท์) และ 82 kD (แอคทีฟ),
และ MMP-2 ที่ 72 kD (เลเทนท์), 68 kD (อินเตอร์มีเดียด) และ 59 kD (แอคทีฟ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 วิเคราะห์จากอาหาร
เลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมที่ได้จาก A, HSC-3, B, HSC-6 และ C, HSC-7 เมื่อเลี้ยงโดยล่ำฟงในงาน
เลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (□) หรือเลี้ยงร่วมกับ HGF โดยใช้ Transwell (○) เป็นเวลา 24
ชั่วโมง

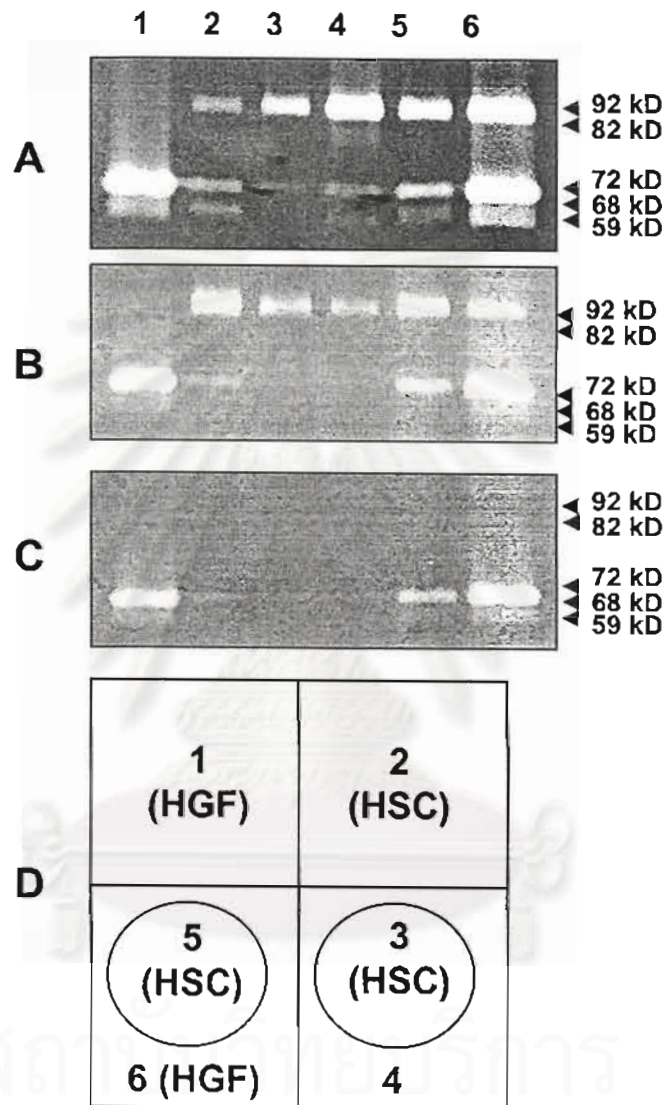
1, HGF บนงานเลี้ยงเซลล์

2, HSC บนงานเลี้ยงเซลล์

3, HSC ใน Transwell ที่วางในงานเลี้ยงเซลล์ (4) ที่ซึ่งมีเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ไม่มี
เซลล์ 5, HSC ใน Transwell ที่วางอยู่ในงานเลี้ยงเซลล์ที่มี HGF (6)

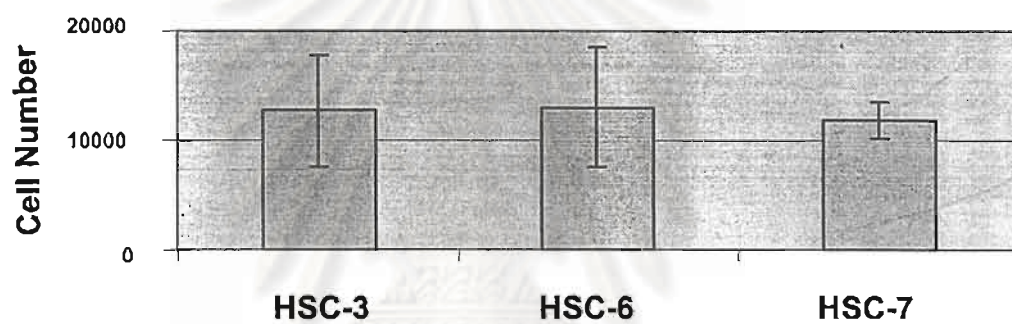
หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลแทนท์) และ 82 kD (แอกทีฟ), และ MMP-2 ที่
72 kD (เลแทนท์), 68 kD (อินเตอรัมีเดียต) และ 59 kD (แอกทีฟ) (D) แผนผังแสดงชนิดของเซลล์
และที่มาของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกนำมาวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ HSCs ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติก ภายหลังจากเซลล์ถูกถ่ายลงบนจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อศึกษาความสามารถในการเกาะของเซลล์ จำนวนเซลล์ถูกตรวจวัดโดยการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue ทำละลายสีที่ติดบนผิวเซลล์ แล้วนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 667 นาโนเมตร เทียบเป็นจำนวนเซลล์กับกราฟมาตรฐาน จำนวนเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่าง จะทำซ้ำ 3 หลุม

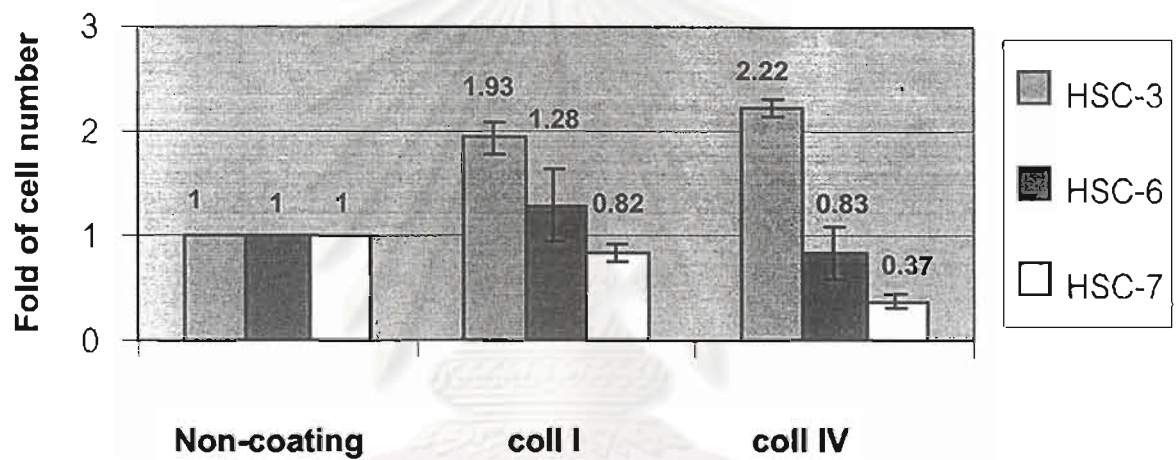
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 กราฟแสดงจำนวนเท่าของเซลล์ HSCs ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I และ IV เมื่อกำหนดให้จำนวน HSCs ที่เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติกของแต่ละเซลล์ไลน์เท่ากับ 1 เท่า จำนวนเท่าของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 หลุม

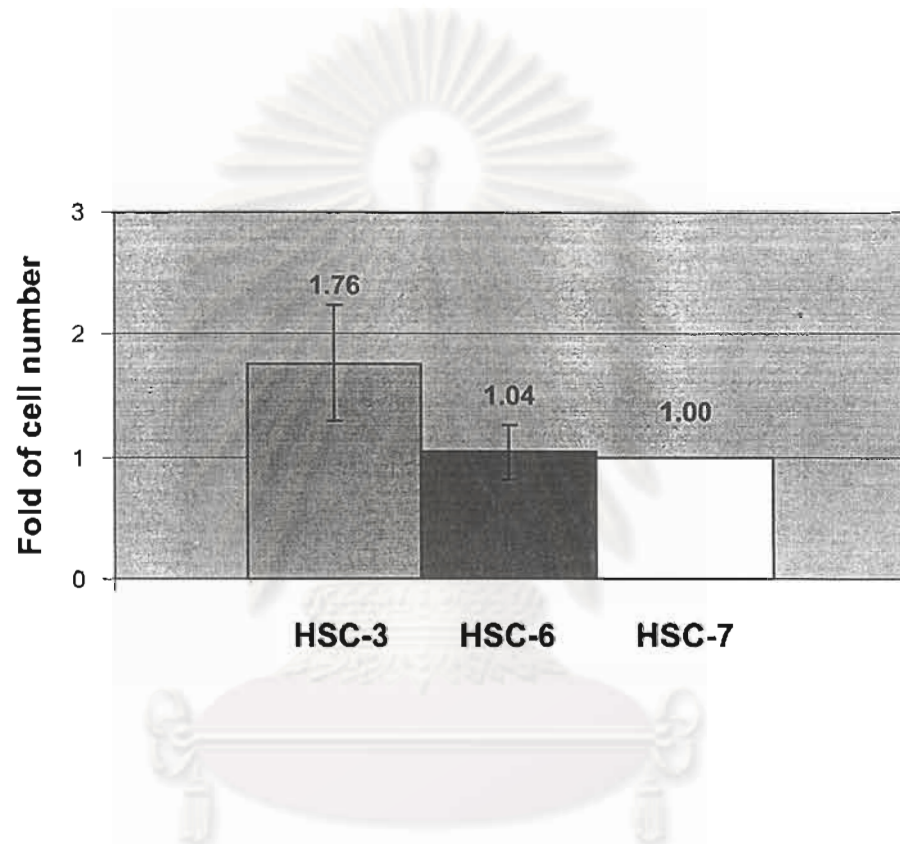
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 กราฟแสดงจำนวนเท่าของเซลล์ HSCs ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนेटที่ไม่ได้เคลือบด้วยคอลลาเจนจาก Upper chamber เข้าสู่ lower chamber ใน 48-well microchemotaxis chamber ในเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อกำหนดให้จำนวน HSC-7 ที่ เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอนेट เท่ากับ 1 เท่า จำนวนเท่าของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 หลุม บริเวณอย่างน้อย 4 บริเวณในแต่ละหลุมถูกสุ่มเพื่อใช้นับจำนวนเซลล์

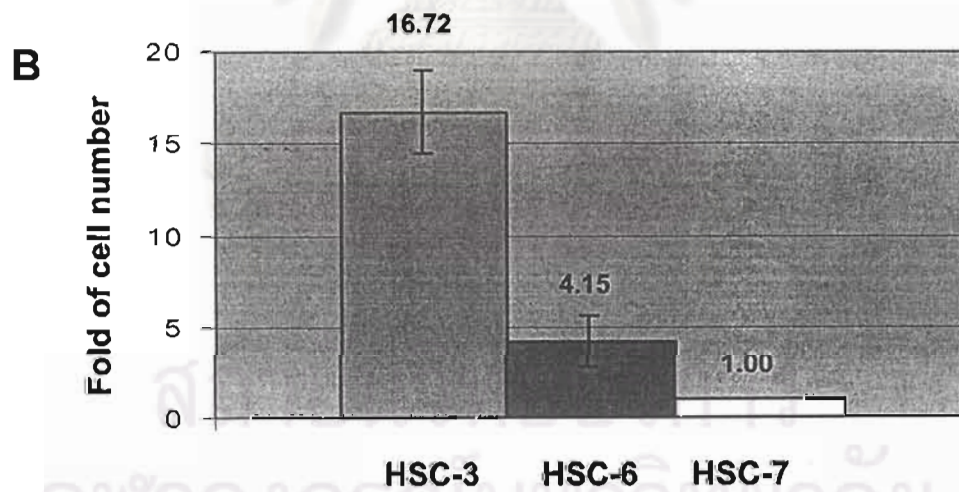
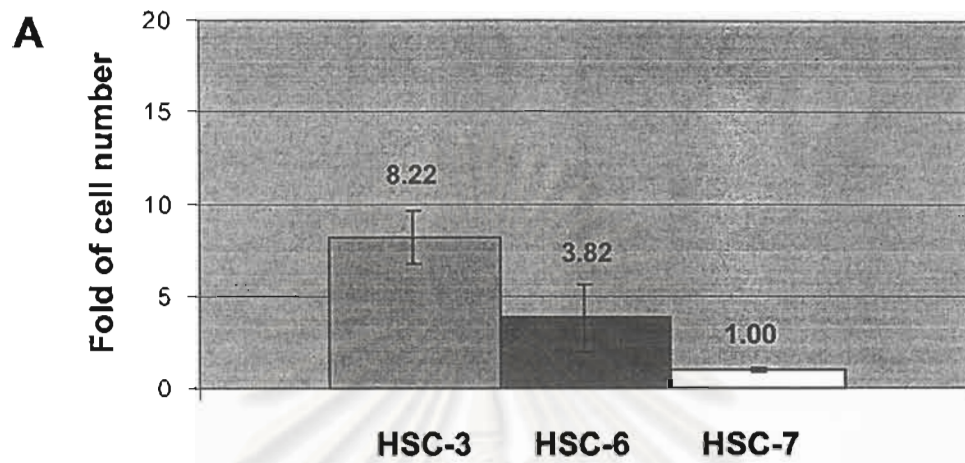
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 กราฟแสดงจำนวนเท้าของเซลล์ HSCs ที่เคลื่อนผ่านแผ่นโพลีคาร์บอเนตที่เคลือบด้วย คอลลาเจนชนิดที่ I (A) และ IV (B) จาก Upper chamber เข้าสู่ lower chamber ใน 48-well microchemotaxis chamber ในเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อกำหนดให้จำนวน HSC-7 ที่ เคลื่อนผ่าน แผ่นโพลีคาร์บอเนตเท่ากับ 1 เท้า จำนวนเท้าของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 หลุม บริเวณอย่างน้อย 4 บริเวณในแต่ละหลุม ถูกสุ่มเพื่อใช้นับจำนวนเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย