5281

การติดตามผลการทำลายเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นางสาว สิริเพ็ญ ทองปัสโน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-631-059-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17150140

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF ANTI - HEPATOMA MONOCLONAL ANTIBODIES ON HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Miss Siripen Thongpassano

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-059-3

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF ANTI - HEPATOMA MONOCLONAL ANTIBODIES ON HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Miss Siripen Thongpassano

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-059-3

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF ANTI - HEPATOMA MONOCLONAL ANTIBODIES ON HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA
By	Miss Siripen Thongpassano
Department	Programme Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kingkarn Laohathai, M.D., Ph.D.
Thesis Coadvisor	Miss Siripen Vethchagarun, M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree/

Santi Thoongsuwan
..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Sirirat Rengpipat
..... Chairman

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

K. Laohathai
..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Kingkarn Laohathai, M.D., Ph.D.)

Siripen Vethchagarun
..... Coadvisor

(Siripen Vethchagarun, M.Sc.)

Chitraporn Karnasuta
..... Member

(Chitraporn Karnasuta, M.D., Ph.D.)

Sathit Pichyangkul
..... Member

(Sathit Pichyangkul, Ph.D.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สิริเพ็ญ ทองปัสโน : การติดตามผลการทำลายเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF ANTI-HEPATOMA MONOCLONAL ANTIBODIES ON HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.พญ.กิ่งกาญจน์ เลาหทัย. อ.ที่ปรึกษาร่วม : นางสาวศิริเพ็ญ เวชชการัญย์. 120 หน้า. ISBN 974-631-059-3

โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับ จำนวน 9 ตัว ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีสัมพรรคภาพ ได้รับการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งตับ พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีหมายเลข 27 และ 43 ซึ่งใช้เซลล์มะเร็งตับ S102 และ HepG2 เป็นเซลล์ศึกษาสามารถทำลายเซลล์มะเร็งตับได้

โมโนโคลนัลแอนติบอดีหมายเลข 27 ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ต่อหนึ่งหมื่นเซลล์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งตับ S102 และ HepG2 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 62 และ 70 ในวันที่ 2 ตามลำดับ โมโนโคลนัลแอนติบอดีหมายเลข 43 ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ต่อหนึ่งหมื่นเซลล์ ให้ผลอัตราการรอดชีวิตต่อเซลล์มะเร็งตับ S102 และ HepG2 เท่ากับร้อยละ 78 และ 59 ในวันที่ 2 ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโมโนโคลนัลแอนติบอดีหมายเลข 43 เป็น 10 ไมโครกรัม ต่อหนึ่งหมื่นเซลล์ พบว่าสามารถให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ S102 เหลือเพียง 40% ในวันที่ 4

ลักษณะการทำลายเซลล์มะเร็งที่วิเคราะห์จากระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีหมายเลข 27 ทำให้เอ็นโดปลาสมิกเรตติคิวลัมชนิดไม่เรียบ มีจำนวนลดลงและไมโครวิลไลมีลักษณะหดสั้น ในเวลาเพียง 3 ชั่วโมงที่ได้รับแอนติบอดี และสังเกตไมโตคอนเดรียบวมอย่างชัดเจนหลังจาก 24 ชั่วโมง สำหรับโมโนโคลนัลแอนติบอดีหมายเลข 43 พบว่ามีผลทำให้ไมโตคอนเดรียบวมอย่างชัดเจนในวันที่ 2 และ 3 ที่ได้รับแอนติบอดี

ผลจากงานวิจัยนี้พิสูจน์ว่า โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับหมายเลข 27 และ 43 สามารถทำลายเซลล์มะเร็งตับได้ในระดับหนึ่ง

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C526584 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: HEPATOCELLULAR CARCINOMA/MONOCLONAL ANTIBODY/IMMUNOELECTRON MICROSCOPY
SIRIPEN THONGPASSANO : ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF ANTI-HEPATOMA MONOCLONAL ANTIBODIES ON HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA
THESIS ADVISOR : ASSIS. PROF. KINGKARN LAOHATHAI, M.D., Ph.D.,
THESIS CO-ADVISOR : MISS SIRIPEN VETHCHAGARUN, M.Sc., 120 pp. ISBN 974-631-059-3

Nine of anti-hepatoma monoclonal antibodies (anti-hep MAbs) were purified by affinity chromatography and tested for the tumoricidal effect. From this series, the MAb #27 and #43 were selected for further study. The MAb #27 at ug per 1×10^4 cell showed the inhibition of proliferation on HCC-S102 and HepG2 cell with 62% and 70% viability on day 2 after treatment, respectively. The MAb #43 at 5 ug per 1×10^4 cell showed antitumor effect on HCC-S102 and HepG2 cell with 78% and 59% viability on day 2 after treatment, respectively. The MAb #43 at 10 ug per 1×10^4 cell showed antitumor effect on HCC-S102 cell with 40% viability on day 4 after treatment.

Morphologic studies showed that MAb #27 had early effect direct to rough endoplasmic reticulum. The number of ribosome were decreased after 3 hours of treatment. Mitochondria was swollen and the number was parallely decreased. The MAb #43 had effect to the distorted and swollen mitochondria. Surface antigens of HCC-S102 cell recognized by anti-hepatoma MAb #27 were decreased after the treatment for 3 hours, which was found in cytoplasm. The number of these antigen still decreased until 12 hours after treatment. The antigen was totally can not found after treatment 24 hours until day 3.

The results from this study suggested that anti-hepatoma MAbs are effective to some hepatoma cells in pattern of time and dose dependent. The MAb #27 and #43 showed some different route of attaching, despite of the early attach to the protein transportation system.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express her deepest appreciation and grateful thank to her advisor, Assistant Professor Dr. Kingkarn Laohathai of the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering (IBGE), Chulalongkorn University and to her coadvisor, Miss Siripen Vethchagarun, Scientific and Technological Research Equipment Centre (STREC), Chulalongkorn University for her helpful guidances, suggestions, keen interest and continual encouragements throughout the course of this work.

The author is grateful to Dr. Chitraporn Karnasuta, Dr. Sirirat Rengpipat and Dr. Sathit Pitchayangul for serving as my committe and for their valuble discussions and suggestions.

The author would also like to thank the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for granting her partial financial support to conduct this investigation.

The author wish to thank Dr. Sathit Pitchayangul and Mr. Kosol Yongvanitchit of the Department of Immunology and Parasitology, Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS) for their kindness suggestion on flowcytometry technique.

The thesis can not be successful without support from all my friends, Mrs.Trongjan Pootong, Ms.Duangkae Nonsri, Ms. Varunee Dansitong, Ms. Saitong Janya, and Ms. Nutcharin Kechit. Thanks so much for all their enormous help and encouragement.

Finally, the author would also like to give extra special thanks to her parents, her sisters and brother for the financial support from the beginning, their love, understanding and cheerfulness through her graduate school.

TABLE OF CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

II. BACKGROUND.....5

III. MATERIALS AND METHODS.....36

IV. RESULTS.....54

V. DISCUSSION.....92

VI. CONCLUSION.....96

REFERENCES.....97

APPENDIX.....110

AUTHOR BIBLIOGRAPHY.....120

LIST OF FIGURES

Figure PAGE

1 Trends in the rates of motality from five major causes, Thailand, 1970-1989.....10

2 Leading cancers in Bangkok (1988-1990).....10

3 Leading cancers in Chiang Mai (1988-1990).....11

4 Leading cancers in Khon Kaen (1988-1990).....11

5 Leading cancers in Songkhla (1988-1990).....12

6 Leading cancers in Thailand (estimate), 1990.....13

7 Estimated number of new cancer cases in Thailand (1990)....14

8 Age-specific incidence rates of liver cancer-Male.....15

9 Age-specific incidence rates of liver cancer-Female.....16

10 The structure of antibody.....28

11 Affinity chromatography of anti-hepatoma MAb #27 using protein A-sepharose column.....57

12 Reactivity of anti-hepatoma MAb #27 on HCC-S102 cell lines as certained by ELISA method.....58

13 Reactivity of anti-hepatoma MAb #27 on HCC-S102 cell lines as certained by flowcytometry method.....60

14 The tumoriciddal effect of anti-hepatoma MAbs on HCC-S102 cell line. 62

15-16 The tumoricidal effect of anti-hepatoma MAb #27 on HCC-S102 cells was represented by %viability and % CGI.....64

17-18 The tumoricidal effect of anti-hepatoma MAb #43 on HCC-S102 cells was represented by %viability and % CGI.....66

19-20 The tumorcidal effect of anti-hepatoma MAb #27 on HepG2 cells was represent by % viability and %CGI.....68

21-22 The tumorcidal effect of anti-hepatoma MAb #43 on HepG2 cells was represented by %viability and %CGI.....70

23 The tumoricidal effect of NS-1 on HCC-S102 cells was represent by %viability and %CGI.....71

24 The tumoricidal effect of anti-hepatoma MAb #27 on HS-766T cells was represented by % viability and %CGI.....71

25 The comparison of tumoricidal effect of anti-hepatoma MAb #27 5μg/1x10^4 on HCC - S102 hepatoma cell.....73

26 The comparison of tumoricidal effect of anti-hepatoma MAb #27 10μg/1x10^4 on HCC - S102 hepatoma cell.....73

27-28 Electron micrograph show untreated HCC-S102 hepatoma cell.....78

29-30 Electron micrograph show untreated HepG2 hepatoma cell.....78

31-32 Electron micrograph show gold labelling of anti-hep MAb #27 treated HCC-S102 hepatoma cell.....80

33-40 Electron micrograph show anti-hep Mab # 27 treated HCC-S102 hepatoma cell.....81-84

41-45 Electron micrograph show anti-hep Mab # 43 treated HCC-S102 hepatoma cell.....85-87

46 Electron micrograph show anti-hep Mab # 27 treated HepG2 hepatoma cell.....87

47-54 Electron micrograph show anti-hep Mab # 43 treated HepG2 hepatoma cell.....88-91

LIST OF ABBREVIATIONS

Ab	Antibody
Ag	Antigen
ASMR	Age standardized mortality rate
BSA	Bovine serum albumin
c	Degree celcius
cm	Centrimeter
CR	Crude rate
ELISA	Enzyme - linked immunosorbent assay
EM	Electron microscope
et al.	Et alii
FCS	Fetal calf serum
gm	Gram
HBs	Hepatitis B
HCC	Hepatocellular carcinoma
hr	Hour
L	Litre
M	Molar
MAb	Monoclonal antibody
µg	Microgram (10^{-6})
µl	Microlitre
ml	Milliliter
mg	Milligram (10^{-3})

min	Minute
MW	Molecular weight
ng	Nanogram (10^{-9})
nm	Nanometer
no.	Number
#	Number
OD	Optical density
ODA	Oncofetal development antigen
/	Per
%	Percent (parts per 100); percentage
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffer saline
rpm	Revolution per minute
TAA	Tumor associated antigen
TSA	Tumor specific antigen
UV	Ultraviolet light
VA	Veronal acetate
V/V	Volume by volume
W/V	Weight by volume