



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

อิทธิพลของการสัมผัสและสารหลังระหว่างเซลล์
ในเซลล์เหงือกและเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์
(HSC-7) ต่อพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลง
เมทริกซ์เมเทโลโปรทีเนสของเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

นिरชา สารชวณะกิจ

ประสิทธิ์ ภาวสันต์

อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

กันยายน 2548

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

อิทธิพลของการสัมผัสและสารหลั่งระหว่างเซลล์ ในเซลล์เหงือกและเซลล์มะเร็ง
ชนิดสแควมัสเซลล์ (HSC-7) ต่อพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลง
เมทริกซ์เมทิลโปรตีนของเซลล์

Influence of cell to cell contact and cell secretion between gingival fibroblast
and HSC-7 (oral squamous carcinoma cell line) on cell behaviors and

MMP modulation

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โดย

นรีชา สารชวณะกิจ ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และ อาทิตพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

กันยายน 2548

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วย รวมทั้งขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ โดยเฉพาะขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วันดี อภินทรมิต หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ในการทำงานวิจัย และท้ายที่สุด ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	อิทธิพลของการสัมผัสและสารหลังระหว่างเซลล์ ในเซลล์เหงือกและเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ (HSC-7) ต่อพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงเมทริกซ์เมทาโลโปรทีเนสของเซลล์
ผู้วิจัย	นیرชา สารชวณะกิจ ประสริทธิ์ ภวสันต์ และ อาทิพันธ์ุ พิมพ์ขาวขำ
เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ	กันยายน 2548

บทคัดย่อ

เอนไซม์ MMP-2 เป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง การทดลองครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็ง HSC-7 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของช่องปาก และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก ในแง่ของการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด ทั้งทางตรง และทางอ้อม การทดลองศึกษาผลทางอ้อม โดยการใช้เลี้ยงเซลล์เหงือกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารหลังจากเซลล์มะเร็ง และเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารหลังจากเซลล์เหงือก ส่วนผลทางตรง จะทำการศึกษา 2 วิธี ในวิธีแรก จะเตรียมเฉพาะส่วนผนังเซลล์จากเซลล์ทั้งสองชนิด และนำไปใช้กระตุ้นเซลล์อีกชนิดหนึ่ง และวิธีที่สองเป็นการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดในงานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมที่มี 2 หน้า (Transwell) โดยเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดคนละด้านของหลุม 2 หน้าดังกล่าว ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารหลังจากเซลล์อีกชนิดหนึ่ง รวมทั้งการกระตุ้นเซลล์ด้วยผนังเซลล์ของเซลล์อีกชนิดหนึ่งนั้น ไม่มีผลต่อปริมาณ และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 คงมีเพียงการเลี้ยงในหลุม 2 ด้านเท่านั้นที่ส่งผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ส่วนการศึกษาผลของการเคลื่อนที่ของเซลล์ จะทำในเครื่องมือสำหรับศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ (48-well microchemotaxis chamber apparatus) และพบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์เหงือกสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์มะเร็งสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เหงือก จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่า สารหลังจากเซลล์เหงือก และเซลล์มะเร็ง สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์อีกชนิดหนึ่งให้เข้ามาใกล้กันได้ แต่ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในขณะที่การสัมผัสกันของเซลล์ที่ยังมีชีวิต สามารถเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งกลไกดังกล่าวนี้ อาจเป็นกลไกสำคัญในการกระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของช่องปาก

Project Title	Influence of cell to cell contact and cell secretion between gingival fibroblast and HSC-7 (oral squamous carcinoma cell line) on cell behaviors and MMP modulation
Name of Investigators	Neeracha Sanchavanakit, Prasit Pavasant and Artiphan Pimkhaokham
Year	September 2005

Abstract

MMP-2 has been considered to be an important enzyme for tumor metastasis. In this study, we investigated the interaction between HSC-7, oral squamous carcinoma cell line, and HGF (human gingival fibroblast) in terms of MMP-2 and MMP-9 modulation, MMP-2 activation and cell migration. We studied both direct and indirect interactions between these two cell types. For the indirect interaction, we cultured HGF with the conditioned medium from HSC-7 and vice versa. For direct interaction, we prepared the cell membrane extract from one cell type and applied to culture of the other, and vice versa. We also cultured both cells in the transwell, an apparatus that allows cells to be grown on each side of the membrane, and contact each other through the membrane pore. The results indicated that transferring of the conditioned medium and application of membrane extract could either activate or modulate the levels of MMP-2 and MMP-9. However, cells cultured on the transwell clearly showed the MMP-2 activation by gelatin zymography. For migration assay, we used 48-well microchemotaxis chamber. The results showed that conditioned medium from HGF could induce HSC-7 migration and vice versa. These results suggested that conditioned medium contained the ability to induce cell migration towards each other without effect on MMP-2 activation. In addition, direct cell contact in the living cells could induce MMP-2 activation. These mechanisms might be one of the important steps in the process of oral squamous cell migration and metastasis.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	9
ผลการวิจัย	20
วิเคราะห์ผลการวิจัย	27
สรุป	32
เอกสารอ้างอิง	33



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ภาพจาก Gelatin zymography แสดงระดับ MMP-2 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากอีกเซลล์หนึ่ง	39
รูปที่ 2	ภาพแสดงระดับ mRNA ของ MT1-MMP, TIMP-2 และ GAPDH ในเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากอีกเซลล์หนึ่ง	40
รูปที่ 3	ภาพแสดงระดับของโปรตีน MT1-MMP วิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot ในเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากอีกเซลล์หนึ่ง	41
รูปที่ 4	กราฟแสดงระดับของโปรตีน TIMP-2 (ng/ml) วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากอีกเซลล์หนึ่ง	41
รูปที่ 5	ภาพจาก Gelatin zymography แสดงระดับ MMP-2 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HGF ที่ได้รับยา Mitomycin C และได้รับสารหลังจากเซลล์ HSC-7	42
รูปที่ 6	ภาพจาก Gelatin zymography แสดงระดับ MMP-2 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับเยื่อหุ้มเซลล์สกัดจากอีกเซลล์หนึ่ง	43
รูปที่ 7	ภาพจาก Gelatin zymography แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ และ ภาพแสดงระดับ mRNA ของ MT1-MMP, TIMP-2, MMP-2, MMP-9 และ GAPDH ที่ได้จากการเลี้ยง HSC-7 ร่วมกับ HGF	44
รูปที่ 8	ภาพแสดงระดับของโปรตีน MT1-MMP วิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot ที่ได้จากการเลี้ยง HSC-7 ร่วมกับ HGF	45
รูปที่ 9	กราฟแสดงระดับของโปรตีน TIMP-2 (ng/ml) วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยง HSC-7 ร่วมกับ HGF	45
รูปที่ 10	ภาพจาก Gelatin zymography แสดงระดับ MMP-2 และ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ และ ภาพแสดงระดับ mRNA ของ MT1-MMP, TIMP-2, MMP-2, MMP-9 และ GAPDH ที่ได้จากการเลี้ยง HSC-7 ร่วมกับ HGF ใน Transwell	46
รูปที่ 11	กราฟแสดงความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากอีกเซลล์หนึ่ง	47
รูปที่ 12	กราฟแสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากอีกเซลล์หนึ่ง	48

บทนำ

มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ (Squamous cell carcinoma) เป็นมะเร็งในช่องปาก ที่พบมากเป็นอันดับที่ 1 ในประชากรไทย มะเร็งชนิดนี้ เป็นมะเร็งที่มีการพยากรณ์โรคไม่ดี (Poor prognosis) ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มะเร็งชนิดนี้มีความสามารถในการแทรกตัวไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ดี รวมทั้งมีอุบัติการณ์ของการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะที่อยู่ห่างออกไปสูง ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูง (Slootweg et al., 1996; Vokes et al., 1993; Zbaren and Lehmann, 1987)

มะเร็งเป็นพยาธิสภาพที่เซลล์ในร่างกายมีอัตราการแบ่งตัวที่ผิดปกติ จนทำให้มีการขยายขนาดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะในบริเวณนั้น ซึ่งอาจรบกวนการทำงานของอวัยวะข้างเคียง การเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมาก อาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของกลไกที่ควบคุมการแบ่งตัว (Dictor et al., 1999; Roussel et al., 1996; Sherr, 1996) หรือกลไกที่ควบคุมการตายของเซลล์ (Hogarty, 2003; Nefedova et al., 2003) โดยความผิดปกติของกลไกการควบคุมทั้งสองนี้ อาจเกิดขึ้นในสองลักษณะ คือ จากการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมของเซลล์ (Dictor et al., 1999; Hogarty, 2003) หรือจากการเหนี่ยวนำโดยเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง

ในการเหนี่ยวนำโดยเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงนี้อาจเป็นการเหนี่ยวนำจากเซลล์มะเร็งด้วยกันเอง (Rahimi et al., 1996) หรืออาจเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Stromal cells) ที่อยู่รอบๆ (Hauptmann et al., 2003; Johnson et al., 1998; Kijima et al., 2002; Nefedova et al., 2003; Tokuda et al., 2003)

สำหรับการเหนี่ยวนำอันเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งและ Stromal cells นั้น สามารถเกิดขึ้นได้ใน 2 ทิศทาง ทั้งจากการที่เซลล์มะเร็งเหนี่ยวนำ Stromal cells หรือในทางกลับกัน ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ทั้งนี้กลไกที่เซลล์ใช้ แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ เกิดขึ้นจากการสัมผัสกันระหว่างเซลล์สองชนิด หรือเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ชนิดหนึ่งได้รับเพียงสารหลังจากเซลล์อีกชนิดหนึ่ง โดยไม่มีการสัมผัสของเซลล์ (Alessandro and Kohn, 2002)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์นี้ มีส่วนสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในมะเร็ง
 หลากๆชนิดเช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ มะเร็งกล้ามเนื้อลาย และ มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น
 (Brooks et al., 1997; Cooper et al., 2003; Li et al., 2003; Libura et al., 2002; Parrott et al.,
 2001)

มีรายงานถึงการเหนี่ยวนำ Stromal cells ที่อยู่บริเวณขอบของก้อนมะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งหลั่ง
 Transforming growth factor beta (TGF- β) ทำให้ Stromal cells ซึ่งปกติเป็น Fibroblast เปลี่ยนเป็น
 Myofibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะร่วมของ Fibroblast และ Smooth muscle cell และมีความ
 สามารถหลั่งสารที่มีคุณสมบัติเป็น Pro-invasive signal ย้อนกลับมากระตุ้นเซลล์มะเร็งให้เคลื่อนที่
 และเกิดการแพร่กระจายในที่สุด นอกจากนี้ Myofibroblast ยังสร้าง N-cadherin ซึ่งส่งเสริมให้ทั้ง
 myofibroblast และเซลล์มะเร็ง แพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มมากยิ่งขึ้น (De Wever and
 Mareel, 2002; De Wever and Mareel, 2003) สำหรับมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่พบในช่องปาก มี
 รายงานถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ ในการชักนำให้มีการเคลื่อนของเซลล์มะเร็งไปสู่ต่อมน้ำเหลือง
 บริเวณคอ ซึ่งเป็นผลของการจับกันของ chemokine ชนิดหนึ่ง ซึ่งสร้างขึ้นจาก Stromal cells และ
 Receptor ที่มีอยู่ที่เซลล์มะเร็ง (Uchida et al., 2003)

สำหรับกลไกในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้น ต้องอาศัยกระบวนการย่อยสลายเนื้อเยื่อ
 เกี่ยวพันที่อยู่รอบก้อนมะเร็ง ร่วมกับการเคลื่อนตัวของเซลล์มะเร็งผ่านบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ถูกย่อย
 สลาย (Stetler-Stevenson et al., 1993) ซึ่งเริ่มจากการที่เซลล์มะเร็งจะย่อยทำลายและเคลื่อนตัวผ่าน
 Basement membrane ที่อยู่ติดเซลล์มะเร็ง แล้วจึงเคลื่อนตัวไปสู่ต่อมน้ำเหลือง หรืออวัยวะที่อยู่ห่าง
 ออกไป โดยผ่านไปกับกระแสเลือด ซึ่งการผ่านเข้าและออกจากกระแสเลือดของเซลล์มะเร็งนั้น
 เซลล์มะเร็งจะต้องแทรกตัวผ่านเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial cells) และ Basement membrane
 ของหลอดเลือดด้วย นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix; ECM)

ที่พบในระหว่างการเคลื่อนที่ด้วย (Curran and Murray, 2000; Stetler-Stevenson et al., 1993; Timar et al., 2001)

เมทริกเมทัลโลโปรทีเนส (Matrix metalloproteinases; MMPs) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย ECM ได้ครอบคลุมทุกชนิด รวมทั้งคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 80 ของโปรตีนใน ECM ของร่างกาย และจากการที่คอลลาเจนนั้นไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยProteinases ในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้น MMP จึงเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง (Curran and Murray, 2000; John and Tuszynski, 2001; Timar et al., 2001) จนถึงปัจจุบันพบมีเอนไซม์อยู่ในกลุ่มนี้กว่า 20 ตัว โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จะถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่ยังไม่พร้อมทำงาน (Latent form) ในสภาวะปกติ และต้องการการกระตุ้นโดยการตัด Pro-peptide domain ออก รวมทั้งต้องการ Zinc ion ที่ตำแหน่ง Catalytic domain จึงจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน (Active form) ซึ่งในระหว่างกระบวนการกระตุ้นการทำงานนี้ อาจพบเอนไซม์ในรูป Intermediate ซึ่งมีการตัด Propeptide ไปแล้วบางส่วนได้ (Curran and Murray, 2000; John and Tuszynski, 2001; Nelson et al., 2000; Timar et al., 2001)

เอนไซม์ MMP ในกลุ่มเจลาติเนส (Gelatinases) ซึ่งประกอบด้วย MMP-2 (Gelatinase A) และ MMP-9 (Gelatinase B) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ 4 (Type IV collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ Basement membrane และการทำลาย Basement membrane นั้นเป็นขั้นตอนแรกในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง มีรายงานพบมีการเพิ่มการสร้างและระดับการทำงานที่สูงขึ้นในรอยโรคมะเร็งหลายๆชนิดรวมทั้งในมะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ด้วย ทั้งนี้พบว่าระดับของ MMP-2 และ MMP-9 ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของรอยโรคในด้านความสามารถในการแพร่กระจาย (Katori et al., 2002; Kawamata et al., 1998; Kusukawa et al., 1993; Nelson et al., 2000; O-chareonrat P et al., 2001; Tokumaru et al., 2000) อย่างไรก็ตาม

MMP อื่นๆ ก็พบมีความเกี่ยวเนื่องในบางขั้นตอนของการลุกลามของโรคมะเร็งด้วย (Chambers and Matrisian, 1997)

ผลจากการศึกษาโดยใช้ตัวยับยั้ง (specific inhibitor) MMI-166 ที่มีความจำเพาะต่อ MMP-2 และ MMP-9 ทดสอบในเซลล์ไลน์จากมะเร็งตับอ่อน (Matsushita et al., 2001) และ มะเร็งลำไส้ (Ohta et al., 2001) พบว่าตัวยับยั้งสามารถลดอัตราการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการเจริญ (Tumor growth) ของก้อนมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ในสัตว์ทดลองด้วย (Katori et al., 2002) ผลการทดลองดังกล่าว สนับสนุนบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นอย่างดี

MMP-2 ยังมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเอนไซม์ MMP อื่นๆ คือกลไกการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แตกต่างจาก MMP อื่นๆ รวมทั้ง MMP-9 โดยต้องการ MMP บนผิวเซลล์ หรือ Membrane type MMP (MT-MMP) เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางจนถึงปัจจุบัน ถูกเสนอโดย Strongin และคณะในปี 1995 โดยพบว่า Latent MMP-2 (72 kDa) จะยึดกับเซลล์โดยยึดเกาะผ่านไปกับ MT-MMP ที่อยู่บนผิวเซลล์ และมีโมเลกุลของ Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) ซึ่งปกติทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานจำเพาะของ MMP-2 ร่วมเกาะอยู่ด้วย โดย Latent MMP-2 จะยึดกับส่วนของโมเลกุล TIMP-2 เกิดเป็น Tri-molecular complex จากนั้น บางส่วนของ Propeptide domain ของ Latent MMP-2 จะถูกตัดออกโดย MT-MMP อีกตัวหนึ่งที่อยู่ใกล้เคียงบนผิวเซลล์ เกิดเป็น Intermediate MMP-2 (68 kDa) และส่วนของ Propeptide domain ที่เหลืออยู่ใน Intermediate MMP-2 จะหลุดออกไปทั้งหมดโดยอัตโนมัติ ได้เป็น Active MMP-2 (59 kDa) ซึ่งเอนไซม์ในรูป Active MMP-2 นี้เท่านั้นที่สามารถทำการย่อยสลายสารตั้งต้นต่างๆของเอนไซม์ได้ โดยที่เอนไซม์ในรูป Intermediate ไม่มีความสามารถนี้ (Strongin et al., 1995)

ส่วนการกระตุ้นการทำงานของ MMP อื่นๆ นั้น จะเกิดโดยอาศัยเอนไซม์กลุ่ม Serine proteinases ตัด Propeptide domain ออก เพื่อกลายเป็น Active MMP (Curran and Murray, 2000; Nelson et al., 2000)

ในการศึกษามะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอ (Head and neck squamous cell carcinoma) จากชิ้นเนื้อมะเร็งที่ตัดได้จากผู้ป่วย พบการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 และ MMP-9 ทั้งในระดับของ อาร์เอ็นเอเข้ารหัส (mRNA) โปรตีน รวมทั้งระดับของ Enzymatic activity โดยมีความสัมพันธ์กับระดับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง (Kurahara et al., 1999; Kusukawa et al., 1993; O-charonrat P et al., 2001) แม้จะมีรายงานที่แสดงถึงความสำคัญของ MMP-2 และ MMP-9 ในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง แต่จำนวนของการศึกษาในเรื่องนี้ยังมีอยู่น้อย และยังไม่มีความชัดเจนมากนัก

ดังที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากในธรรมชาติ เซลล์มะเร็งมีได้โดยลำพัง แต่จะอยู่ที่ท่ามกลางเซลล์ปกติของร่างกายทั้งที่เป็นเซลล์หลักของอวัยวะนั้น (Parenchymal cells) และ Stromal cells การศึกษาในมะเร็งหลายๆชนิด พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ ที่เกิดขึ้นจากการได้รับสารหลัง หรือจากการสัมผัสกันของเซลล์นั้น ส่งเสริมการสร้าง MMP-2 หรือกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เช่น เมื่อเลี้ยง MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดไม่รุนแรงร่วมกับ Fibroblast ที่ได้จากเนื้อเยื่อในบริเวณใกล้เคียง พบว่าการสัมผัสระหว่างเซลล์ ทำให้โปรตีนบนผิวเซลล์ของ MCF-7 เหนี่ยวนำให้มีการสร้าง MMP-2 เพิ่มขึ้นใน Fibroblast ในขณะที่สารหลังจาก MCF-7 กระตุ้นการสร้าง MMP-1 และ MMP-3 (Ito et al., 1995) ส่วนการเลี้ยงเซลล์มะเร็งของ Proximal tubule จากไตร่วมกับ Fibroblast ที่ได้จากบริเวณเดียวกัน พบว่าเซลล์ของ Proximal tubule หลัง Growth factors เช่น TGF-beta1 และ PDGF-AB ซึ่งส่งเสริมให้มีการแบ่งตัว เพิ่มการสร้างคอลลาเจน และการสร้าง MMP-2 และ MMP-9 ใน Fibroblast (Johnson et al., 1998) นอกจากนี้ พบว่า Interleukin-6 ที่สร้างโดย Bone marrow stromal cell ตอบสนองต่อ Interleukin-6 receptor alpha บน Myeloma cell โดยส่งเสริมให้มีการสร้าง MMP-1 และ MMP-2

เพิ่มขึ้น ในรอยโรค Multiple myeloma (Barille et al., 2000) สำหรับเซลล์มะเร็งของต่อมลูกหมากเมื่อเลี้ยงร่วมกับ Fibroblast จะเพิ่มการสร้าง MMP-9 ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และ ลดการสร้าง TIMP-1 และ TIMP-2 ใน Fibroblast ซึ่งเป็นผลจากสารหลังจากเซลล์ โดยไม่จำเป็นต้องมีการสัมผัสกันของเซลล์ทั้งสองชนิด (Dong et al., 2001) ในขณะที่มะเร็งชนิดสแควร์มีเซลล์ของศีรษะและลำคอ เมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งร่วมกับ Skin fibroblast จะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้โดยอ้อม จากการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP บนผิวเซลล์มะเร็ง (Sato et al., 1999)

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยเองที่ผ่านมา (Sanchavanakit, 2003a) พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควร์มีเซลล์ 3 ชนิด ที่ได้จากช่องปากของมนุษย์ (Human squamous cell carcinoma) คือ HSC-3 HSC-6 และ HSC-7 ร่วมกับเซลล์เหงือกของมนุษย์ (Human gingival fibroblast; HGF) จะมีผลกระตุ้นการทำงานของ MMP ในกลุ่ม Gelatinases; MMP-2 และ MMP-9 ได้ โดยพบว่า HSC-3 หรือ HSC-7 ที่เลี้ยงร่วมกับ HGF ในหลุมเลี้ยงเซลล์เดียวกันที่เซลล์สัมผัสกันโดยตรง ส่งเสริมให้ latent MMP-2 ถูกเปลี่ยนให้เป็น active แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกัน โดยเลี้ยง HSC ใน Transwell ซึ่งมีลักษณะเป็น removable chamber insert ที่สวมลงในจานเลี้ยงเซลล์ ซึ่งที่พื้นของ Transwell จะเป็นแผ่น membrane ที่มีรูขนาดเล็กพอให้สารหลังจากเซลล์สามารถผ่านเข้าออกได้ แล้ววาง Transwell ลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มี HGF เลี้ยงอยู่ที่ก้นหลุม เพื่อให้การสื่อสารระหว่างเซลล์ที่เกิดขึ้นเกิดขึ้นจากสารหลังจากเซลล์ที่ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในลักษณะนี้ไม่พบมี active MMP เกิดขึ้น

อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า ผลการทดลองข้างต้นอาจจะไม่ถูกต้องสมบูรณ์ทั้งหมด เนื่องจากข้อจำกัดบางประการของการใช้ Transwell เช่น จากการที่เซลล์ใน Transwell มีความหนาแน่นมาก ทำให้มีความเป็นไปได้ที่สารหลังบางชนิดจากภายใน Transwell ไม่สามารถเคลื่อนลงสู่ Lower chamber หรือเคลื่อนที่ในทิศทางกลับกันจาก Lower chamber เข้าสู่ Upper chamber ทำให้สัดส่วนของสารหลังที่เซลล์ชนิดหนึ่งได้รับไม่เป็นไปในสัดส่วนเดียวกันกับที่เซลล์อีกชนิดหนึ่งสร้างขึ้น สังเกตได้

จากระดับ MMP-2 และ MMP-9 ที่เซลล์หลัง ไม่เข้าสู่สมดุล ระหว่างใน Transwell กับใน Lower chamber (Sanchavanakit, 2003a) ดังนั้นเซลล์ทั้งสองชนิดจึงไม่ได้อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันอย่างแท้จริง

นอกจากนี้ ผลที่ได้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากลไกที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น อาศัยเพียงการสัมผัสกันระหว่างเซลล์ หรือต้องการสารบางชนิดที่หลังจากเซลล์เข้ามาประกอบ

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะทำการศึกษาต่อเพื่อให้เกิดความชัดเจนถึงกลไกที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็ง หรือในเซลล์ HGF ใน 2 สภาวะ คือ

1. เมื่อเซลล์ไลน์ของมะเร็ง หรือเซลล์ HGF ได้รับเพียงสารหลังจากเซลล์ HGF หรือจากเซลล์ไลน์ของมะเร็งตามลำดับ
2. เมื่อเกิดเพียงการสัมผัสกันระหว่างเซลล์ไลน์ของมะเร็ง และเซลล์ HGF

นอกเหนือจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 แล้ว ไม่อาจปฏิเสธได้ว่ายังมีความเป็นไปได้ที่ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้ จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่จะส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีความรุนแรงมากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ จะทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของสารหลังจากเซลล์ไลน์ของมะเร็ง หรือจากเซลล์ HGF ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การหลั่งเอนไซม์ Gelatinases ตลอดจนความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ ในเซลล์ HGF หรือในเซลล์ไลน์ของมะเร็ง ตามลำดับ โดยจะเลือกศึกษาในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ HSC-7 ซึ่งมีระดับการหลั่ง MMP-2 และ MMP-9 ต่ำ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิด active MMP-2 ได้ (Sanchavanakit, 2003b) เนื่องจากจะทำให้เกิดความชัดเจนของผลการทดลอง หากเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกหรือระดับของการหลั่งเอนไซม์ Gelatinases ซึ่งจะเพิ่มความเข้าใจธรรมชาติของเซลล์ไลน์ชนิดนี้ในสภาวะที่มีปฏิสัมพันธ์กับ Stromal cell คือเซลล์ HGF ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งในการอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในการแพร่กระจายของ

เซลล์มะเร็งในช่องปาก และเป็นข้อมูลพื้นฐาน ที่จะนำไปพัฒนาแนวทางและวิธีการตัดขวางและป้องกัน
การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระดับของการรักษาต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ (human squamous carcinoma; HSC-7) และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ (human gingival fibroblast; HGF)

เซลล์ไลน์ HSC-7 เตรียมได้จากชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของผู้ป่วย และได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Teruo Amagasa, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan สำหรับเซลล์ Fibroblast จากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ (HGF) เตรียมจากชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วย 6 คน ที่มาถอนฟันกรามซี่สุดท้ายที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฟันที่ถอนนั้นเนื่องจากการจัดฟันหรือเป็นฟันคุดโดยไม่มีอาการอักเสบของฟันหรือเหงือก ชิ้นเนื้อเหงือกที่ติดอยู่กับคอฟันที่ถูกถอนจะถูกตัดออกมาเพาะเลี้ยงตามวิธีที่เคยรายงานไว้แล้ว (Sanchavanakit, 2003a) และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-5

เซลล์ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10% ซีรัมจากฟิตัลของวัว (Fetal Bovine Serum; FBS) กลูตามีน (L-Glutamine) 2mM เพนนิซิลลิน (Penicillin) 100U/ml สเตร็ปโตไมซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate) 100 μ g/ml และแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) 0.25 μ g/ml โดยอาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดจะได้จาก GibcoBRL (NY, USA) เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่มีความชื้น อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($^{\circ}$ C) และมี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ การขยายจำนวนเซลล์จะทำการถ่ายเซลล์ (Subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:5 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารหลังจาก HSC-7 และ HGF

เซลล์ HSC หรือ HGF จะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm จำนวน 10 จาน ที่ความหนาแน่น 10,000 เซลล์/cm² โดยจะมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 80% โดยอาหาร

เลี้ยงเซลล์มี 10% FBS เลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม (Serum free medium; SFM) ปริมาตร 3 ml เลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นดูดเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละจานเลี้ยงเซลล์รวมกันแล้วนำไปแยกส่วนของเศษเซลล์ที่อาจปะปนมาออกด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง แยกส่วนใส่ออกไปเก็บที่อุณหภูมิ - 20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

3. การกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังจากเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ไม่มีซีรัม

เซลล์ HSC-7 หรือ HGF ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/หลุม เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์โดยวิธี MTT และจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม สำหรับจะนำไปสกัด RNA และโปรตีน โดยเลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น SFM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดลอง ในการทดลองเซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยง HGF และ HSC-7 มาแล้ว ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิคเจลลาดินไซโมกราฟี (Gelatin zymography) และตัวเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการแบ่งตัว นำไปสกัด RNA และโปรตีน เพื่อวิเคราะห์ระดับของยีนและโปรตีนที่สนใจต่อไป ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

4. การสร้าง Feeder layer

เพื่อเป็นการตรวจสอบผลของการสัมผัสกันของ HSC-7 และ HGF จึงใช้ Mitomycin C ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแบ่งตัว และ ยับยั้งการสร้างโปรตีนใหม่ของเซลล์ (Sadeghi et al., 1998) กระตุ้น HSC-7 หรือ HGF โดยหวังผลให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นอยู่ในสภาวะที่นิ่ง และมี Activity ต่ำสุด เพื่อให้ผลการตอบสนองที่จะเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ HGF หรือเซลล์ HSC-7 ปกติ ที่ไม่ได้รับยา น่าจะเกิดขึ้นจากการสัมผัสกับโปรตีนที่มีอยู่แล้วบนผิวเซลล์ การทดลองทำโดยหว่านเซลล์ลงในจานเลี้ยง

เซลล์ และเมื่อเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์แล้ว แบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม กระตุ้นเซลล์ด้วย Mitomycin C ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 3, 5 และ 7 นาที (Hu et al., 2000; Sadeghi et al., 1998; Woo et al., 1997) แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายด์ (Phosphate buffer saline; PBS) จะได้ feeder layer ของเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เพื่อใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของการสัมผัสของเซลล์เมื่อเซลล์ HGF หรือเซลล์ HSC-7 ปกติ ที่ไม่ได้รับยาตามลำดับ ที่จะถูกหวนทาบลงไป เพื่อที่จะได้ทราบว่าระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่อาจเปลี่ยนแปลงไป ตลอดจนการกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่อาจเกิดขึ้น เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ร่วมกันนั้น เป็นผลมาจากการสัมผัสโดยตรงของเซลล์หรือไม่ และโดยเซลล์ตัวใด ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

5. การสกัดแยกเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ HSC-7 และ HGF

เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ HSC-7 และ HGF เตรียมขึ้นเพื่อนำไปทดสอบการกระตุ้นการเกิด Active MMP-2 ที่อาจเกิดขึ้นโดยตรงจากเพียงการสัมผัสกับโปรตีนที่มีอยู่แล้วบนผิวเซลล์ดังกล่าว เมื่อนำไปใส่ให้กับเซลล์ HGF และ HSC-7 ตามลำดับ ทั้งนี้จะได้ไม่มีผลในทางอ้อมอันอาจเนื่องมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่เกิดจากความมีชีวิตของเซลล์

การเตรียมทำโดยเลี้ยงเซลล์ HSC หรือ HGF ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm จำนวน 10 จาน เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS จนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นประมาณ 80% จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น SFM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์โดยการขูดเซลล์โดยใช้แผ่นยางสำหรับขูดเซลล์ (Rubber policeman) แล้วนำเซลล์จากทั้ง 10 จานมารวมกัน แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมด้วยเครื่องปั่นแยกที่ 1000g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C จากนั้นเติม SFM ใหม่ลงไป พร้อมกับเติม cocktail proteinase inhibitors แล้วนำเซลล์ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator ที่ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 15 วินาที พัก 15 วินาที 5 ครั้ง

ภายหลังการ sonicate นำไปปั่นที่ 3000 g 10 นาที ที่ 4°C เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่แตก Nucleus และ Organelles ที่มีขนาดใหญ่ออกไปก่อน จากนั้นนำเฉพาะสารละลายส่วนบนปั่นแยกเยื่อหุ้มเซลล์ออกจากส่วนที่เหลืออื่นๆของเซลล์อีกครั้ง ด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูงที่ 100,000g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4°C ตะกอนที่ได้คือส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ ซึ่งนำไปละลายใน SFM ก่อนที่จะนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ BCA kit แล้วแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ (Ko et al., 2000)

6. การกระตุ้น HSC-7 หรือ HGF ด้วยเยื่อหุ้มเซลล์

เซลล์ HSC-7 หรือ HGF ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/หลุม จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด SFM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเยื่อหุ้มเซลล์สกัดของ HSC-7 ลงในเซลล์ HGF และเติมเยื่อหุ้มเซลล์สกัดของ HGF ลงในเซลล์ HSC-7 ที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่าง 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค Gelatin zymography ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

7. การเลี้ยงเซลล์ HSC-7 และ HGF ร่วมกัน

เซลล์ HSC-7 และ HGF ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/หลุม เมื่อใช้เซลล์เพียงชนิดเดียว ส่วนหลุมที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกันทั้งสองชนิดจะถ่ายเซลล์แต่ละชนิดจำนวน 25,000 เซลล์ลงในหลุมเดียวกัน เพื่อวิเคราะห์ผลของการเลี้ยงร่วมกันต่อความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์โดยวิธี MTT สำหรับการสกัด RNA และโปรตีน จากเซลล์ เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม โดยหลังจากถ่ายเซลล์ลงในหลุม ที่ความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม จะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็น SFM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดลอง โดยในการทดลอง เซลล์จะถูกเลี้ยงใน SFM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค Gelatin zymography และตัวเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์

ความสามารถในการแบ่งตัว นำไปสกัด RNA และโปรตีน เพื่อวิเคราะห์ระดับของยีนและโปรตีนของ MT1-MMP และ TIMP-2 ต่อไป ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

8. การเลี้ยงเซลล์ใน Transwell โดยให้มีการสัมผัสกันของเซลล์ HSC-7 และ HGF

Transwell (Nunc, IL, USA) ที่มีลักษณะเป็นหลุมที่สามารถถอดเข้าออกได้ (Removable well) และสามารถสวมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยมีส่วนของขาเล็กๆ 3 จุดที่สัมผัสกับก้นหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ทำให้ก้นหลุมของ Transwell มีระยะห่างและไม่สัมผัสกับก้นหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ก้นหลุมของ Transwell เป็นแผ่น Membrane ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $0.02 \mu\text{m}$ ซึ่งเป็นขนาดมาตรฐานที่เล็กพอที่เซลล์ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถลอดผ่านได้ แต่สารต่างๆจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์สามารถผ่านเข้าออกได้ ปกติจะนำมาใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ในลักษณะที่เซลล์ไม่สัมผัสกัน โดยการถ่ายเซลล์ชนิดหนึ่งไว้ใน Transwell ในขณะที่เซลล์อีกชนิดหนึ่งจะถูกถ่ายลงที่ก้นหลุม

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้จะทำการประยุกต์โดยต้องการให้เซลล์สัมผัสกัน แต่สามารถแยกชนิดของเซลล์ออกได้ภายหลังเสร็จสิ้นการทดลองเพื่อนำไปสกัดแยก RNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละชนิดของเซลล์ ซึ่งไม่สามารถทำได้ถ้าเลี้ยงให้เซลล์สัมผัสกันแบบเลี้ยงในหลุมเดียวกัน การประยุกต์ทำโดยคว่ำ Transwell ก่อน แล้วถ่าย HSC-7 ลงไป 25,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะ จากนั้นหงาย Transwell ขึ้น แล้วถ่าย HGF ลงไป 10,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS เลี้ยงต่อไปในตู้เลี้ยงเซลล์อีก 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น SFM เลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค Gelatin zymography และตัวเซลล์จะถูกนำไปสกัด RNA เพื่อวิเคราะห์ระดับของยีนที่สนใจต่อไป สำหรับกลุ่มควบคุมจะมีเพียงเซลล์ชนิดเดียวถูก

ถ่ายลงใน Transwell ในฝั่งเดียวกันกับในกลุ่มทดลอง ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

9. การวิเคราะห์ระดับการหลั่งและรูปแบบที่พร้อมทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ด้วยเทคนิค Gelatin zymography

อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gelatin zymography ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ในเจลที่มีความเข้มข้น 10% Acrylamide และ 0.1% Gelatin โดย Gelatin จะเป็น Substrate สำหรับเอนไซม์ MMP-2 เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว เจลจะถูกล้างด้วยสารละลาย 2.5% TritonX-100 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 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจึงย้อมเจลด้วยสารละลาย 0.5% Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, MO, USA) ในสารละลายผสมของ 40% Methanol และ 10% Acetic acid เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายผสมของ 5% Methanol และ 7.5% Acetic acid บริเวณที่มีเอนไซม์ MMP-2 จะปรากฏเป็นแถบใสบนเจลสีน้ำเงิน ตำแหน่งของเอนไซม์ MMP-2 บนเจลจะตรวจสอบกับระดับของเอนไซม์ MMP-2 ที่หลั่งจากเซลล์ไลน์ U2Os ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งของกระดูกของมนุษย์ (Human osteosarcoma cell line) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก (Positive control) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gelatin zymography เซลล์ไลน์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Associate Professor Erik W. Thompson, St. Vincent's Institute of Medical Research, Melbourne, Australia

10. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

RNA จากเซลล์จะถูกเตรียมโดยใช้ TRI-reagent (MRC, OH, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตแล้วนำไปสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian myeloblastosis virus; Promega, WI, USA) และ oligo dT primer (Promega, WI, USA) ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 นาที

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ (polymerase chain reaction: PCR) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนในแต่ละรอบดังนี้ Initial denaturation, Denaturation, Annealing และ Extension โดยการใช้สาย Primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence) ของ MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-2 และใช้สาย Primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (Internal control) ของการทดลอง จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยกระบวนการ PCR แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของยีน สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ของแต่ละยีนที่ศึกษา สามารถตรวจสอบได้จาก GenBank ผ่านทาง website ของ National Institute of Health (NIH)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 2% Agarose gel

11. การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวเซลล์ (Cell lysate) โดยใช้ชุด BCA

ในกรณีที่ต้องการวัดระดับโปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้น โปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวเซลล์ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยชุดวัดระดับโปรตีน BCA (Pierce) ดังขั้นตอนโดยย่อต่อไปนี้ ภายหลังจากที่เซลล์ HSC-7 และ HGF ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจากเซลล์ หรือจากการเลี้ยงร่วมกัน อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกดูดออกแล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เซลล์และ ECM จะถูกทำลายด้วยสารที่ใช้สกัดโปรตีนจากเซลล์ RIPA จากนั้นแบ่งออกส่วนหนึ่งออกมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุด BCA โดยทำตามข้อแนะนำของ

ผลิตภัณฑ์จากทางบริษัท ปริมาณโปรตีนจะถูกเปรียบเทียบกับค่าโปรตีนมาตรฐานที่วัดจากโปรตีน Albumin ที่ทราบความเข้มข้น

12. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคเวสเทิร์น (Western analysis)

ปริมาณโปรตีนที่เท่ากันจากแต่ละกลุ่มทดลอง ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ชุด BCA จะถูกแยกด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นโปรตีนจะถูกถ่ายลงบนแผ่น PVDF แล้วย้อมด้วย แอนติบอดีปฐมภูมิ (Primary antibody) ต่อโปรตีน MT1-MMP จากนั้นจึงย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) ที่ติดสลากรด้วย Biotin และตรวจทดสอบโดยการบ่มแผ่น PVDF ในสารละลาย Streptavidin ติดสลากรด้วยเอนไซม์ Peroxidase แล้วจึงเคลือบแผ่น PVDF ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบ เคมี (Chemiluminescence detection system) เพื่อตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (Auto-fluorography) จากนั้น PVDF แผ่นเดิมนั้นจะถูกย้อมอีกครั้งด้วย Primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน Actin แล้วตามด้วยขั้นตอนต่างๆ เช่นเดียวกับในรอบแรก ทั้งนี้เนื่องจาก Actin เป็นโปรตีนที่มักไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ เมื่อมีสิ่งมากระตุ้น ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวควบคุมและเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่นำมา วิเคราะห์ให้เท่ากัน

13. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคอีไลซ่า (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)

อิทธิพลของสารหลังจากเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน TIMP-2 ถูกวิเคราะห์ด้วย เทคนิค ELISA (R&D) ดังขั้นตอนโดยย่อดังนี้ HSC-7 และ HGF จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี Phenol red (Phenol red-free DME medium) ตลอดการทดลอง เพื่อกำจัดการรบกวนของสีในขั้นตอน การวัดการดูดกลืนแสงของเทคนิคนี้ จากนั้น ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยสารหลังจากเซลล์หรือการเลี้ยง ร่วมกัน นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยบริษัท โดยอาศัยหลักการที่ว่า ในหลุมของ ELISA plate จะถูกเคลือบผิวไว้ด้วย Antibody ที่มีความจำเพาะกับ

TIMP-2 จากนั้น อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บหลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้น จะถูกนำมาเติม พร้อมกับ Antibody ตัวที่ 2 ที่มีความจำเพาะกับ TIMP-2 เช่นเดียวกัน แต่คนละตำแหน่ง (Epitope) กับ Antibody ตัวแรก และปลายอีกด้านหนึ่งต่ออยู่กับ Biotin ซึ่งจะต่อกับตัวแสดงสัญญาณต่อไป ดังนั้น TIMP-2 ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะจับกับ Antibody ทั้งสองตัวและถูกดึงมาติดที่ก้นหลุม จากนั้น Antibody ตัวที่ 2 และโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออก แล้วเติม Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin ซึ่งจะไปจับกับ Biotin จากนั้นเติมสารตั้งต้น (Substrate) ของ Peroxidase ก็จะทำให้เกิดเป็นสารละลายสีขึ้น แล้วนำสารละลายที่มีสีนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะคำนวณกลับมาเป็นปริมาณโปรตีนต่อไป จากนั้นปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จะถูกเปรียบเทียบเป็นปริมาณโปรตีนต่อ จำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค MTT แล้วจึงนำเสนอเป็นกราฟต่อไป

14. การศึกษาความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์โดยวิธี MTT

อิทธิพลของสารหลังจากเซลล์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จะวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT ดังขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ภายหลังจากที่เซลล์ HSC-7 และ HGF ได้รับการกระตุ้นดังที่กล่าวไว้ข้างต้นมา อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกดูดออกแล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (Thiazolyl blue, Sigma, MO, USA) ลงใน Phenol red-free medium ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 mg/ml ใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง ทำการดูดสารละลาย MTT ออก แล้วทำละลายผลิตภัณฑ์ม่วงเข้มของ Formazan ด้วยสารละลายผสมระหว่างไกลซีนบัฟเฟอร์ (Glycine buffer) และ DMSO (Dimethylsulfoxide, Merck, Darmstadt, Germany) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในปริมาตร 1 ml จะได้สารละลายสีม่วง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 570 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาจำนวนเซลล์จากกราฟมาตรฐาน ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

กราฟมาตรฐานทำขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยวิธีข้างต้น ค่าที่ได้จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ทราบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสง

15. การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์

การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้ 48-well microchemotaxis chamber assay (Neuroprobe, Cabin John, MD, USA) ซึ่งมีลักษณะเป็น Multi well culture chamber โดยแต่ละ chamber จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนด้วยแผ่นโพลีคาร์บอเนตที่ปราศจากโพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone-free polycarbonate filter) ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $8\ \mu\text{m}$ กั้นอยู่ตรงกลางความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์พิจารณาจากจำนวนเซลล์ใน Upper chamber ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate ไปสู่อีกด้านของแผ่นในฝั่งของ Lower chamber ซึ่งเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก HSC-7 หรือ HGF เพื่อดึงดูดให้เกิดการเคลื่อนที่ของ HGF หรือ HSC-7 ผ่านลงมาใน Lower chamber ตามลำดับ

วิธีการศึกษา เซลล์จะถูกทำให้หลุดจากจานเลี้ยงเซลล์เดิมด้วยสารละลาย 0.2 mg/ml EDTA ใน PBS และถูกพักอยู่ใน SFM เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ก่อน เพื่อให้ Receptor บนผิวเซลล์กลับคืนสู่สภาพปกติพร้อมที่จะใช้ในการยึดเกาะ จากนั้นถ่ายเซลล์ที่มีความหนาแน่น 1,000,000 เซลล์/ml ที่อยู่ใน SFM แต่มี 0.1% Bovine serum albumin (BSA) $56\ \mu\text{l}$ ลงใน Upper chamber แล้วเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นจึงแยกเอาแผ่น Polycarbonate มาตรึง (fix) ด้วย 4% Formaldehyde เป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้อมด้วย Hematoxylin จากนั้นย้อม (mount) แผ่น Polycarbonate ด้านที่หันเข้าหา Lower chamber ที่มีเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate ออกมานี้ไว้บนแผ่นสไลด์กระจก (glass slide) ส่วนเซลล์ที่ไม่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate ที่อยู่ด้านตรงข้ามจะถูกเขี่ยออกด้วยสำลี สัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate จะคำนวณ

โดยใช้โปรแกรม Scion Image การทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 4 หลุม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

การแลกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ชนิดหนึ่งไปยังอีกเซลล์อีกชนิดหนึ่งไม่ทำให้เกิด

Active MMP-2

โดยปกติ HGF จะหลั่ง Latent MMP-2 ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 72kDa และไม่หลั่งเอนไซม์ MMP-9 (92kDa) ส่วน HSC-7 จะหลั่งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 เฉพาะในรูป Latent ในระดับที่ต่ำมาก ทำให้บางครั้งอาจปรากฏหรือไม่ปรากฏเมื่อทำการวิเคราะห์ระดับการหลั่งของเอนไซม์ทั้งสองนี้โดยเทคนิค Gelatin zymography ในรูปที่ 1A จะพบว่า ในเวลา 24 ชั่วโมง กรณีที่มีเพียงเซลล์ HGF พบแต่ Pro MMP-2 ส่วนในสารหลั่งที่ได้จาก HSC-7 และจะนำมาเติมให้กับเซลล์ HGF นั้น พบ Pro MMP-2 ในระดับที่ต่ำมากๆและไม่พบ MMP-9 เมื่อนำสารหลั่งจาก HSC-7 มาเติมให้กับเซลล์ HGF ไม่พบการเหนี่ยวนำให้เกิด Active MMP-2 (59kDa) แต่อย่างไรก็ตาม ในทางกลับกัน ในรูปที่ 1B กรณีที่มีเพียงเซลล์ HSC-7 ไม่สามารถตรวจพบระดับ MMP-2 และ MMP-9 ส่วนสารหลั่งจาก HGF ที่นำมาเติมให้กับเซลล์ HSC-7 นั้น ก็พบเฉพาะ Pro MMP-2 และเมื่อนำสารหลั่งจาก HGF มาเติมให้กับ HSC-7 ก็ไม่พบการเหนี่ยวนำให้เกิด Active MMP-2 เช่นกัน

การแลกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ชนิดหนึ่งไปยังอีกเซลล์อีกชนิดหนึ่งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Active MMP-2

การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของระดับยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Active MMP-2 ถูกวิเคราะห์จาก RNA จากโปรตีนรวมที่สกัดจากเซลล์ (Total cell lysate) รวมทั้งโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Conditioned medium) ภายหลังจากที่เซลล์ HGF และ HSC-7 ได้รับการแลกเปลี่ยนสารหลั่งจากอีกเซลล์หนึ่ง โดยถูกกระตุ้นด้วยสารหลั่งดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ HGF เมื่อได้รับสารหลั่งจากเซลล์ HSC-7 มีระดับการแสดงออกของยีนของ MT1-MMP เพิ่มขึ้น อย่างชัดเจน

วิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR (รูปที่ 2A) แต่ระดับโปรตีนซึ่งวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot กลับไม่เปลี่ยนแปลง โดยจะเห็นว่าแถบของโปรตีน MT1-MMP ที่เกิดขึ้นมีขนาดและความหนาใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เปรียบเทียบกับระดับของ Actin โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงระดับภายในเซลล์ ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายในเพื่อแสดงระดับที่เท่ากันของโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ (รูปที่ 3A) ส่วนระดับการแสดงออกของ TIMP-2 ไม่เปลี่ยนแปลงทั้งในส่วนของยีน (รูปที่ 2A) และโปรตีน (รูปที่ 4A) โดยในส่วนของโปรตีนนั้นวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA ซึ่งนำเสนอในรูปแบบของกราฟแสดงปริมาณ TIMP-2 ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก HSC-7 ก่อนจะนำมาเติมให้กับ HGF (HSC-7 CM) ประมาณ 1.75 ng/ml ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจาก HGF ที่เลี้ยงโดยไม่ได้รับ HSC-7 CM มี TIMP-2 เฉลี่ย 6.5 ng/ml และเมื่อ HGF ได้รับ HSC-7 CM แล้วในอาหารเลี้ยงเซลล์มีระดับ TIMP-2 เฉลี่ย 9 ng/ml ซึ่งประมาณเท่ากับผลรวมของปริมาณที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์กับปริมาณที่เซลล์สร้างอยู่แล้วปกติ จึงถือว่าการแสดงออกของโปรตีน TIMP-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ส่วนในกรณีที่เซลล์ HSC-7 ได้รับสารหลังจากเซลล์ HGF พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน MT1-MMP อย่างชัดเจน (รูปที่ 2B) ในขณะที่ระดับโปรตีนไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 3B) ส่วนระดับการแสดงออกของ TIMP-2 นั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระดับยีน (รูปที่ 2B) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนเช่นกัน (รูปที่ 4B) โดยระดับของ TIMP-2 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA นั้น กราฟแสดงปริมาณ TIMP-2 ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก HGF CM ก่อนจะนำมาเติมให้กับ HSC-7 (HGF CM) ประมาณ 10.5 ng/ml ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจาก HSC-7 ที่เลี้ยงโดยไม่ได้รับ HGF CM มี TIMP-2 เฉลี่ย 0.312 ng/ml และเมื่อ HSC-7 ได้รับ HGF CM แล้วมีระดับ TIMP-2 เฉลี่ย 10.5 ng/ml ซึ่งก็ประมาณเท่ากับผลรวมของปริมาณที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์กับปริมาณที่เซลล์สร้างอยู่แล้วปกติ จึงถือว่าการแสดงออกของโปรตีน TIMP-2 ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน

เยื่อหุ้มเซลล์สกัดไม่เหนียวนำไปเกิด Active MMP-2

การเตรียมเซลล์ HSC-7 หรือ HGF เพื่อใช้สำหรับเป็น Feeder layer ให้กับเซลล์อีกตัวหนึ่ง สลับกัน โดยเทคนิคที่ใช้ยา Mitomycin C ซึ่งหวังผลให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นอยู่ในสภาวะที่นิ่ง และมี Activity ต่ำสุด เพื่อให้ผลการตอบสนองที่จะเกิดขึ้นเมื่อนำเซลล์ HSC-7 หรือ HGF ที่เคยได้รับยามาเลี้ยงร่วมกับ เซลล์ HGF หรือ HSC-7 ที่ไม่ได้รับยาตามลำดับ น่าจะเกิดขึ้นจากการสัมผัสกับโปรตีนที่มีอยู่แล้วบนผิว เซลล์ แต่พบว่าไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ดังผลการวิเคราะห์พฤติกรรมในด้านการสร้างและ กระตุ้นเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ HGF โดยเทคนิค Gelatin zymography ดังแสดงในรูปที่ 5 เซลล์ HGF ที่ไม่ได้รับยา เมื่อไม่ได้รับหรือได้รับสารหลังที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HSC-7 (HSC-7 CM) ซึ่งเป็น กลุ่มควบคุม (แถวที่ 1 และ 2) ไม่พบเปลี่ยนแปลงของการหลังและกระตุ้นเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งสอดคล้อง กับผลการทดลองในรูปที่ 1A ในขณะที่เมื่อเซลล์ HSC-7 ได้รับยาในทุกๆ Treatment มีระดับการหลัง เอนไซม์ MMP-2 ลดลงเล็กน้อย และมี Active MMP-2 เกิดขึ้นเล็กน้อย เมื่อทดลองกระตุ้นเซลล์ที่ได้รับยา ด้วย HSC-7 CM กลับมีระดับ Active MMP-2 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (แถวที่ 3 ถึง 8)

เทคนิคการกระตุ้นเซลล์ด้วยเยื่อหุ้มเซลล์สกัดจึงถูกนำมาใช้ทดแทน เพื่อเลียนแบบสภาวะที่ เซลล์สัมผัสกับโปรตีนที่มีอยู่แล้วบนผิวเซลล์อีกชนิดหนึ่ง (เยื่อหุ้มเซลล์สกัด, cell membrane extract) พบว่าเมื่อใส่เยื่อหุ้มเซลล์สกัดของ HSC-7 ซึ่งไม่ปรากฏว่ามีเอนไซม์ MMP-2 อยู่เลย (รูปที่ 6A แถวที่ 3) ลงไปในเซลล์ HGF ซึ่งในสภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นมีการหลัง Pro MMP-2 ในระดับหนึ่ง (รูปที่ 6A แถวที่ 1) เมื่อเติมเยื่อหุ้มเซลล์สกัดจาก HSC-7 ให้กับเซลล์ HGF แล้วพบว่าไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ เอนไซม์ MMP-2 ที่หลังออกมา และไม่กระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 (รูปที่ 6A แถวที่ 2)

ในทางกลับกันเมื่อใส่เยื่อหุ้มเซลล์สกัดของ HGF ซึ่งมีปริมาณ Pro และ Active MMP-2 อยู่ใน ระดับหนึ่ง (รูปที่ 6B แถวที่ 3) ลงไปในเซลล์ HSC-7 ซึ่งในสภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นมีปริมาณเอนไซม์ MMP-2 อยู่ต่ำมาก (รูปที่ 6B แถวที่ 1) พบว่าเมื่อเติมเยื่อหุ้มเซลล์สกัดของ HGF ให้กับเซลล์ HSC-7 แล้ว ระดับ

Pro และ Active MMP-2 ปรากฏมีปริมาณเท่ากับที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์สกัดของ HGF อยู่ก่อนแล้ว และไม่กระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 แต่อย่างใด (รูปที่ 6B แถวที่ 2)

การสัมผัสของ HSC-7 และ HGF ทำให้เกิด Active MMP-2

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าลำพังสารหลังจากเซลล์ ตลอดจนการสัมผัสพื้นผิวของเซลล์อีกชนิดหนึ่ง ไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ผลที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ 2 ชนิดในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตและมีการสัมผัสกัน น่าจะนำไปสู่การเกิด Active MMP-2

การทดลองในส่วนต่อมาจึงทำการเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดในหลุมเลี้ยงเซลล์เดียวกัน (Co-culture) ซึ่งเซลล์จะสัมผัสกันโดยตรง พบว่าการสัมผัสกันของเซลล์ในลักษณะนี้กระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ดังแสดงในรูปที่ 7A ซึ่งวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้เทคนิค Gelatin zymography โดยในแถวที่ 1 แสดงอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ U2Os ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมบวกแสดงตำแหน่ง Pro MMP-9 (92kDa) และ Pro MMP-2 (72kDa) ในแถวที่ 2 ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง พบการหลังของ Pro MMP-2 อย่างชัดเจน ส่วนแถวที่ 4 ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HSC-7 ที่เลี้ยงโดยลำพัง พบการหลังของ Pro MMP-9 และ Pro MMP-2 เล็กน้อย ในขณะที่แถวที่ 3 ซึ่งได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดร่วมกัน พบมี Active MMP-2 เกิดขึ้นอย่างชัดเจน แต่ระดับของ Pro MMP-9 ที่พบกลับลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้

จากนั้นระดับการแสดงออกของ MT1-MMP และ TIMP-2 ทั้งในระดับของยีน และโปรตีน ถูกวิเคราะห์ โดยพบการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP ในเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกันทั้งในระดับของยีน (รูปที่ 7B) และโปรตีน (รูปที่ 8) เมื่อเทียบกับการแสดงออกของเซลล์แต่ละชนิดที่เลี้ยงโดยลำพัง สำหรับ TIMP-2 ในเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกัน พบว่าระดับการแสดงออกอยู่ระหว่างการแสดงออกของ TIMP-2 ที่มากกว่าของ HGF และ น้อยกว่าของ HSC-7 ทั้งในระดับของยีน (รูปที่ 7B) และโปรตีน (รูปที่ 9) เมื่อเทียบกับการแสดงออกของเซลล์แต่ละชนิดที่เลี้ยงโดยลำพัง โดยระดับของ TIMP-2 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA นั้น กราฟ

แสดงปริมาณ TIMP-2 ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HGF เฉลี่ย 10 ng/ml จากเซลล์ HSC-7 ประมาณ 0.7775 ng/ml ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากการเลี้ยงเซลล์ร่วมกัน (Co-culture) เฉลี่ย 8 ng/ml

จากการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นที่ชัดเจนของตัวกระตุ้นการเกิด Active MMP-2 คือ MT1-MMP และ การลดลงของตัวยับยั้ง คือ TIMP-2 ในการเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดร่วมกัน อย่างไรก็ตาม การทดลองในส่วนนี้ยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าเพียงเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือทั้งสองเซลล์ที่ตอบสนองต่อการเลี้ยงร่วมกันและส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้

จึงนำมาสู่การออกแบบการทดลองโดยใช้ Transwell แบบประยุกต์ โดยเลี้ยงเซลล์ HSC-7 และ HGF ให้สัมผัสกันโดยใช้ Transwell ซึ่งเซลล์สามารถสัมผัสกันได้ผ่านทางรูพรุนบนแผ่น Membrane เท่านั้น ดังที่อธิบายไว้ในวิธีการทดลอง พบว่าการสัมผัสกันของเซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด Active MMP-2 และมีการลดลงของ Pro MMP-9 ในลักษณะเดียวกันกับที่เลี้ยงร่วมกันในหลุมเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 10A ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Gelatin zymography โดยในแถวที่ 1 ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง ที่ด้านบนของแผ่น Membrane ของ Transwell พบการหลั่งของ Pro MMP-2 ส่วนแถวที่ 3 ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HSC-7 ที่เลี้ยงโดยลำพัง ที่ด้านล่างของแผ่น Membrane ของ Transwell พบการหลั่งของ Pro MMP-9 และ Pro MMP-2 ในขณะที่แถวที่ 2 ซึ่งได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดร่วมกัน โดยที่ HGF อยู่ตอนบนและ HSC-7 อยู่ตอนล่างของ แผ่น Membrane ซึ่งพบมีระดับ Active MMP-2 เกิดขึ้นอย่างชัดเจน ประกอบกับระดับ Pro MMP-9 ที่ลดลงอย่างชัดเจนเช่นกัน มีข้อสังเกตว่าปริมาณ MMP-9 ที่หลั่งออกมา มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเซลล์บนหลุมเลี้ยงเซลล์ปกติ

ข้อดีของการใช้ Transwell แบบประยุกต์นี้คือ ทำให้สามารถวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ ยีน MT1-MMP และ TIMP-2 แยกตามชนิดของเซลล์ได้ เนื่องจากเซลล์อยู่คนละฝั่งของแผ่น Membrane การเก็บผลทำโดยเซลล์จะถูกขูดออกมาจากแต่ละฝั่งด้วยความระมัดระวัง ทำให้สามารถสกัด RNA แยกตามชนิดของเซลล์ได้โดยไม่ปะปนกัน ผลการวิเคราะห์พบว่า การเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP ที่พบในการ

เลี้ยงร่วมกัน (Co-culture) (รูปที่ 7B) น่าจะเป็นผลมากจากการเพิ่มการแสดงออกในเซลล์ HSC-7 แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกในเซลล์ HGF ซึ่งแสดงโดยการใช้ Transwell แบบประยุกต์ (รูปที่ 10B) ในขณะที่ระดับของ TIMP-2 นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งใน HGF และ HSC-7 เมื่อใช้ Transwell แบบประยุกต์ (รูปที่ 10B) ดังนั้นการเลี้ยงร่วมกันแบบปกติ (Co-culture) ที่พบระดับการแสดงออกของ TIMP-2 ที่อยู่ระหว่างระดับการแสดงออกของ HGF และ HSC-7 นั้น (รูปที่ 7B) น่าจะเป็นมาจากผลรวมของการแสดงออกตามสัดส่วนของแต่ละเซลล์แต่ละชนิดเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกันมากกว่า

สำหรับระดับการแสดงออกของยีน (รูปที่ 7B และ 10B) ของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 นั้นพบว่าสอดคล้องกับระดับของโปรตีนที่แสดงโดยเทคนิค Gelatin zymography (รูปที่ 7A และ 10A) คือมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 เล็กน้อย จากเซลล์ HSC-7 (รูปที่ 10B) และมีการลดลงของการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-9 ซึ่งชัดเจนมากขึ้นในการทดลองที่ใช้ Transwell แบบประยุกต์ โดยเทคนิคนี้แสดงให้เห็นจากการแสดงออกในระดับยีนว่า การลดลงของ MMP-9 นั้นเกิดจากการลดการแสดงออกของ HSC-7 เท่านั้น โดยไม่มีการเพิ่มการแสดงออกของ MMP-9 จาก HGF มาร่วมด้วย (รูปที่ 10B)

อิทธิพลของสารหลังที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์

เมื่อศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ไม่มีซีรัม ที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 11 ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ (1/3, 1/2 และ 2/3) ของสารหลังที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (CM) กับจำนวนเซลล์ที่คิดเป็นร้อยละ โดยเทียบให้ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ได้รับ SFM เท่ากับ 100 และให้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 2% FBS เป็นกลุ่มควบคุมบวก พบว่า HSC-7 เมื่อได้รับสารหลังจาก HGF มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 11A) ในทางกลับกัน จำนวนเซลล์ของ HGF เมื่อได้รับสารหลังจาก HSC-7 ไม่แตกต่างจากเมื่อได้รับเพียง SFM (รูปที่ 11B)

อิทธิพลของสารหลังที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์

เมื่อศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านรูของแผ่น Polycarbonate เข้าหาสารดึงดูดเซลล์ (Chemoattractant) ที่ Lower chamber ที่เวลา 7 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 12 พบว่า ในรูปที่ 12A เมื่อใช้สารหลังจากเซลล์ที่อยู่ใน SFM ที่ได้จาก HGF มาเป็นสารดึงดูดให้กับ HSC-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นเพียงครึ่งหนึ่ง (1/2CM) สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate ลงมาได้ถึง 2.7 เท่า เมื่อเทียบกับ เมื่อเซลล์ไม่ได้รับสารดึงดูด (SFM) เมื่อกำหนดให้จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate เมื่อไม่ได้รับสารดึงดูดเทียบเป็น 1 เท่า และจำนวนเซลล์เพิ่มเป็น 3.1 เท่า เมื่อเซลล์ได้รับสารหลังที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HGF แบบที่ไม่ได้ทำให้เจือจาง (CM) ในขณะที่เมื่อใช้ 10%FBS เป็นสารดึงดูด จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate มีจำนวนใกล้เคียงกับเมื่อเซลล์ไม่ได้รับสารดึงดูด (SFM)

ส่วน HGF นั้นเมื่อได้รับสารหลังจาก HSC-7 ที่เลี้ยงอยู่ใน SFM มาเป็นสารดึงดูด พบว่าให้ผลในลักษณะเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 12B คือ จำนวนเซลล์เพิ่มเป็น 2.4 เท่า เมื่อได้รับแบบ 1/2CM และจำนวนเซลล์เพิ่มเป็น 2.9 เท่า เมื่อได้รับแบบ CM โดยจำนวนเซลล์เมื่อไม่ได้รับสารดึงดูดเทียบเป็น 1 เท่า แต่เมื่อใช้ 10%FBS เป็นสารดึงดูด จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านแผ่น Polycarbonate มีจำนวนเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า จำนวนเท่าของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง และในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 4 หลุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ผลการวิจัย

ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Active เอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) ซึ่งแม้ตัวเซลล์ HSC-7 เองจะมีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ได้น้อย แต่ในสภาวะธรรมชาติ เซลล์มีได้โดยลำพัง โดยเซลล์มะเร็งเหล่านี้ฝังตัวและแวดล้อมอยู่ด้วย Stromal cell ซึ่งมีรายงานว่า เป็นแหล่งผลิตที่สำคัญของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในร่างกายให้กับเซลล์มะเร็ง (Poulsom et al., 1992; Schutz et al., 2002) ดังนั้นความสามารถที่เซลล์จะกระตุ้นให้เกิด Active เอนไซม์ได้จึงสำคัญกว่าความสามารถในการสร้างหรือหลั่งเอนไซม์เมื่อพิจารณาจากสภาวะที่แท้จริง

ผลการศึกษากิจกรรมของสารหลั่งต่อเซลล์แสดงให้เห็นว่าลำพังสารหลั่งจากเซลล์ HSC-7 เมื่อนำไปใส่ให้เซลล์ HGF หรือในทางกลับกัน คือนำสารหลั่งจากเซลล์ HGF ใส่ให้กับเซลล์ HSC-7 ไม่พบว่ากระตุ้นให้เกิด active MMP-2 แต่อย่างใด (รูปที่ 1) โดยพบว่าสารหลั่งนี้สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ MT1-MMP mRNA ได้ (รูปที่ 2) แต่ระดับโปรตีนที่สร้างขึ้น (Translation) กลับไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 3) การที่การเปลี่ยนแปลงของ mRNA กับโปรตีนไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันนั้นมีความเป็นไปได้ โดยถูกควบคุมในระดับ Post-transcription โดยมีรายงานว่า การแสดงออกของเอนไซม์ MMP-13 ภายหลังถูกกระตุ้นด้วย TGF- β มีการแสดงออกในระดับยีนสูงขึ้น แต่ระดับโปรตีนไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีโปรตีน TIAR ซึ่งยับยั้งการเข้าสู่ขั้นตอน Translation ของเซลล์ ในบางสภาวะ (Yu et al., 2003) อย่างไรก็ตาม สมมติฐานในส่วนนี้ยังไม่ได้มีการพิสูจน์ ส่วนระดับของ TIMP-2 ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยให้ผลสอดคล้องกันทั้งในระดับยีน (รูปที่ 2) และโปรตีน (รูปที่ 4) จะเห็นได้ว่า การกระตุ้นด้วยสารหลั่งจากเซลล์ ไม่เพียงพอที่จะทำให้ MT1-MMP และ TIMP-2 เกิดการเปลี่ยนแปลงและไม่เกิด active MMP-2 ในเซลล์ HSC-7 หรือ HGF

การศึกษาในส่วนต่อมา เมื่อลองทำการยับยั้ง Activity ของเซลล์ เพื่อต้องการศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อการกระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ในสภาวะที่เซลล์มีการสัมผัสกันเท่านั้น และอาศัยเพียงโปรตีนที่มี

อยู่แล้วบนผิวเซลล์ (Direct effect) โดยที่ไม่ต้องการให้เกิดการตอบสนองของเซลล์อันเป็นผลต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ (Indirect effect) โดยการใช้ยา Mitomycin C ซึ่งมีรายงานว่าสามารถลด Activity ของเซลล์ที่ได้รับยาลง จนเหลือแต่ Activity พื้นฐานที่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตเท่านั้น เช่นการหายใจ แล้วดูการตอบสนองของเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่ใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งเมื่อลองวิเคราะห์ Activity ของเซลล์ในแง่ของการสร้างโปรตีนใหม่ เมื่อทดสอบยาในเซลล์ HGF กลับพบว่ายังคงมีการสร้างเอนไซม์ MMP-2 อยู่เหมือนเดิม และยังสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยสารหลังจาก HSC-7 คือมีผลให้เกิด Active MMP-2 (รูปที่ 5) และเมื่อทดสอบยาในเซลล์ HSC-7 ก็ให้ผลในลักษณะคล้ายกัน (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นคณะผู้วิจัย จึงเปลี่ยนมาใช้ในการสกัดเอาเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยพื้นฐานความคิดเดิม คือ Direct effect แต่ก็พบว่าเมื่อใส่เยื่อหุ้มเซลล์ของ HGF ลงใน HSC-7 และในทางกลับกันคือใส่เยื่อหุ้มเซลล์ของ HSC-7 ลงใน HGF (รูปที่ 6) ไม่กระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 แต่อย่างใด จากการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าการสัมผัสกันของเซลล์เพียงอย่างเดียวไม่ส่งผลให้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ทั้งนี้มีหลายรายงานที่แสดงความสำคัญของโปรตีนบนผิวเซลล์โดยใช้เทคนิคในลักษณะเดียวกันนี้ เช่น การใช้เยื่อหุ้มเซลล์สกัดจากเซลล์ตับ (Theret et al., 1997) หรือจากเซลล์มะเร็งลำไส้ (Ko et al., 2000) ใส่ให้กับ Fibroblast ที่ได้จากบริเวณเดียวกัน แล้วพบการเกิด Active MMP-2

การศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย (Sanchavanakit, 2003a) ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ในระบบของ Transwell ปกติ ซึ่งเซลล์ไม่ได้สัมผัสกัน โดยเซลล์ HSC-7 เลี้ยงอยู่ใน Transwell ในขณะที่เซลล์ HGF เลี้ยงอยู่ที่ก้นหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ซึ่งเซลล์มีชีวิตและพร้อมที่จะตอบสนองต่อกันและกันได้ โดยผ่านทางสารหลังที่แพร่ไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าในสภาวะดังกล่าว ไม่กระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ในขณะที่ผลการศึกษาอีกส่วนหนึ่งซึ่งทำโดยเลี้ยงเซลล์ HSC-7 และ HGF ปะปนในหลุมเดียวกัน (Co-culture) ซึ่งได้ทำซ้ำอีกครั้งการศึกษาค้นคว้านี้ ให้ผลเหมือนกันคือ เกิด Active MMP-2 ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่าการกระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ในปฏิสัมพันธ์ระหว่าง HGF และ HSC-7 นั้นอาจจะไม่ได้เกิดโดยตรงหลังการสัมผัส แต่เกิดโดยอ้อม

กล่าวคือ การสัมผัสในครั้งแรกกระตุ้นการตอบสนองในลักษณะหนึ่งก่อน จากนั้นผลการตอบสนองจะเป็นตัวเหนี่ยวนำกระบวนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งหากสมมติฐานนี้เป็นจริง ก็จะสามารถอธิบายผลที่เยื่อหุ้มเซลล์ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ดังนั้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจึงจำเป็นต้องอยู่ในสภาวะที่มีชีวิต

อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ทำในมะเร็งชนิดอื่นๆ ก็ให้ผลในลักษณะที่แตกต่างกันไป เช่น เซลล์มะเร็งของเยื่อบุมดลูก (Endometrial cancer) ที่ได้รับสารหลังจากเซลล์ Fibroblast ที่ได้จากบริเวณข้างเคียงกับรอยโรค ซึ่งพบมี Hepatocyte growth factor (HGF) กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP และเกิด Active MMP-2 (Park et al., 2003) หรือในการเลี้ยงเซลล์มะเร็งของลำไส้ร่วมกับเซลล์ Fibroblast ใน Transwell ที่ไม่มีการสัมผัสของเซลล์ก็พบการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP ในเซลล์มะเร็งเอง (Ko et al., 2000) ดังนั้นการตอบสนองของเซลล์จะเป็นไปในรูปแบบใดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารหลังและกลไกที่เซลล์มะเร็งใช้ในการตอบสนองซึ่งพบว่า อาจไม่เป็นไปในลักษณะเดียวกันในแต่ละชนิดของมะเร็ง

สำหรับการศึกษาผลของการเลี้ยงเซลล์ร่วมกันในหลุมเลี้ยงเซลล์เดียวกันในงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำต่อเนื่องจากครั้งก่อน โดยศึกษาต่อถึงระดับ mRNA และโปรตีน ของ MT1-MMP และ TIMP-2 และวิเคราะห์ผลร่วมกับผลที่ได้จากการใช้ Transwell แบบประยุกต์ ซึ่งโดยปกติ Transwell จะนำมาใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ในลักษณะที่เซลล์ไม่สัมผัสกัน (Joo et al., 2002; Suzuki et al., 2004) ในการทดลองครั้งนี้ทำการประยุกต์โดยเลี้ยงเซลล์ชนิดหนึ่งเลี้ยงไว้ใน Transwell เช่นปกติ แต่เซลล์อีกชนิดหนึ่งเลี้ยงโดยให้เกาะที่ด้านล่างของแผ่น Membrane ดังที่อธิบายไว้ในวิธีทดลอง โดยคาดว่าตำแหน่งรูของแผ่น Membrane จะเป็นตำแหน่งที่เซลล์ทั้งสองชนิดจะมีโอกาสสัมผัสกันแม้ว่าพื้นที่ผิวสัมผัสจะน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงปนกันในหลุมเดียวกันก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสัมผัสกันในระดับนี้ก็สามารถกระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ได้ชัดเจน (รูปที่ 10) และข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้คือ ทำให้สามารถสกัด mRNA ของเซลล์แต่ละชนิดแยกจากกันได้โดยไม่ปะปนกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์การ

เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละชนิดของเซลล์ได้ โดยพบว่าผลที่เกิดจากการสัมผัสกันของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ นำไปสู่การเพิ่ม MT1-MMP ในระดับยีนโดยเซลล์ HSC-7 ซึ่งน่าจะนำไปสู่ Active MMP-2 ที่เกิดขึ้น ทั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ TIMP-2

อย่างไรก็ตามในการศึกษาในส่วนนี้ไม่สามารถนำเสนอการแสดงผลออกในระดับโปรตีน ของ MT1-MMP และ TIMP-2 เนื่องจาก Transwell ที่ใช้เป็นขนาดที่ใช้กับงานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม มีข้อจำกัดอยู่บางประการ โดยในกรณีที่ตรวจวัด MT1-MMP นั้น ปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากเซลล์ (Total protein extract) ที่เลี้ยงบน Transwell ทั้งจากด้านบนและด้านล่างของแผ่น Membrane มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อความไว (Sensitivity) ของ Antibody ต่อ MT1-MMP ที่จะวิเคราะห์โดยเทคนิค Western ได้ เพราะโดยปกติต้องใช้เซลล์ปริมาณมากเท่ากับที่เลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm แต่ Transwell มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 5 มม. ในส่วนของ TIMP-2 ซึ่งปกติจะวิเคราะห์ระดับโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจาก TIMP-2 เป็นโปรตีนที่หลั่งออกจากเซลล์ไม่สะสมที่เซลล์ ซึ่งการใช้ Transwell แบบประยุกต์นี้ ที่มีข้อดีที่ทำให้สามารถสกัด RNA หรือโปรตีนที่สร้างและสะสมไว้ที่ตัวเซลล์ แยกตามชนิดของเซลล์ได้ แต่ในกรณีของโปรตีนที่อยู่ในรูปของสารหลั่ง การใช้ Transwell แบบประยุกต์ก็ยังมีปัญหาการปะปนกันของโปรตีนในลักษณะเดียวกับการใช้ Transwell ในรูปแบบปกติ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถที่จะวิเคราะห์ระดับของ TIMP-2 แยกตามชนิดของเซลล์ได้

ส่วนผลการศึกษาอิทธิพลของสารหลั่งจากเซลล์ชนิดหนึ่งต่อพฤติกรรมของเซลล์อีกชนิดหนึ่งนั้น พบว่ามีผลส่งเสริมการเคลื่อนที่ซึ่งกันและกันของเซลล์ HSC-7 และ HGF อย่างชัดเจน (รูปที่ 12) แม้ว่า จะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์แต่ละชนิดน้อย (รูปที่ 11) ซึ่งในสภาวะธรรมชาติ การที่เซลล์เคลื่อนที่เข้าหากันมากขึ้น น่าจะส่งผลให้เกิด Active MMP-2 รวมทั้งการเพิ่มระดับของ Pro MMP-2 ให้กับเซลล์ HSC-7 เนื่องจากเพิ่มโอกาสที่เซลล์จะสัมผัสกันและกันมากขึ้นตามกลไกที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันนั้นทำให้เกิดการรุกรานของรอยโรคเช่น ในหลายๆการศึกษาที่ผ่านมา

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ของเซลล์มะเร็งของกล่องเสียง (Laryngeal cancer) กับเซลล์ Fibroblast ที่ได้จากบริเวณใกล้เคียง โดยใช้เทคนิคเยื่อหุ้มเซลล์สกัด พบว่าโปรตีน EMMPRIN ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์สกัดที่ได้จากเซลล์มะเร็ง ที่เติมให้กับเซลล์ Fibroblast เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้าง MMP-2 เพิ่มขึ้นรวมทั้งพบการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP mRNA ร่วมกับระดับของ Active MMP-2 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ Fibroblast (Suzuki et al., 2004) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าระดับการแสดงออกของ EMMPRIN จะสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง (Kanekura et al., 2002; Polette et al., 1997)

จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเซลล์ HSC-7 สร้าง EMMPRIN ได้หรือไม่และระดับการสร้างมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เมื่อมีการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ HGF แม้ว่าผลการศึกษาโดยใช้เยื่อหุ้มเซลล์สกัดที่ได้จากเซลล์ HSC-7 ให้ผลลบ แต่อาจเป็นไปได้ดังสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่าปฏิสัมพันธ์เริ่มแรกที่เกิดขึ้นจากการที่เซลล์สัมผัสกัน อาจเป็นตัวชักนำให้สร้าง EMMPRIN หรือโปรตีนอื่นที่ยังไม่ได้พิสูจน์ ซึ่งจะมีผลในขั้นตอนต่อไป ดังนั้นถ้านำ Transwell แบบประยุกต์มาใช้ โดยหา Transwell ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อที่จะได้ปริมาณโปรตีนที่มากพอที่จะช่วยตอบคำถามในส่วนนี้ เพื่อหาระดับ EMMPRIN หรือโปรตีนอื่นและช่วยให้วิเคราะห์ระดับ MT1-MMP โปรตีนเนื่องมาจากข้อจำกัดของ Transwell ขนาดเล็กด้วย

สำหรับการศึกษาเพื่อที่จะหาว่าเซลล์ชนิดใดระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีบทบาทสำคัญมากกว่ากันในการเกิด Active MMP-2 นั้นมีหลายรายงาน โดยส่วนใหญ่มักแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งมีบทบาทชักนำให้เกิด Active MMP-2 โดยเพิ่มการสร้าง MT1-MMP ในระดับ RNA หรือโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับที่พฤติกรรมของเซลล์ HSC-7 ในการศึกษาครั้งนี้ (Boyd and Balkwill, 1999; Suzuki et al., 2004; Theret et al., 1997; Tokumaru et al., 2000)

สรุป

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า

1. โดยลำพังของสารหลังที่ได้จาก HSC-7 หรือ HGF ตลอดจนการสัมผัสของเซลล์กับโปรตีนที่มีอยู่แล้วบนผิวเซลล์อีกชนิดหนึ่ง ไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ HGF หรือ HSC-7 ตามลำดับ จำเป็นต้องอาศัยการตอบสนองของเซลล์อื่นเป็นผลต่อเนื่องตามมา ภายหลังจากการสัมผัสกันของเซลล์ จึงจะกระตุ้นให้เกิด Active MMP-2 ได้
2. สารหลังจาก HGF ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ HSC-7 เล็กน้อย ในขณะที่สารหลังจาก HSC-7 ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ HGF
3. สารหลังจาก HGF ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ HSC-7 และสารหลังจาก HSC-7 ก็ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ HGF เช่นกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Alessandro, R., and Kohn, E. C. (2002). Signal transduction targets in invasion. *Clin Exp Metastasis* 19, 265-273.
- Barille, S., Collette, M., Thabard, W., Bleunven, C., Bataille, R., and Amiot, M. (2000). Soluble IL-6R alpha upregulated IL-6, MMP-1 and MMP-2 secretion in bone marrow stromal cells. *Cytokine* 12, 1426-1429.
- Boyd, R. S., and Balkwill, F. R. (1999). MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts. *Br J Cancer* 80, 315-321.
- Brooks, B., Bundred, N. J., Howell, A., Lang, S. H., and Testa, N. G. (1997). Investigation of mammary epithelial cell-bone marrow stroma interactions using primary human cell culture as a model of metastasis. *Int J Cancer* 73, 690-696.
- Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89, 1260-1270.
- Cooper, C. R., Chay, C. H., Gendernalik, J. D., Lee, H. L., Bhatia, J., Taichman, R. S., McCauley, L. K., Keller, E. T., and Pienta, K. J. (2003). Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 97, 739-747.
- Curran, S., and Murray, G. I. (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36, 1621-1630.
- De Wever, O., and Mareel, M. (2002). Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem* 383, 55-67.
- De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200, 429-447.
- Dictor, M., Ehinger, M., Mertens, F., Akervall, J., and Wennerberg, J. (1999). Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 112, S40-52.
- Dong, Z., Nemeth, J. A., Cher, M. L., Palmer, K. C., Bright, R. C., and Fridman, R. (2001). Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer* 93, 507-515.
- Hauptmann, S., Siegert, A., Berger, S., Denkert, C., Kobel, M., Ott, S., Siri, A., and Borsi, L. (2003). Regulation of cell growth and the expression of extracellular matrix proteins in colorectal adenocarcinoma: a fibroblast-tumor cell coculture model to study tumor-host interactions in vitro. *Eur J Cell Biol* 82, 1-8.

- Hogarty, M. D. (2003). The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. *Cancer Lett* 197, 173-179.
- Hu, D., Sires, B. S., Tong, D. C., Royack, G. A., and Oda, D. (2000). Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 16, 119-125.
- Ito, A., Nakajima, S., Sasaguri, Y., Nagase, H., and Mori, Y. (1995). Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. *Br J Cancer* 71, 1039-1045.
- John, A., and Tuszynski, G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 7, 14-23.
- Johnson, D. W., Saunders, H. J., Baxter, R. C., Field, M. J., and Pollock, C. A. (1998). Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney Int* 54, 747-757.
- Joo, H. G., Fleming, T. P., Tanaka, Y., Dunn, T. J., Linehan, D. C., Goedegebuure, P. S., and Eberlein, T. J. (2002). Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors. *Int J Cancer* 102, 20-28.
- Kanekura, T., Chen, X., and Kanzaki, T. (2002). Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 99, 520-528.
- Katori, H., Baba, Y., Imagawa, Y., Nishimura, G., Kagesato, Y., Takagi, E., Ishii, A., Yanoma, S., Maekawa, R., Yoshioka, T., et al. (2002). 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* 178, 151-159.
- Kawamata, H., Uchida, D., Hamano, H., Kimura-Yanagawa, T., Nakashiro, K. I., Hino, S., Omotehara, F., Yoshida, H., and Sato, M. (1998). Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol* 13, 699-704.
- Kijima, T., Maulik, G., Ma, P. C., Tibaldi, E. V., Turner, R. E., Rollins, B., Sattler, M., Johnson, B. E., and Salgia, R. (2002). Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 62, 6304-6311.

- Ko, K., Yazumi, S., Yoshikawa, K., Konda, Y., Nakajima, M., Chiba, T., and Takahashi, R. (2000). Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon-cancer cells in non-contact Co-cultures. *Int J Cancer* 87, 165-171.
- Kurahara, S., Shinohara, M., Ikebe, T., Nakamura, S., Beppu, M., Hiraki, A., Takeuchi, H., and Shirasuna, K. (1999). Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21, 627-638.
- Kusukawa, J., Sasaguri, Y., Shima, I., Kameyama, T., and Morimatsu, M. (1993). Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol* 99, 18-23.
- Li, G., Satyamoorthy, K., Meier, F., Berking, C., Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003). Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* 22, 3162-3171.
- Libura, J., Drukala, J., Majka, M., Tomescu, O., Navenot, J. M., Kucia, M., Marquez, L., Peiper, S. C., Barr, F. G., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M. Z. (2002). CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 100, 2597-2606.
- Matsushita, A., Onda, M., Uchida, E., Maekawa, R., and Yoshioka, T. (2001). Antitumor effect of a new selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, on experimental pancreatic cancer. *Int J Cancer* 92, 434-440.
- Nefedova, Y., Landowski, T. H., and Dalton, W. S. (2003). Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 17, 1175-1182.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., and Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18, 1135-1149.
- Ohta, M., Konno, H., Tanaka, T., Baba, M., Kamiya, K., Oba, K., Kaneko, T., Syouji, T., Igarashi, A., and Nakamura, S. (2001). 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* 92, 688-695.
- O-chareonrat, P., Rhys-Evans, P. H., and Eccles, S. A. (2001). 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* 127, 813-820.
- Park, Y. H., Ryu, H. S., Choi, D. S., Chang, K. H., Park, D. W., and Min, C. K. (2003). Effects of hepatocyte growth factor on the expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors during the endometrial cancer invasion in a three-dimensional coculture. *Int J Gynecol Cancer* 13, 53-60.
- Parrott, J. A., Nilsson, E., Mosher, R., Magrane, G., Albertson, D., Pinkel, D., Gray, J. W., and Skinner, M. K. (2001). Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 175, 29-39.
- Polette, M., Gilles, C., Marchand, V., Lorenzato, M., Toole, B., Tournier, J. M., Zucker, S., and Birembaut, P. (1997). Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *J Histochem Cytochem* 45, 703-709.
- Poulsom, R., Pignatelli, M., Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., Wright, P. A., Jeffery, R. E., Longcroft, J. M., Rogers, L., and Stamp, G. W. (1992). Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 141, 389-396.
- Rahimi, N., Tremblay, E., McAdam, L., Park, M., Schwall, R., and Elliott, B. (1996). Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma. *Cell Growth Differ* 7, 263-270.
- Roussel, M. F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J., Eisenman, R. N., and Ayer, D. E. (1996). Inhibition of cell proliferation by the Mad1 transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16, 2796-2801.
- Sadeghi, H. M., Seitz, B., Hayashi, S., LaBree, L., and McDonnell, P. J. (1998). In vitro effects of mitomycin-C on human keratocytes. *J Refract Surg* 14, 534-540.
- Sanchavanakit, N. K., S. Phimlee, S. Pimkhaokham, A. Pavasant, P. (2003a). Collagen and gingival fibroblasts activate gelatinases in oral squamous carcinoma cell lines. *J Dent Assoc Thai* 53, 168-183.
- Sanchavanakit, N. S., A. Boonyakiati, O. Pimkhaokham, A. Pavasant, P. (2003b). Inhibitory effect of EGCG on collagen induced MMP-2 activation in oral squamous carcinoma cell lines. *CU Dent J* 26, 1-14.
- Sato, T., Iwai, M., Sakai, T., Sato, H., Seiki, M., Mori, Y., and Ito, A. (1999). 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* 80, 1137-1143.
- Schutz, A., Schneidenbach, D., Aust, G., Tannapfel, A., Steinert, M., and Wittekind, C. (2002). 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* 23, 179-184.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Slootweg, P. J., Hordijk, G. J., and Koole, R. (1996). Autopsy findings in patients with head and neck squamous cell cancer and their therapeutic relevance. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B, 413-415.
- Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., and Liotta, L. A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9, 541-573.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270, 5331-5338.
- Suzuki, S., Sato, M., Senoo, H., and Ishikawa, K. (2004). Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP. *Exp Cell Res* 293, 259-266.
- Theret, N., Musso, O., L'Helgoualc'h, A., and Clement, B. (1997). Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 150, 51-58.
- Timar, J., Csuka, O., Orosz, Z., Jeney, A., and Kopper, L. (2001). Molecular pathology of tumor metastasis. I. Predictive pathology. *Pathol Oncol Res* 7, 217-230.
- Tokuda, Y., Satoh, Y., Fujiyama, C., Toda, S., Sugihara, H., and Masaki, Z. (2003). Prostate cancer cell growth is modulated by adipocyte-cancer cell interaction. *BJU Int* 91, 716-720.
- Tokumaru, Y., Fujii, M., Otani, Y., Kameyama, K., Imanishi, Y., Igarashi, N., and Kanzaki, J. (2000). 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* 150, 15-21.
- Uchida, D., Begum, N. M., Almofti, A., Nakashiro, K., Kawamata, H., Tateishi, Y., Hamakawa, H., Yoshida, H., and Sato, M. (2003). Possible role of stromal-cell-derived factor-

1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 290, 289-302.

Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M., and Hong, W. K. (1993). Head and neck cancer. *N Engl J Med* 328, 184-194.

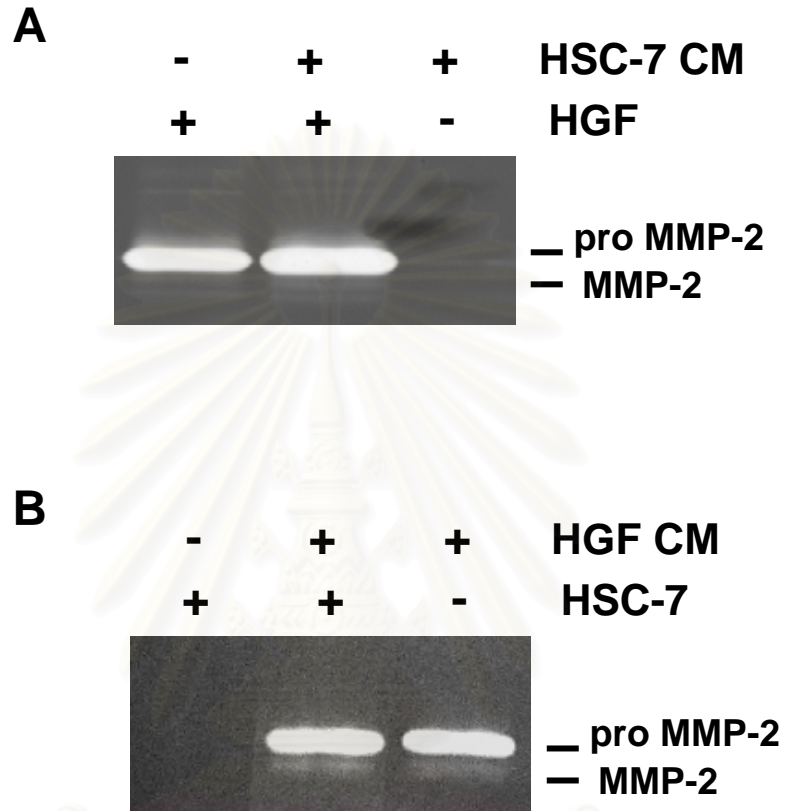
Woo, E., Tingey, D. P., Mackenzie, G., and Hooper, P. (1997). Stability of the antiproliferative effect of mitomycin-C after reconstitution. *J Glaucoma* 6, 33-36.

Yu, Q., Cok, S. J., Zeng, C., and Morrison, A. R. (2003). Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR). *J Biol Chem* 278, 1579-1584.

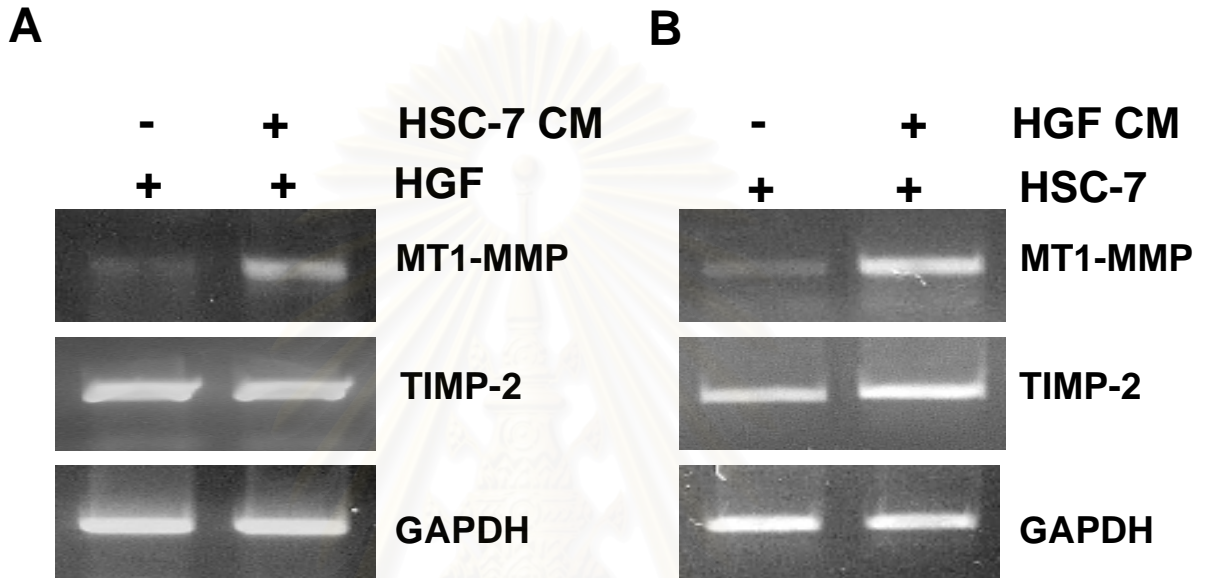
Zbaren, P., and Lehmann, W. (1987). Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113, 762-764.



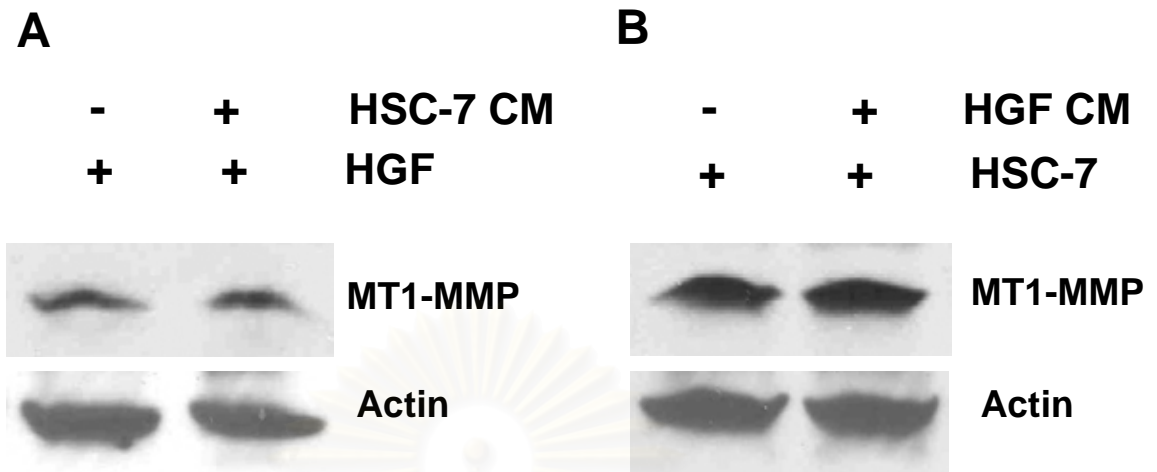
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



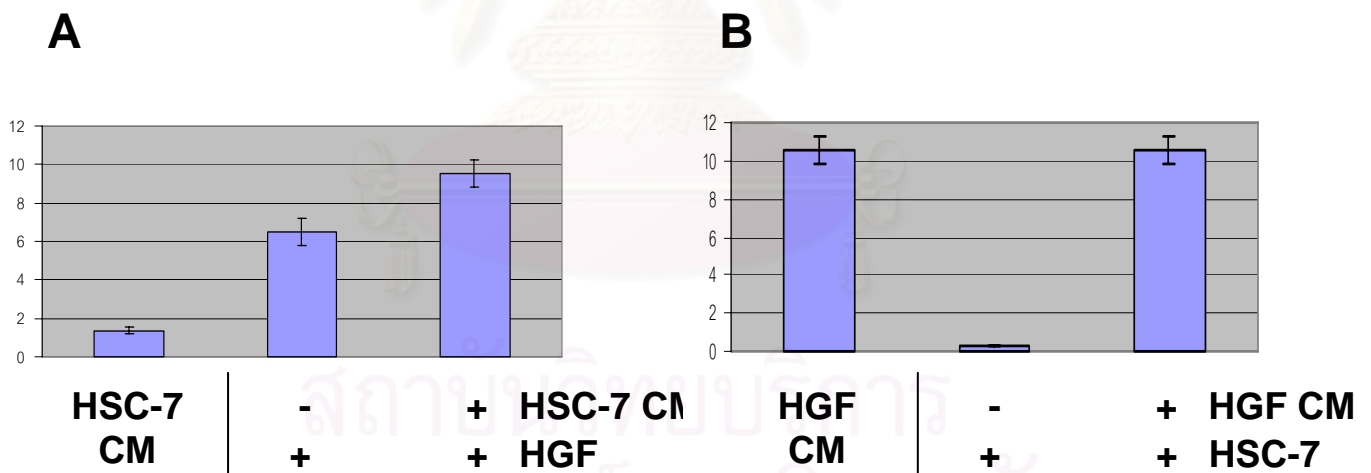
รูปที่ 1 Gelatin zymograph แสดงระดับของเอนไซม์ MMP-2 วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน (A) เซลล์ HGF เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HSC-7 (B) เซลล์ HSC-7 เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HGF



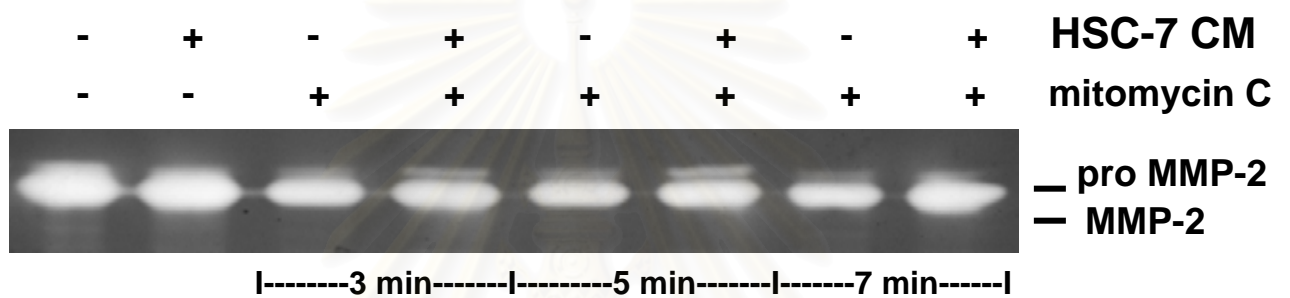
รูปที่ 2 ภาพแสดงระดับของ mRNA วิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR ของ MT1-MMP และ TIMP-2 สกัดจากเซลล์ภายหลังทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย (A) เซลล์ HGF เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HSC-7 (B) เซลล์ HSC-7 เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HGF เมื่อเปรียบเทียบต่อระดับของ GAPDH ที่เท่ากัน



รูปที่ 3 ภาพแสดงระดับของโปรตีน MT1-MMP วิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot ซึ่งสกัดจากเซลล์ภายหลังทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย (A) เซลล์ HGF เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HSC-7 (B) เซลล์ HSC-7 เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HGF เมื่อเปรียบเทียบต่อระดับของโปรตีน Actin ที่เท่ากัน

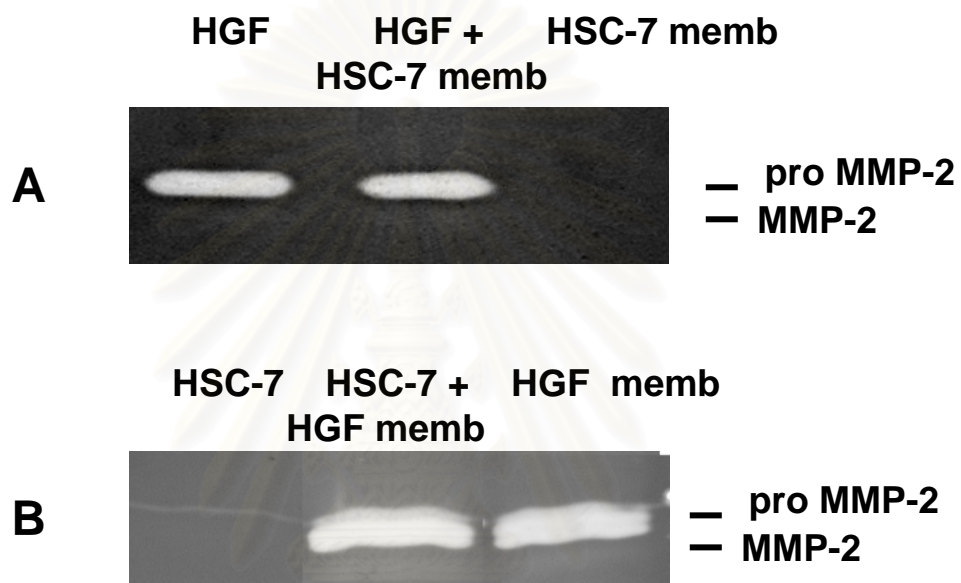


รูปที่ 4 กราฟแสดงระดับของโปรตีน TIMP-2 (ng/ml) วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA โดยวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์ภายหลังทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย (A) ปริมาณ TIMP-2 ในสารหลังจากเซลล์ HSC-7 ที่บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยไม่มีเซลล์แสดงระดับ TIMP-2 ที่มีอยู่เดิม (HSC-7 CM), เซลล์ HGF เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HSC-7, (B) ปริมาณ TIMP-2 ในสารหลังจากเซลล์ HGF ที่บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยไม่มีเซลล์แสดงระดับ TIMP-2 ที่มีอยู่เดิม (HGF CM), เซลล์ HSC-7 เมื่อไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) สารหลังจากเซลล์ HGF

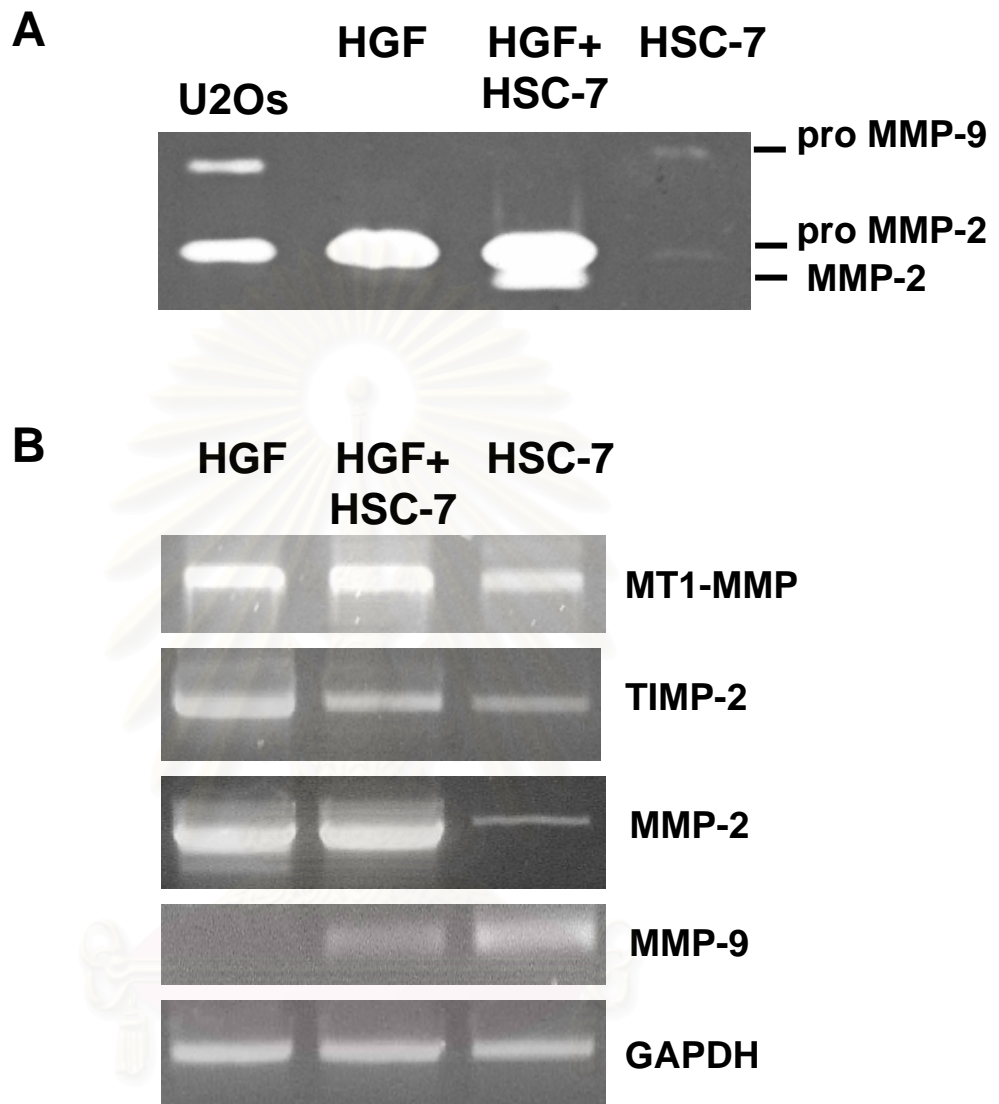


รูปที่ 5 Gelatin zymograph แสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ได้จากเซลล์ HGF ที่ไม่ได้รับยา Mitomycin C (-) และได้รับยา Mitomycin C (+) ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 นาที และในสถานะที่ไม่ได้รับ (-) หรือได้รับ (+) การกระตุ้นด้วยสารหลังจากเซลล์ HSC-7 (HSC-7 CM) ภายหลังทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

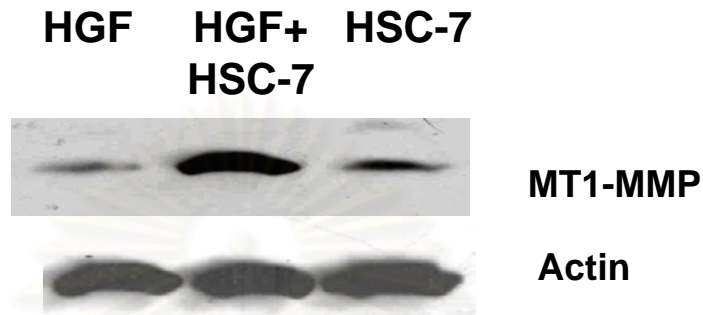


รูปที่ 6 Gelatin zymograph แสดงระดับเอนไซม์ และ active MMP-2 วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน (A) เซลล์ HGF เมื่อได้รับเยื่อหุ้มเซลล์สกัดของเซลล์ HSC-7 ที่ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$ และ (B) เซลล์ HSC-7 เมื่อได้รับเยื่อหุ้มเซลล์สกัดของเซลล์ HGF ที่ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$

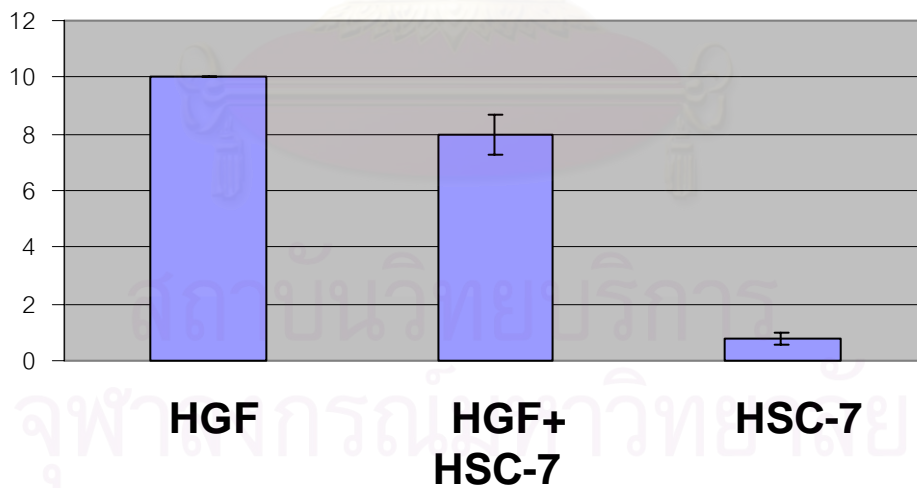


รูปที่ 7 (A) Gelatin zymograph แสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดร่วมกัน (Co-culture), HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HGF), HSC-7 ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HSC-7) และ HGF และ HSC-7 ที่เลี้ยงร่วมในหลุมเดียวกัน (HGF+HSC-7) ตำแหน่งของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 บนเจลจะตรวจสอบกับระดับของเอนไซม์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไลน์ U2Os ที่ใช้เป็น positive control (U2Os)

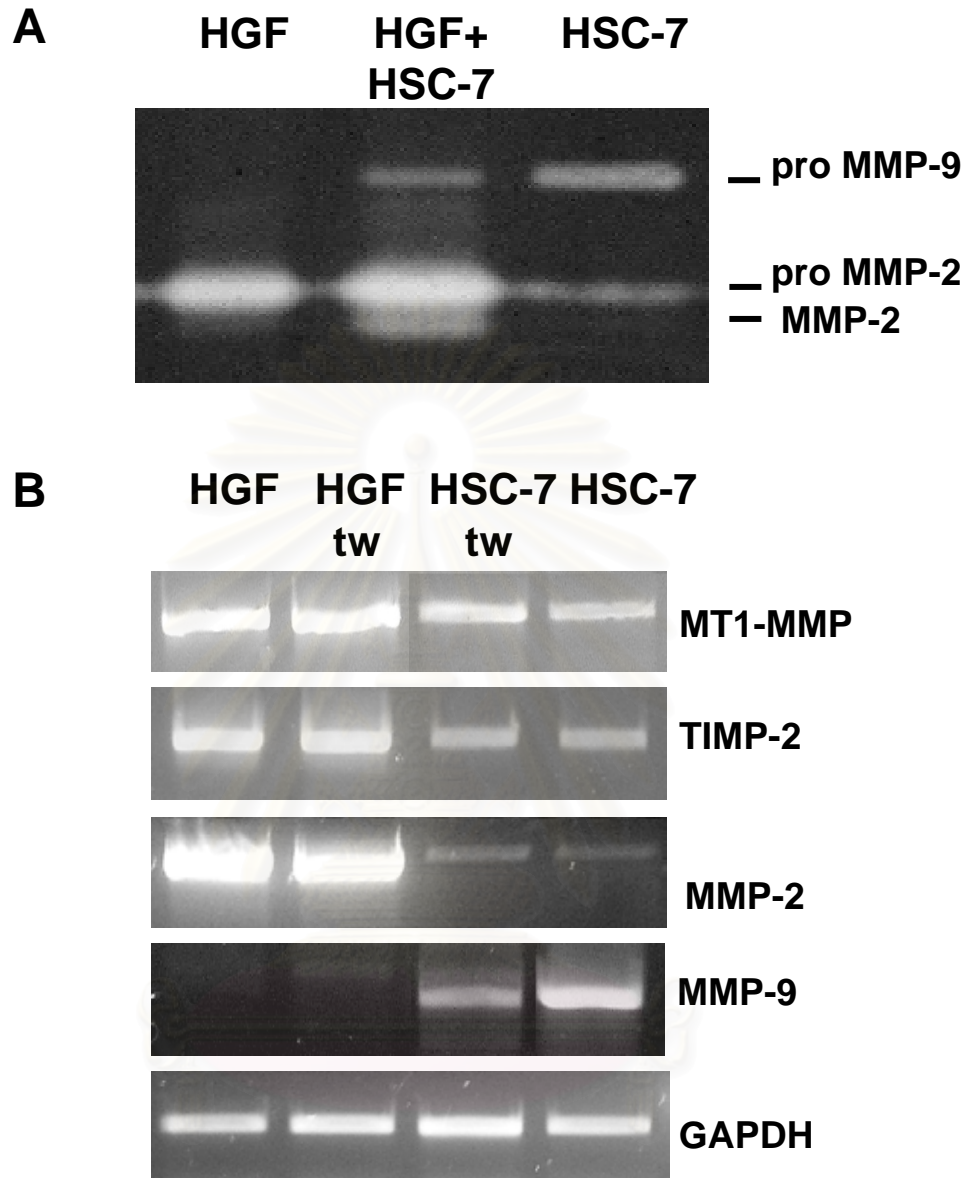
(B) ภาพแสดงระดับ mRNA วิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR ของ MT1-MMP, TIMP-2, MMP-2 และ MMP-9 สกัดจากเซลล์ HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HGF) HSC-7 ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HSC-7) และ HGF และ HSC-7 ที่เลี้ยงร่วมในหลุมเดียวกัน (HGF+HSC-7) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของ GAPDH ที่เท่ากัน



รูปที่ 8 ภาพแสดงระดับของโปรตีน MT1-MMP วิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot ซึ่งสกัดจากเซลล์ HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HGF) HSC-7 ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HSC-7) และ HGF และ HSC-7 ที่เลี้ยงร่วมในหลุมเดียวกัน (HGF+HSC-7) เมื่อเปรียบเทียบต่อระดับของโปรตีน Actin ที่เท่ากัน



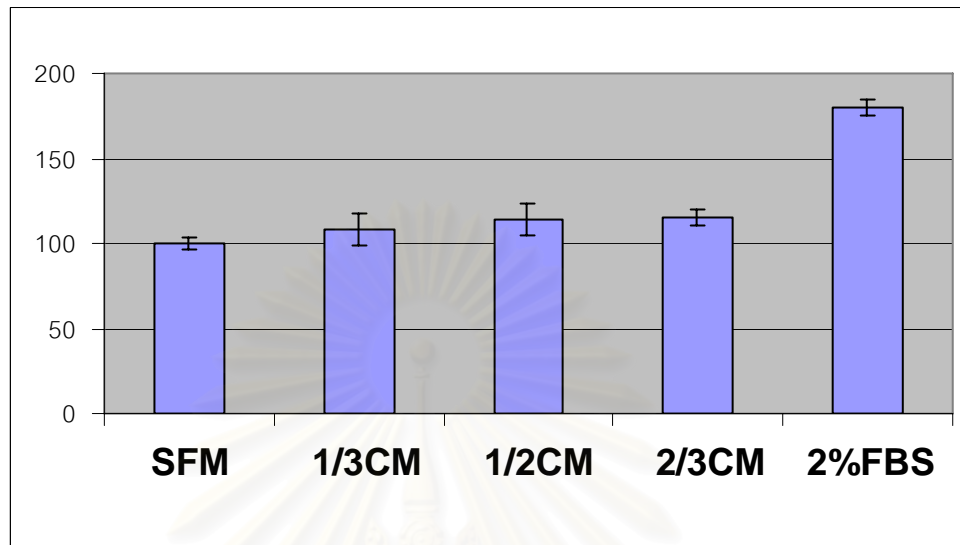
รูปที่ 9 กราฟแสดงระดับของโปรตีน TIMP-2 (ng/ml) วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA โดยวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์ HGF ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HGF) HSC-7 ที่เลี้ยงโดยลำพัง (HSC-7) และ HGF และ HSC-7 ที่เลี้ยงร่วมในหลุมเดียวกัน (HGF+HSC-7)



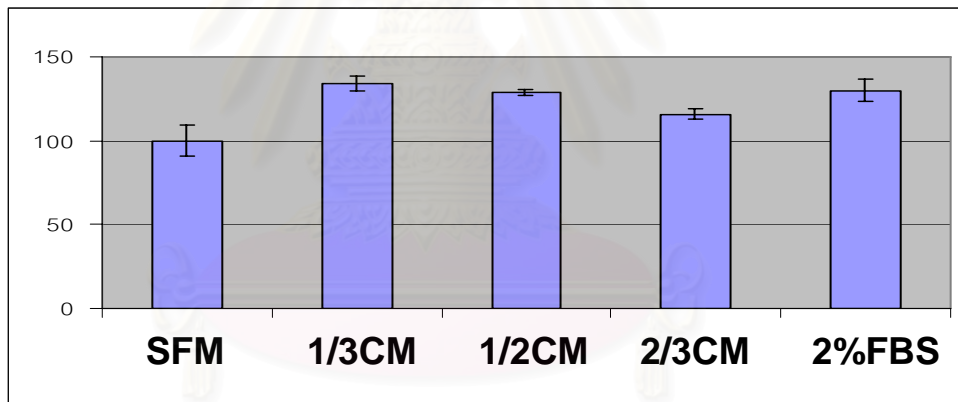
รูปที่ 10 (A) Gelatin zymograph แสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ Transwell แบบประยุกต์ เมื่อเลี้ยง HGF ที่ด้านบนของ membrane (HGF) หรือ เลี้ยง HSC-7 ที่ด้านล่างของ membrane (HSC-7) โดยลำพัง หรือเลี้ยงเซลล์สองชนิดใน Transwell เดียวกันแต่อยู่คนละด้านของ membrane (HGF+HSC-7)

(B) ภาพแสดงระดับ mRNA วิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR ของ MT1-MMP, TIMP-2, MMP-2 และ MMP-9 สกัดจากเซลล์ HGF ที่ด้านบนของ membrane (HGF) หรือ เลี้ยง HSC-7 ที่ด้านล่างของ membrane (HSC-7) โดยลำพัง หรือจากเซลล์ HGF ที่มาจากด้านบนของ membrane ของ Transwell ที่เลี้ยงเซลล์สองชนิด (HGF tw) และจากเซลล์ HSC-7 ที่มาจากด้านล่างของ membrane ของ Transwell ที่เลี้ยงเซลล์สองชนิด (HSC-7 tw) เมื่อเปรียบเทียบต่อระดับของ GAPDH ที่เท่ากัน

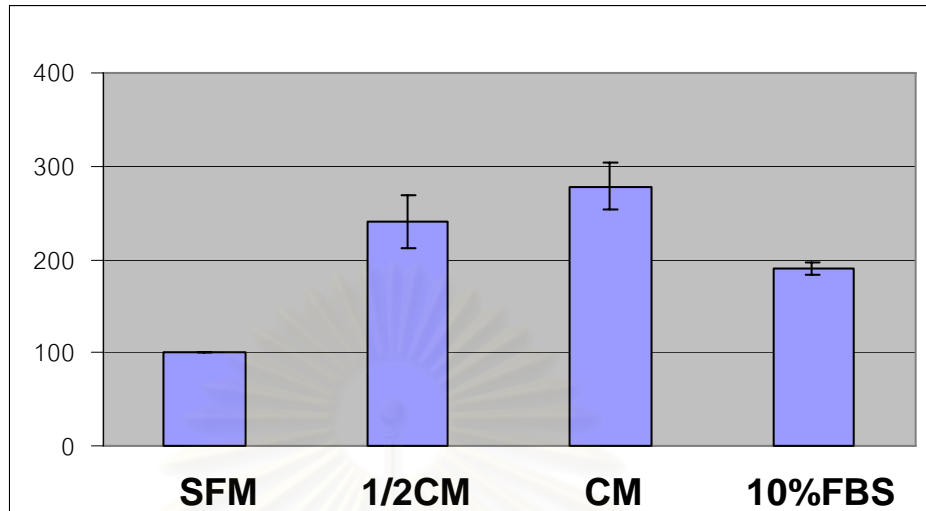
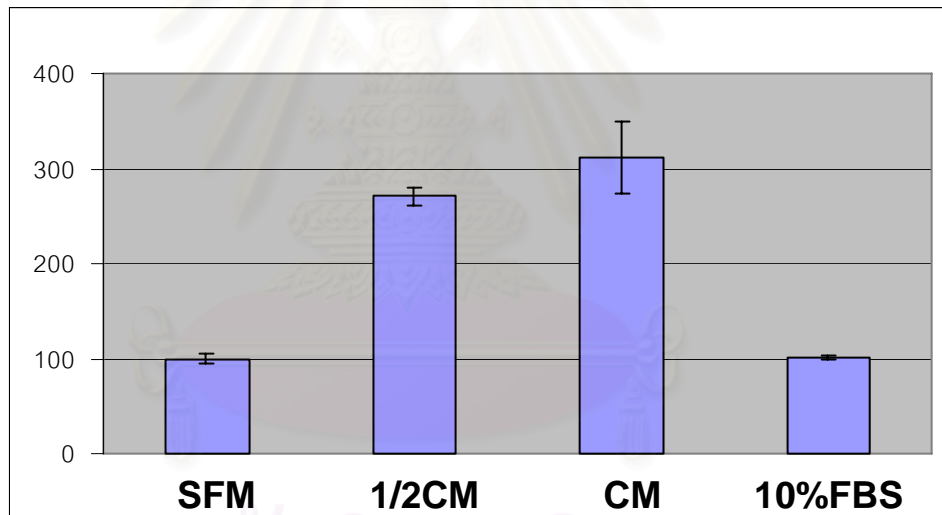
A



B



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ แสดงเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์ ภายหลังจากเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน (A) เซลล์ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากเซลล์ HSC-7 (CM) (B) เซลล์ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากเซลล์ HSC-7 (CM) โดยได้รับในสัดส่วน 1/3, 1/2 และ 2/3 โดยเซลล์ที่ได้รับ SFM เป็นกลุ่มควบคุมลบ (SFM) และ เซลล์ที่ได้รับ 2%FBS เป็นกลุ่มควบคุมบวก (2%FBS) กำหนดให้จำนวนเซลล์ที่ได้รับ SFM เท่ากับร้อยละ 100 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง และในแต่ละการทดลองแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 หลุม

A**B**

รูปที่ 12 กราฟแสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ แสดงเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์ ภายหลังเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ใน (A) เซลล์ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากเซลล์ HSC-7 (CM) (B) เซลล์ HGF เมื่อได้รับสารหลังจากเซลล์ HSC-7 (CM) โดยได้รับในสัดส่วน 1/2, และ 1 โดยเซลล์ที่ได้รับ SFM เป็นกลุ่มควบคุมลบ (SFM) และ เซลล์ที่ได้รับ 10%FBS เป็นกลุ่มควบคุมบวก (10%FBS) กำหนดให้จำนวนเซลล์ที่ได้รับเท่ากับร้อยละ 100 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง และในแต่ละการทดลองแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 4 หลุม