



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

บทบาทของไฟโบรบลาสและไซโตไคน์ในการรุกร้าและสร้าง
matrix metalloproteinase ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ
(The role of fibroblasts and cytokines in the invasion
and expression of matrix metalloproteinases in human
head and neck squamous carcinoma cells)

โดย

สิทธิชัย ขุนทองแก้ว
พนมวัฒน์ อมรพิมลธรรม
บรรเจิด ยะพงศ์
พฤศจิกายน 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

บทบาทของไฟโบรบลาสและไซโตไคน์ในการรุกรานและสร้าง
matrix metalloproteinase ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ
(The role of fibroblast and cytokines in the invasion
and expression of matrix metalloproteinases in human
head and neck squamous carcinoma cells)

คณะผู้วิจัย		สังกัด
สิทธิชัย	ขุนทองแก้ว	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
พนมวัฒน์	อมรพิมลธรรม	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
บรรเจิด	ยะพงศ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชุดโครงการ สุขภาพช่องปาก

บทบาทของไฟโบรบลาสและไซโตไคน์ในการรุกรานและสร้างmatrix metalloproteinaseของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ

บทคัดย่อ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินอิทธิพลของ extracellular matrix ไฟโบรบลาส ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ autocrine และ paracrine ตลอดจนบทบาทของไซโตไคน์ต่อการสร้าง matrix metalloproteinase (MMP2 และ MMP9) และการรุกรานของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ การศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จากบุคคลเดียวกัน 2 คู่ ซึ่งได้แก่เซลล์ HN4 และ HN30 ที่เพาะเลี้ยงจากรอยโรคมะเร็งที่ลิ้นและคอหอยตามลำดับกับเซลล์ HN12 และ HN31 ที่เพาะเลี้ยงได้จากมะเร็งที่แพร่ไปต่อมน้ำเหลืองโดยมีkeratinocyte ปกติ(HaCaT)เป็นเซลล์เปรียบเทียบ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่นำมาศึกษามีการแสดงออกของMMP2 และเซลล์มะเร็งบางชนิดมีการแสดงออกของMMP9 การแสดงออกของMMP9 นั้นไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคและการรุกรานของเซลล์มะเร็งนอกกาย(invitro invasion assay) โดยพบว่าHN4และHN31 มีการแสดงออกของMMP9น้อยมาก อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติบนextracellular matrix 2ชนิดคือ collagen ชนิดที่ I และ basement membrane ผลปรากฏว่า collagen ชนิดที่ I สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งทุกชนิดที่นำมาศึกษารวมทั้งHaCaT มีการแสดงออกของMMPทั้งสองชนิดมากขึ้น ในขณะที่ basement membrane ไม่ให้ผลดังกล่าว การศึกษาผลของไฟโบรบลาสต่อการสร้าง MMPในเซลล์มะเร็งพบว่าการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกันมีผลกระตุ้นการสร้าง MMP2และ MMP9 โดยพบว่าการfixเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วย methanolมีผลลดการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิด ผลการทดลองดังกล่าวจึงทำให้เชื่อว่าการกระตุ้นการสร้าง MMP2และMMP9นั้นเกิดทั้งในเซลล์มะเร็งและไฟโบรบลาส อนึ่งนอกจากการเลี้ยงเซลล์ร่วมกันจะมีผลต่อการสร้างMMPsแล้วยังพบว่า conditioned media ที่ได้จากไฟโบรบลาสก็มีผลกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งสร้าง MMPsและการรุกรานนอกกายได้ จึงทำให้เชื่อว่าการสัมผัสหรือการทำปฏิกิริยากับสารที่คัดหลังจากไฟโบรบลาส มีผลกระตุ้นการสร้างMMPsและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าconditioned media ของเซลล์มะเร็งมีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดในเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกันซึ่งแสดงว่ากระบวนการกระตุ้น MMPsในเซลล์มะเร็งอาจเกิดโดยกลไกparacrineอันเนื่องมาจากไฟโบรบลาสและautocrine อันเกิดจากเซลล์มะเร็งเอง ดังนั้นจึงน่าสนใจ ศึกษาบทบาทของไซโตไคน์ต่อการสร้างMMPsและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง การตรวจสอบการแสดงออก mRNAของIL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF β และ hepatocyte growth factor (HGF) โดยreverse-transcription PCR พบว่าเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ ไซโตไคน์ทุกชนิดยกเว้น HGFในขณะที่พบ mRNAของ ไซโตไคน์ทุกชนิดในไฟโบรบลาส การเลี้ยงไฟโบรบลาสร่วมกับเซลล์มะเร็งมีผลกระตุ้นการแสดงออก mRNAของไซโตไคน์ส่วนใหญ่ยกเว้น IL-6 การศึกษานี้พบว่าcollagen ชนิดที่ I, autocrine และ paracrine factor สามารถกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าIL-1 α , IL-1 β , TNF α , TGF β และ HGF กระตุ้นการสร้างMMP2และ MMP9ของเซลล์มะเร็งโดยเซลล์ที่มีความสามารถรุกรานสูง (HN12และHN31)จะตอบสนองต่อไซโตไคน์ในการกระตุ้นให้สร้าง MMPsได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีความสามารถรุกรานต่ำ(HN4และHN30) ไซโตไคน์ทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถกระตุ้นการรุกรานของเซลล์ และHaCaT ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ HN4 และ HN31 จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วสรุปได้ว่าอันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับextracellular matrix, soluble factors หรือระหว่างเซลล์ ด้วยกันมีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างMMPs และการรุกรานของเซลล์มะเร็งโดยเชื่อว่าไซโตไคน์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นดังกล่าว

The role of fibroblast and cytokines in the invasion and expression of matrix metalloproteinase in human head and neck squamous carcinoma cells

Abstract This study evaluated the influence of extracellular matrix, fibroblast, autocrine and paracrine factors, and cytokine on the production of matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP9) and invitro invasion of two genetically related pair of human squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. Four cancer cell lines derived from primary lesions (HN4,HN30) and metastatic cervical lymph nodes (HN12, HN31) of two patients, and a human normal keratinocyte cell line (HaCaT) were used in this study. It was found that HNSCC and HaCaT cells constitutively expressed MMP2. MMP9 expression was not correlated to the in vitro invasion of cancer cells. HN4 and HN31 expressed a trace level of MMP9. Cancer cells apposed to type I collagen exhibited an increase in the expression of MMP2 and MMP9. In contrast, basement membrane could not enhance MMP expression in HNSCC and HaCaT cells. Co-culture cancer cells with gingival fibroblasts resulted in an increase of MMP2 and MMP9 production in the culture medium. However, fibroblasts did not obviously stimulated MMP expression in HaCaT cells. Co-culture of cancer cells and fibroblasts caused an increase in the production of MMPs in both HNSCC and fibroblast cells because methanol-fixed HNSCC cells or fixed fibroblasts decreased in enzyme expression. This suggests that cell contact is required for the enhancement of MMP production. In addition, the expression of MMP2 and MMP9 by HN4 and HN12 was augmented when cultured in conditioned media derived from those cells. This indicated that autocrine factors were also involved in MMP stimulation. Therefore, it is interesting to investigate effects of cytokines on MMP expression and invitro invasion of the cancer cell lines. Reverse transcription-PCR indicated the presence of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α and TGF β in HNSCC cells. Gingival fibroblasts expressed IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF β and hepatocyte growth factor (HGF). Co-culture cancer cells and fibroblasts obviously stimulated the expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α and TGF β . Type I collagen, autocrine and paracrine factors could also induce cytokine expression in HNSCC cells. MMP expression in cancer cells was enhanced by IL-1 α , IL-1 β , TNF α , TGF β and HGF. The cytokines dramatically stimulated the expression of MMPs in invasive cancer cell lines (HN12, HN31). All cytokines enhanced the invitro invasion of HNSCC and HaCaT cells, especially in HN4 and HN31. Taken together, our findings suggest that cell-matrix, cell-soluble factors and/or cell-cell interaction enhance the production of MMP2 and MMP9 and tumor invasion. The results also point to an important role of cytokines in the regulation of MMP production and cancer cell motility.

Executive Summary

โครงการวิจัย บทบาทของ ไฟโบรบลาสต์และไซโตไคน์ในการรุกรานและสร้าง matrix metalloproteinase ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ

มะเร็งศีรษะและลำคอเป็นมะเร็งที่มีความชุกสูงเป็นอันดับที่ 5 ของมะเร็งทั้งหมดที่พบในประเทศไทย และเป็นมะเร็งที่มีอัตราการรอดในระยะ 5 ปี (five-year survival rate) ต่ำ โดยพบว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดความยุ่งยากในการรักษาคือการรุกรานและแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น การวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบพฤติกรรมของการรุกรานภายนอกร่างกายและการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ที่เกี่ยวข้องกับการทำลาย basement membrane ซึ่งเป็น extracellular matrix ที่กั้นระหว่างชั้นเยื่อผิว (epithelium) กับเนื้อเยื่อ ยึดต่อ(connective tissue)โดยเลือกศึกษาเฉพาะMMP-2และMMP-9 ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองมีคุณสมบัติเด่นคือสามารถย่อย collagen ชนิดที่ IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ basement membrane ได้ การศึกษานี้ใช้เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ 2 คู่ ที่มาจากบุคคลเดียวกัน โดยเป็นเซลล์ที่ได้จากรอยโรคบริเวณเริ่มต้น (HN4 และ HN30) กับบริเวณรอยโรคที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง (HN12 และ HN31) และเลือก HaCaT ซึ่งเป็น keratinocyteปกติที่ได้จากผิวหนังเป็นเซลล์ควบคุม ซึ่งการศึกษาโดยใช้เซลล์มะเร็งที่มาจากบุคคลเดียวกันจะมีผลดีกล่าวคือกำจัดตัวแปรอื่นๆที่เกิดจากการใช้เซลล์ต่างบุคคลได้

ผลการวิจัยนี้พบว่าเซลล์มะเร็งที่ศีรษะและลำคอทุกชนิดที่นำมาศึกษาเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นจะมีความสามารถสร้าง MMP-2 ได้เสมอ ในขณะที่ การแสดงออกของ MMP-9 ซึ่งเป็น MMPที่ถูกเหนี่ยวนำได้ นั้น อาจมีมากหรือน้อยก็ได้และพบว่าเซลล์มะเร็งที่รุกรานมีการแสดงออกของ MMP มากและน้อย ไม่ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของรอยโรค ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้เป็นเรื่องที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของ extracellular matrix ซึ่งในที่นี้เลือก basement membrane และcollagen ชนิด I ซึ่งเป็น extracellular matrix ที่พบมากในชั้นเนื้อเยื่อยึดต่อพบว่า collagenชนิดที่ I มีบทบาทกระตุ้นการสร้าง MMP-2 และ MMP-9 โดยเชื่อว่าการกระตุ้นกระตุ้นดังกล่าวอาจเป็นไปโดย signal transduction ที่อาศัย อันตรกิริยาระหว่าง integrin บนผนังเซลล์ กับ collagen ชนิดที่ I

ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นที่น่าสนใจมากทั้งนี้เนื่องจากรายงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าcollagen ชนิดที่ I กระตุ้นการสร้าง MMP-2 และมีรายงานน้อยมากที่กล่าวถึงผลต่อ MMP-9 การศึกษาอิทธิพลของไฟโบรบลาสต์ต่อเซลล์มะเร็ง โดยการเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากช่องปากกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอพบว่าสามารถกระตุ้น MMP-2 และ MMP-9 โดยการกระตุ้นดังกล่าวเกิดจากการที่เซลล์มีการสัมผัสกันโดยตรงหรือได้รับสารที่คัดหลั่งมาจากเซลล์ (soluble factors) การศึกษาระดับการแสดงออก mRNA ของ IL- 1 α , IL-1- β , IL6, TGF- β , TNF- α และ hepatocyte growth factor (HGF) พบว่าเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ IL- 1 α , IL- 1- β , IL6, TGF- β และ TNF- α ในขณะที่ไฟโบรบลาสต์ มีการแสดงออกไซโตไคน์ทั้ง 6 ชนิดและเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกันจะส่งผลกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ดังกล่าว นอกจากนั้นไซโตไคน์ยังมีผลกระตุ้นการสร้าง MMP-2 และ MMP-9 และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงทำให้เชื่อว่าไซโตไคน์เหล่านี้มีบทบาทต่อการสร้าง MMPs และ การรุกรานของเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะ IL-1 α , IL-1 β และ TNF- α จะมีบทบาทสูงมาก ผลการวิจัยนี้สนับสนุน แนวคิดที่ว่านอกจากเซลล์มะเร็งชนิดที่รุกรานจะมีการเปลี่ยนแปลงในgeneของตัวเองแล้วการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่มีอยู่รอบๆมีการเอื้อให้เกิดกระบวนการสร้างMMPsและการรุกรานก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ ความรู้ที่ได้นี้อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งกระบวนการรุกรานและแพร่กระจายโดยมุ่งจัดการที่เซลล์อื่นๆที่อยู่ล้อมรอบเซลล์มะเร็ง

บทนำ

มะเร็งศีรษะและลำคอเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับต้นๆของมะเร็งทั้งหมดที่พบในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งช่องปากที่พบมากเป็นอันดับที่5ในเพศชายและอันดับที่7ในเพศหญิงโดยมีอัตราการเป็นโรค(age-standard rate, ASR)ต่อประชากร100,000คนเท่ากับ5.5และ4.1ในเพศชายและหญิงตามลำดับ(1) การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าsquamous cell carcinoma(SCC)เป็นมะเร็งชนิดที่พบได้มากที่สุด ในมะเร็งศีรษะและลำคอ(2) ในปัจจุบันการรักษามะเร็งชนิดนี้ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพออัตราการรอด5ปี(5-year survival rate)ของมะเร็งช่องปาก คอหอย และหลอดเสียงเท่ากับร้อยละ 20-43,8-25และ25-62 ตามลำดับ ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรักษาคือความสามารถในการรุกราน(invasion)และแพร่กระจาย(metastasis) ไปยังอวัยวะอื่นๆ(3) การศึกษาผู้ป่วยมะเร็งช่องปากที่รักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์จำนวน1200ราย พบว่า มีการแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง ปอด ตับ และสมอง(4) ดังนั้นการศึกษาในเรื่องการรุกรานและ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจึงเป็นสิ่งจำเป็น กระบวนการรุกรานและแพร่กระจายของมะเร็งประกอบด้วยหลายขั้นตอน มะเร็งชนิดsquamous cell carcinomaเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นภายในชั้นเยื่อบุผิว(epithelium) ซึ่งปกติมีbasement membraneทำหน้าที่กั้นแยกชั้นดังกล่าวจากชั้นเนื้อเยื่อยึดต่อ(connective tissue) ดังนั้นการที่เซลล์จะลุกลามได้นั้นจำเป็นต้องมีการทำลายbasement membraneซึ่งเป็นขั้นตอนแรกๆในกระบวนการดังกล่าวก่อนที่จะมีการแพร่ของเซลล์มะเร็งไปตามเส้นเลือดและหลอดน้ำเหลืองสู่อวัยวะอื่น(5) โดยมีหลักฐานว่าเซลล์มะเร็งชนิดรุกราน(invasive cancer cell)มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ทำลายbasement membraneได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่มmatrix metalloproteinases(MMPs)

MMPsเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานโดยต้องอาศัยZnเอนไซม์เหล่านี้ส่วนมากจะถูกคัดหลั่งในรูปproenzymeซึ่งต้องถูกย่อย N-terminal บางส่วน(proteolytic cleavage)เพื่อเป็นการactivateเอนไซม์ให้อยู่ในรูป active ปัจจุบันมีการแบ่งMMPsเป็นกลุ่มต่างๆ ซึ่งได้แก่ collagenases stromelysins gelatinases membrane-type MMPs และMMPs ชนิดอื่นที่ไม่สามารถจัดเข้าเป็นกลุ่มได้(6) อย่างไรก็ตามการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างMMPsและการรุกรานของเซลล์มะเร็งพบว่าMMP-2(gelatinase A) และMMP-9 (gelatinase B) มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการทำลายbasement membraneมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากว่า เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยองค์ประกอบต่างๆใน basement membrane โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ collagen type IV (7) การศึกษาด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ (8) และทางคลินิก (9) ยืนยันว่าการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 และ MMP-9 เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ มะเร็งศีรษะและ ลำคอ

ในปัจจุบันความรู้เรื่องความสามารถของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอในการสร้าง MMPs ยังมีไม่มากและงานวิจัยส่วนมากทำการศึกษาโดยใช้เซลล์มะเร็งที่ได้จากผู้ป่วยต่างคนกันหรือใช้เซลล์มะเร็งที่มีจำหน่ายโดยทั่วไป จึงทำให้ข้อมูลที่ได้อาจไม่สามารถสรุปความแตกต่างของเซลล์มะเร็งเริ่มต้นและที่แพร่กระจาย อย่างไรก็ตามการศึกษาเบื้องต้นเราพบว่าเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้จากบริเวณเริ่มต้นและที่แพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองในบุคคลเดียวมีการแสดงออกของ MMP-2 และ9ได้ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน (10) จึงทำให้เชื่อว่าน่าจะมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากเซลล์มะเร็งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ทั้งสอง การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อเยื่อที่ติดต่อกันที่มีต่อการเกิดมะเร็งพบว่าไฟโบร بلاสที่อยู่รอบๆรอยโรคมะเร็ง สามารถสร้าง collagen type I,IIและIIIล้อมรอบกลุ่มเซลล์มะเร็ง(11) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไฟโบร بلاสน่าจะมีบทบาทต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็ง อนึ่งการสร้างMMPsนอกจากจะพบได้ในเซลล์มะเร็งแล้วยังสามารถพบในเซลล์อื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไฟโบร بلاสและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ(inflammatory cell)(12) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าเซลล์มะเร็งสามารถสร้างไซโตไคน์ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการสังเคราะห์MMPs (13) ดังนั้นจึงน่าที่จะสนใจบทบาทของไฟโบร بلاสต่อการสร้างMMPsและการรุกรานของ

เซลล์มะเร็ง การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการสร้าง MMP2 และ MMP9 ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จากรอยโรคมะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณเริ่มต้นกับที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยคนเดียว-กันโดยศึกษาทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย extracellular matrix ไฟโบรบลาสหรือไซโตไคน์ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความแตกต่างในการรุกรานนอกกายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของไฟโบรบลาสต่อการสร้าง MMP2 , MMP9 และ การรุกรานนอกร่างกาย (migration และ invitro invasion) ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่เพาะเลี้ยงได้จากบริเวณเริ่มต้นและที่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง

วัตถุประสงค์เฉพาะ

- 1) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของ extracellular matrix ซึ่งได้แก่ basement membrane และ collagen ชนิดที่ 1 (type I collagen) ต่อความสามารถในการคัดหลั่ง MMP2 และ MMP9 ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณเริ่มต้นและที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง
- 2) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการรุกรานนอกกายของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณเริ่มต้นและที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง
- 3) เพื่อศึกษากระบวนการ autocrine และ paracrine ในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไฟโบรบลาสกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอทั้งชนิดที่แพร่กระจายและไม่แพร่กระจายในการสร้าง MMPs
- 4) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของ extracellular matrix (collagen ชนิดที่1) และ ไฟโบรบลาสต่อระดับการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณเริ่มต้นและที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง
- 5) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของไซโตไคน์ต่อการสร้าง MMPs ตลอดจนการรุกรานของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณเริ่มต้นและที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง

วัสดุและวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยง cell line

ในการทดลองนี้ใช้ cell line 5 ชนิด ได้แก่ immortalized human keratinocyte (HaCaT) และเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ (HN4, 12, 30 และ 31) ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. Silvio Gutkind (ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้) National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR), National Institute of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกา เซลล์ HN4 และ HN12 เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยคนเดียวกัน โดย HN4 ได้จากรอยโรคบริเวณลิ้นและ HN12 ได้จากรอยโรคมะเร็งที่แพร่ไปยังต่อมน้ำเหลือง เซลล์ HN30 และ 31 เป็นเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยคนเดียวกันที่รอยโรคบริเวณคอหอยและต่อมน้ำเหลือง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี fetal calf serum 10% Streptomycin 100 ไมโครกรัม/มล. และ Penicillin 100 หน่วย/มล. ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี CO₂ และอากาศ ร้อยละ 5 และ 95 ตามลำดับ โดยมีอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์กระทำโดยการเก็บชิ้นเนื้อที่ได้รับคามยินยอมจากผู้ป่วยที่มีการผ่าตัด ฟันคุด บริเวณ retromolar pad ของฟันซี่ 48 ใน collection medium ซึ่งประกอบด้วย DMEM streptomycin 100 ไมโครกรัม/มล. และ penicillin 100 หน่วย/มล. นำชิ้นเนื้อที่ได้มาล้างด้วย sterile PBS 2-3 ครั้ง แล้วแยกเอาบริเวณที่เป็นเศษ เนื้อที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลบ.มม. แล้ววางชิ้นเนื้อใน culture dish ขนาด 8 ตร.ซม. ประมาณ 8-12 ชิ้นต่อ plate จากนั้นเติม DMEM ที่มี fetal calf 10% ปริมาณ เล็กน้อยเพื่อให้เป็นฟิล์มบาง ๆ และวางไว้ใน CO₂ incubator ประมาณ 12 ชม. เพื่อให้ชิ้นเนื้อยึดติด กับ plate แล้วจึงเพิ่มปริมาตรของ media ให้ได้ประมาณ 2-3 มล. ทำการ incubate จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโต (outgrowth) จากชิ้น explant แล้วจึงนำเอาชิ้น explant ออก จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนกระทั่งได้ประมาณ 50% ของ พื้นผิวภาชนะ (plate) จึง subculture ประมาณ 3 passages เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำการแบ่งเซลล์ส่วนหนึ่ง เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ passage ที่ 3-10

2. การศึกษาผลของ substrate ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

การวิจัยนี้ศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์บน substrate 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ พลาสติก (Poly-L-lysine) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เพาะเลี้ยงทั่วไป basement membrane (Matrigel) และ collagen type I ซึ่งเป็นสารที่พบทั่วไปใน extracellular matrix

2.1 การสกัด basement membrane

กระทำที่ NIDCR ซึ่งการดำเนินการวิจัยร่วมกับ Dr. Hynda Kleinman ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ โดยทำการสกัดจากหนูที่มีเนื้องอก sarcoma ชนิดที่สร้าง basement membrane มาก (Engelbreth-Holm-Swarm, EHS) (14) เมื่อทำการฆ่าหนูแล้วก็เก็บเนื้องอกมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1-2 ซม. แล้วทำการ homogenize เนื้องอกภายใต้ 3.4 M NaCl buffer ที่เย็น แล้วปั่นเพื่อตกตะกอนชิ้นเนื้อที่ 8000 xg เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนำ pellet มา homogenize อีกครั้งใน 3.4 M NaCl buffer ปั่นเก็บชิ้นเนื้อแล้ว homogenize อีกครั้งใน 2M Urea buffer ที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั่นแล้วแยกเก็บ supernatant ทำการสกัด supernatant อีกครั้ง โดย 2M Urea buffer แล้วเก็บ supernatant สุดท้ายซึ่งจะมี basement membrane (Matrigel) ทำการ dialysis โดยใช้ 5% chloroform ใน TBS ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วเก็บ Matrigel ไว้ที่ -80°C ทำการวัดปริมาณโปรตีนใน Matrigel โดยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA) (15) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท Pierce, Rockford, IL ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 การวัดปริมาณโปรตีน (BCA assay)

ใช้ sample ปริมาตร 10 ml ต่อ microtiter plate well (96 wells) ผสมกับ working solution ซึ่งได้แก่ Reagent A : Reagent B (50:1) 200 ml ต่อ well (Reagent A ประกอบด้วย sodium bicarbonate, sodium carbonate, bicinchoninic acid และ sodium tartrate ใน 0.2 N sodium hydroxide และ Reagent B ประกอบด้วย 4% cupric sulfate) ทำการผสมโดยใช้ plate shaker เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น incubate plate ที่ 37°C ปล่อยให้ plate เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 570nm แล้วคำนวณปริมาณโดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ bovine serum albumin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

2.3 การเคลือบ substrate บนภาชนะเลี้ยงเซลล์

Matrigel

ทำการเคลือบ Matrigel ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) โดยใช้ Matrigel ที่เจือจางด้วย serum free-DMEM เมื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนเข้มข้น (135 µg/50 µl) ต่อ well ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เพื่อให้ gel เกิด polymerization จากนั้นดูดเอา solution ที่เหลือออก แล้วล้างด้วย sterile PBS ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ (16)

Collagen ชนิดที่ I

ทำการเตรียม collagen type I (บริษัท Biochrom KG seromed, เบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี) ตาม instruction ของบริษัท ฯ โดยเจือจางด้วย cold sterile PBS (1:1) เพื่อให้โปรตีนเข้มข้น 500 mg/1 ml ทำการเคลือบ collagen (25µg/50µl) ลงบน (6-well plate) แล้วปล่อยให้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เพื่อให้เกิด polymerization จากนั้นดูดเอา solution ที่เหลือออก แล้วล้างออกด้วย sterile PBS แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์

2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์ HaCaT, HN4, HN12, HN30 และ HN31 บน 6-well plate ที่ไม่เคลือบ substrate และที่เคลือบด้วย Matrigel หรือ collagen type I โดยใช้เซลล์เริ่มต้น ประมาณ 10^5 เซลล์/plate ซึ่งได้จากการ trypsinization ด้วย 0.05% Trypsin EDTA และนับปริมาณเซลล์โดยใช้เครื่องนับเซลล์ (Coulter electronic cell counter, Model Z1, บริษัท Coulter Corporation) ทำการเลี้ยง เซลล์แต่ละชนิดเป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน แล้วจึงนำมาศึกษาการปรากฏของเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)

3. การศึกษา MMPs

3.1 การรวบรวมเก็บ conditioned media

เซลล์ที่ทำมาศึกษาจะถูกเลี้ยงบน six well plate จนกระทั่ง confluence 100% จากนั้นทำการเปลี่ยน media ใหม่ เป็น serum free DMEM medium แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชม. ทำการเก็บ conditioned media ที่ได้นี้แล้วนำมากำจัดสิ่งสกปรกโดยการปั่นที่ 1000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการ concentrate ให้เข้มข้นขึ้น 20 เท่า โดยใช้ membrane ที่มี molecular weight cut-off ที่ 10 kDa (Centricon 10, Amicon, Beverly, MA)

3.2 การตรวจสอบ MMPs

conditioned media ที่ได้จะถูกนำมาตรวจหา MMPs ด้วยวิธี nonreducing SDS-PAGE (17) โดยนำ conditioned media มาแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE เมื่อได้ band ของโปรตีนตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ แล้วล้าง SDS ออกโดยใช้ 2.5% triton x-100 ทำการ activate เอนไซม์ด้วย renaturing buffer ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris, pH8, 5 mM CaCl₂ และ 10^{-6} M ZnCl₂ ณ อุณหภูมิ 37°C เป็น

เวลา 12–18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาย้อมโปรตีน ด้วย 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 และ destain ด้วยน้ำยาที่มี methanol, glacial acetic acid และน้ำในอัตราส่วน 5:1:4 MMPs หรือ gelatinase activity ที่ได้จะแสดง ในรูปของ แถบใสอันเนื่องมาจากเอนไซม์ MMPs ได้สลาย gelatin ที่เป็น substrate ไป โดย proenzyme MMP9 จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92 kDa สำหรับ activated MMP9 มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลง 10 kDa ในขณะที่ Proenzyme MMP2 มีน้ำหนักโมเลกุล 72 kDa และ activated form มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลงประมาณ 10 kDa เช่นเดียวกัน

3.3 การทำ Densitometric analysis

ทำการตรวจ gelatinase activity แบบ semiquantitative analysis ด้วยการ scan gel ที่ได้จากการตรวจหา MMPs โดยใช้ Acer Scan Prisa 620 UT flatbed scanner ซึ่งเป็นการ scan โดยใช้ software Ulead Photo System ที่มี resolution 300 dpi และใช้ transparency mode จากนั้นจึงคำนวณความเข้มและพื้นที่ของแถบ ด้วยโปรแกรม Scion Image for Window (Scion, Frederick, MD) โดยจะแสดงค่าเป็น intensity (pixel) $\times$ mm^2 แล้วทำการ normalize activity ของ MMP ด้วยจำนวนเซลล์

3.4 Western blotting

ทำการยืนยันชนิดของ MMPs และ TIMP ด้วยการทำ Western blotting ภายหลังจากการทำ SDS-PAGE โดยใช้ 12% gel แล้วให้โปรตีน transfer ผ่าน nitrocellulose ที่มีความพรุนขนาด 0.45 μm (MSI, Westboro, MA) แล้วย้อม primary antibody ต่อ MMP2, MMP9 TIMP1 หรือ TIMP2 (Sigma, Saint Louis, MS) ที่ความเข้มข้น 1:1000 เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย Immunoblot kit (Amplified Opi-4CN Detection kit, Biorad) ซึ่งในการทำ immunoblot นี้ใช้ conditioned media จากเซลล์ fibrosarcoma (HT1080) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้าง MMP2 และ MMP9 เป็น positive control

4. In vitro invasion และ migration assay

ทำการศึกษา *in vitro* invasion โดยใช้ Blind Well Boyden Chemotaxis Chamber (Neuroprobe, Bethesda, MD) โดย chamber นี้จะมี 2 ส่วน คือ upper และ lower chamber ซึ่ง chamber ทั้งสองจะถูกแยกจากกันด้วย polycarbonated filter ที่มี pore size 12 μm (Osmonic, Minneapolis, MN) ที่เคลือบด้วย basement membrane (Matrigel) ความเข้มข้น 1 mg/mm^2 โดย lower chamber จะมี media ที่มีสารทำหน้าที่เป็น chemoattractant คือ conditioned media ของ NIH-3T3 ที่เลี้ยงใน DMEM ที่มี 0.1% bovine serum albumin (BSA) และวิตามิน C 0.005% ในการศึกษา invasion นั้นให้ทำการปรับจำนวนเซลล์ที่ต้องการศึกษา โดยใช้ปริมาณ 400 μL (20000 เซลล์) จากเซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/มล. ใน DMEM ที่มี BSA 0.1% และวิตามิน C 0.005% ใส่ลงบน upper chamber แล้ว incubate blind well Boyden Chamber ที่ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำ polycarbonate filter มา fix และ stain เซลล์ที่ invade ผ่านจาก chamber บน มาสู่ filter ด้านล่างด้วย 0.5% crystal violet ใน 25% methanol ทำการประมาณเซลล์ที่ invade ด้วยการชั่งน้ำหนัก 5 พื้นที่ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast ที่กำลังขยาย 200x หรือ 400x และทำการเฉลี่ยค่าที่อ่านได้โดยใช้ mean โดยในการทดลองนี้จะทำการศึกษาอย่างน้อย 3 ครั้งในเซลล์แต่ละชนิด สำหรับการตรวจหา migration ให้กระทำเช่นเดียวกับการทดลอง invasion เพียงแต่เปลี่ยนการเคลือบ polycarbonate filter จาก Matrigel เป็น 0.1% gelatin ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{L}/\text{filter}$ (18)

5. การศึกษาผลของ substrate ต่อการสร้าง MMPs

6

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT บน 6-well plate ปกติและที่เคลือบด้วย Matrigel เข้มข้น 135 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ หรือ collagen type I เข้มข้น 25 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ จน confluence 100% ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน แล้วจึงเก็บรวบรวม conditioned media ตามกระบวนการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เพื่อนำมาหา MMPs activity

6. invasion และ migration ของเซลล์ต่างๆ

ทำการศึกษา invasion และ migration โดยใช้เซลล์ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT นอกจากนั้นยังศึกษาผล conditioned media ที่ได้จากไฟโบรบลาสต่อการ invasion ซึ่งในการทดลองดังกล่าวจะใส่ conditioned media ที่ต้องการศึกษาไว้ใน lower chamber แทน media ที่ได้จาก NIH 3T3

7. การทดลอง Co-cultivation

ทำการศึกษาผลของไฟโบรบลาสต่อการสร้าง MMPs ของเซลล์ HN4, HN12, HN30 HN31 และ HaCaT โดยเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส ใน 24well plate จน confluence แล้วจึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มา trypsinization และนับจำนวนเซลล์อย่างน้อย 3 หลุม โดยใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (Coulter counter) เมื่อทราบจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสแล้ว จึงใส่เซลล์มะเร็งหรือเซลล์ HaCaT ลงไปใน well ที่เหลือด้วยอัตราส่วน 1x หรือ 0.5 x ของเซลล์ไฟโบรบลาส นอกจากนั้นยังได้ศึกษาเปรียบเทียบผล โดยทำการ fix เซลล์ไฟโบรบลาสเพื่อไม่ให้สามารถสร้าง MMPs ด้วย methanol 80% แล้ว incubate เป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ HN หรือเซลล์ HaCaT อนึ่งเพื่อให้สามารถทราบได้ว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ MMPs ที่เกิดจาก coculture นั้นส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์ชนิดใด จึงได้ทำการ fix เซลล์ HN ชนิดต่างๆ และ HaCaT เช่นเดียวกันก่อนที่จะเลี้ยงร่วมกับไฟโบรบลาสที่มีจำนวน 1x หรือ 0.5 x ทำการเลี้ยง co-culture ไป 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น free serum DMEM แล้วเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จึงเก็บ conditioned media ที่ได้ไปตรวจหา activity ของ MMPs

8. การวัดระดับ mRNA ของไซโตไคน์

ทำการเลี้ยงเซลล์ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT บนภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จนได้ confluence 100% จากนั้นทำการรวบรวมเซลล์โดยวิธี trypsinization แล้วนำ เซลล์ มาสกัด total RNA โดยใช้ SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA) ทำการ ตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วยการวัด absorbance ที่ 260/280nm และทำ agarose electrophoresis จากนั้นจึงนำ RNA ที่ได้มาทำ RT-PCR เพื่อตรวจวัดระดับ mRNA ของ interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β) และ hepatocyte growth factor (HGF) โดยใช้ glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น internal control โดยการทดลองนี้ได้ทำการสังเคราะห์ primer ซึ่งมีลำดับ base แสดงไว้ในตารางที่ 1 การทำ RT-PCR ดำเนินโดยใช้ one-step RT-PCR kit (Quiagen, CA, USA) และมีวงจร การเปลี่ยนอุณหภูมิในแต่ละ cycle ดังนี้ 94°C (1 นาที), 58°C (1 นาที), 72°C (1 นาที) และ amplify 30-35 cycle โดยใช้ RNA template ปริมาณ 1mg เท่ากันในทุกปฏิกิริยา จากนั้นทำการตรวจสอบ product ที่ได้โดย agarose electrophoresis ที่ความเข้มข้น gel เท่ากับ 1.5% และเปรียบเทียบความถูกต้องของจำนวน base กับ standard โดยใช้ Gel Doc 1000 (BioRad)

แล้วจึงทำการประมาณระดับmRNA จาก ความเข้ม (density,pixel) และพื้นที่ ของแต่ละbandด้วย Scion Image for Window (Scion, Frederick, MD,USA) ทำการnormalize ค่าที่ได้ด้วยdensityของ internal control (GAPDH)

ตารางที่ 1 ลำดับbaseของprimerในการทำRT-PCR		
<i>Gene</i>	<i>Sequence of primer</i>	<i>PCR product (base pair)</i>
IL-1α		
sense	5-ATGGCCAAAGTTCGAGACATG-3	816
antisense	5-CTACGCCTGGTTTTCCAGTATCTGAAAGTCAGT-3	
IL-1β		
sense	5-ATGGCAGAAGTACCTAAGCTC-3	810
antisense	5-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGT-3	
IL-6		
sense	5-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3	639
antisense	5-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3	
TNF-α		
sense	5-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3	702
antisense	5-TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC-3	
TGF-β		
sense	5-ACCGCAACAACGCCATCTTAT-3	182
antisense	5-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3	
HGF		
sense	5-GGACAAAGGAAAAGAAG-3	490
antisense	5-GATTGCTTGTGAAACACC-3	
GAPDH		
sense	5-ACGCATTTGGTCGTATTGGG-3	231
antisense	5-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3	

9.ผลของไฟโบรบลาสต์ต่อการสร้างไซโตไคน์

ทำการเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมโดยใช้จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อ 1 หลุมแล้วให้เซลล์เจริญเติบโต ประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมเซลล์ที่ต้องการศึกษาซึ่งในที่นี้ได้แก่ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อ 1 หลุม ปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตร่วมกัน 18 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยน media เป็น serum free media แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 18 ชั่วโมง โดยในการทดลองแต่ละครั้งจะทำแบบ triplicate ต่อ 1 cell line และใช้ไฟโบรบลาสต์, เซลล์ HN หรือ HaCaT ที่เลี้ยงแยกต่างหากคู่ขนานเป็น control จากนั้นรวบรวมเซลล์โดยวิธี trypsinization นับจำนวนเซลล์แล้วทำการสกัด total RNA และทำ RT-PCR

10.ผลของcollagen, autocrine และparacrineต่อการสร้างไซโตไคน์

10.1 ผลของcollagen

ทำการเคลือบcollagen ชนิดที่ I เข้มข้น 0.5 mg/ml ลงบนถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมโดยใช้collagen ปริมาตร 1 ml ต่อ 1 หลุม แล้ว incubate ที่ 37°C เพื่อให้ collagen แข็งตัวแล้วจึงทำ การsterilization โดยUV เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วล้างcollagen ที่เคลือบอีกครั้งด้วย PBS ทั้งนี้เพื่อกำจัดความเป็นกรดอันอาจเกิดจาก collagen solution เติมเซลล์ที่ต้องการศึกษา (ซึ่งในที่นี้เลือกเฉพาะ HN4 และ HN12 ทั้งนี้เนื่องจากผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นชัดว่าเซลล์คู่นี้ตอบสนองต่อcollagen ได้ดี) จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อ 1 หลุม ปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตจนได้ 90% confluence แล้วจึงทำการเปลี่ยน media เป็น serum free media และ incubate เซลล์ต่อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการเก็บรวบรวมเซลล์ นับจำนวนและนำไปสกัด RNA และทำ RT-PCR ดังที่กล่าวมาแล้ว

10.2 ผลของกระบวนการautocrineและparacrineในการสร้างไซโตไคน์

ทำการเลี้ยงเซลล์ HN4 และ HN12 จำนวนเริ่มต้น 4×10^5 เซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 ซม แล้วปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตจนได้ประมาณ 80% confluence จากนั้นจึงเติม conditioned media ของเซลล์ ชนิดเดียวกัน (HN4 หรือ HN12) หรือ conditioned media ของไฟโบรบลาสต์ ซึ่ง media ดังกล่าวเป็น serum free media และ ผ่านการทำลาย endogenous gelatinase โดยใช้ความร้อน 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง incubate เซลล์ต่อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บ media และรวบรวมเซลล์โดยวิธี trypsinization นับเซลล์ที่ได้แล้ว สกัด RNA แล้วนำมาทำ RT-PCR เพื่อตรวจหา mRNA ของไซโตไคน์

11.ผลของไซโตไคน์ต่อการสร้างMMPs

ทำการเลี้ยงเซลล์ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT จำนวน 10^5 เซลล์ต่อหลุมในถาดเลี้ยงเซลล์ ชนิด 24 หลุม ปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตจนได้ 100% confluence แล้วจึงเติมไซโตไคน์ ($\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$ และ HGF) เข้มข้น 1 ng/ml โดยให้ไซโตไคน์เหล่านั้น ละลายใน DMEM ที่มี BSA 0.1% ทำการ incubate เซลล์ ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บ conditioned media เพื่อนำมาวัด MMPs activity ด้วยวิธี zymogram ซึ่งในการทดลองทุกครั้ง จะใช้ DMEM ที่มี BSA 0.1% เป็น control โดย activity ของ MMPs ที่ได้จะถูก normalize ด้วยจำนวน เซลล์ และแสดงค่าในรูป relative enhancement ซึ่งเป็นค่าที่ได้ภายหลังจากนำไปเปรียบเทียบกับ baseline ที่ได้จากการ กระตุ้น โดย serum free media ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

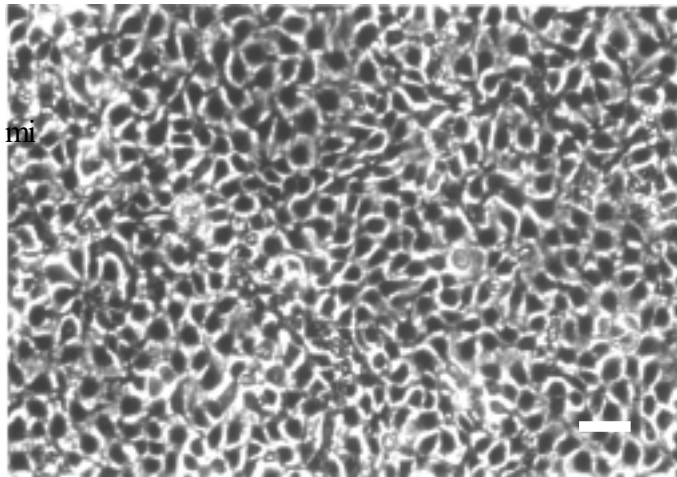
12.ผลของไซโตไคน์ต่อการรุกราน

การศึกษา in vitro invasion กระทำ โดยใช้ Blind well Boyden Chemotaxis Chamber ทำการเคลือบ polycarbonate filter ที่มี pore size 12 mm ด้วย reconstituted basement membrane (Matrigel) เข้มข้น 1 mg/mm² โดยใน chamber บนมีเซลล์ HN4, HN12, HN30, HN 31 หรือ HaCaT จำนวน 2x10⁴/400 mL ใน DMEM ที่มี BSA 0.1% และวิตามิน C 0.005% ส่วน chamber ล่างจะใส่สารที่ต้องการศึกษาซึ่งในที่นี้คือ IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β หรือ HGF เข้มข้น 1 ng/ml ใน DMEM ที่มี BSA 0.1% และวิตามิน C 0.005% ทำการ incubate เซลล์ที่ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาย้อมและวัดเซลล์ที่ invade ผ่าน polycarbonate filter ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ DMEM ที่มี BSA 0.1% และ วิตามิน C 0.005% เป็น control โดยค่า invasion ที่เกิดจากไซโตไคน์จะถูกนำไป เปรียบเทียบกับค่า baseline ของกลุ่มควบคุมในเซลล์แต่ละชนิด

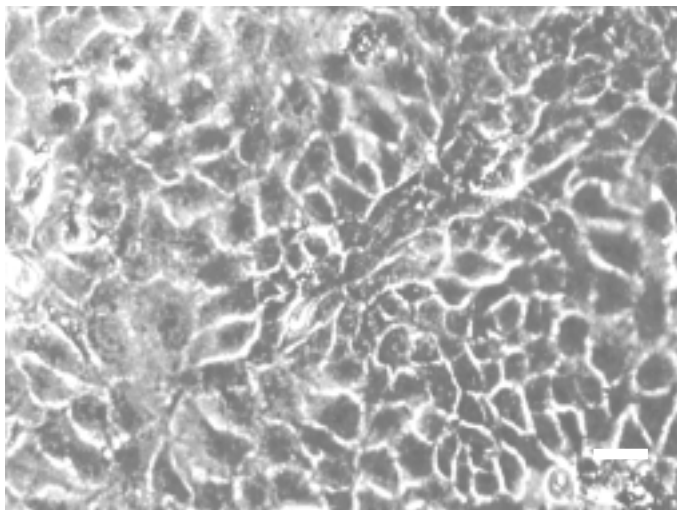
ผลการทดลอง

1. ผลของ substrate ต่อรูปร่างของเซลล์

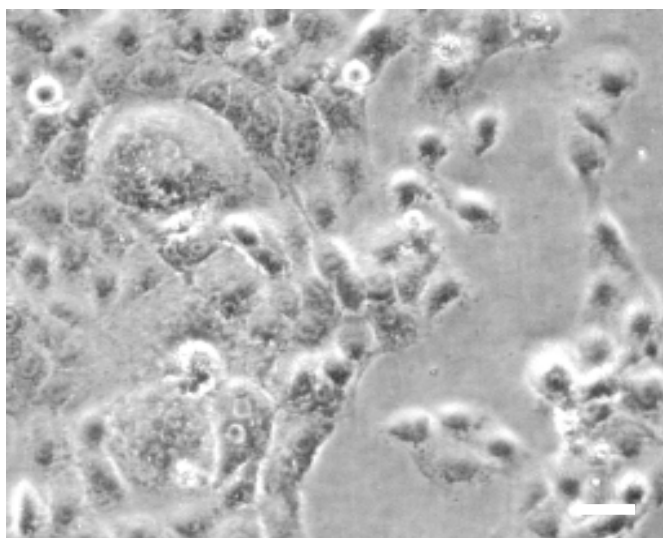
จากการศึกษาผลของ substrate ซึ่งได้แก่ พลาสติก basement membrane และ collagen type I ต่อลักษณะรูปร่างของเซลล์ทั้ง 5 ชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 1-14) โดยพบว่าเซลล์ทั้ง 5 ชนิด เจริญเติบโตได้ดีใน substrate ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า basement membrane และ collagen type I ไม่มีบทบาทต่อลักษณะและการเจริญเติบโตของ Keratinocyte ปกติและเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดยคุณลักษณะของเซลล์แต่เพียงอย่างเดียวยังไม่พอเพียง ดังนั้นจึงได้มีผลการศึกษาของ substrate ต่อการคัดหลั่ง MMPs ทั้งนี้เนื่องจากว่าเซลล์มะเร็งที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ เป็นเซลล์ที่เกิดใน primary site ของรอยโรค กับเป็น metastatic cells ที่ได้จากต่อมน้ำเหลือง ซึ่งคาดว่าเซลล์ทั้ง 2 ประเภทนี้น่าจะมีการสร้าง proteolytic enzyme หรือ MMPs ได้แตกต่างกัน



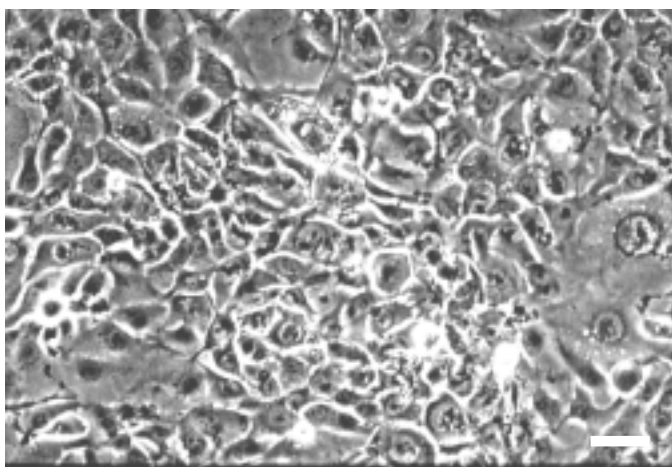
รูปที่ 1 ลักษณะเซลล์ HN4 เจริญเติบโตบนพลาสติก
(scale bar = 200 μm)



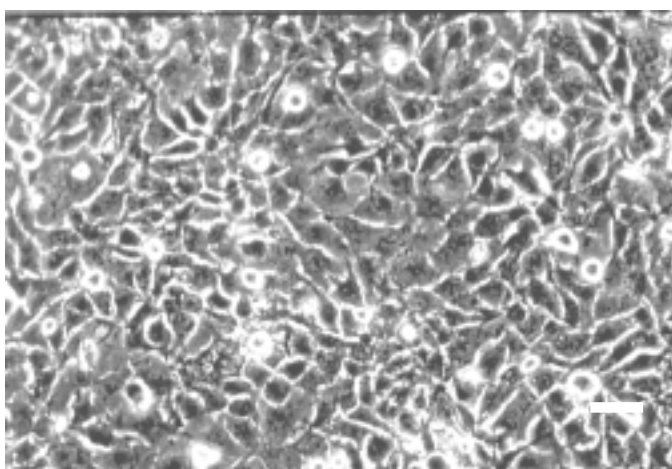
รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์ HN4 เจริญเติบโตบน Collagen ชนิดที่ I (scale bar = 100 μm)



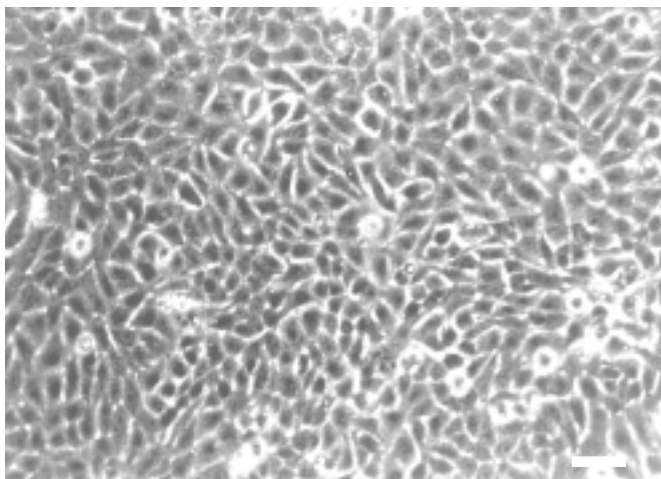
รูปที่ 3 ลักษณะเซลล์ HN12 เจริญเติบโตบนพลาสติก
(scale bar = 100 μm)



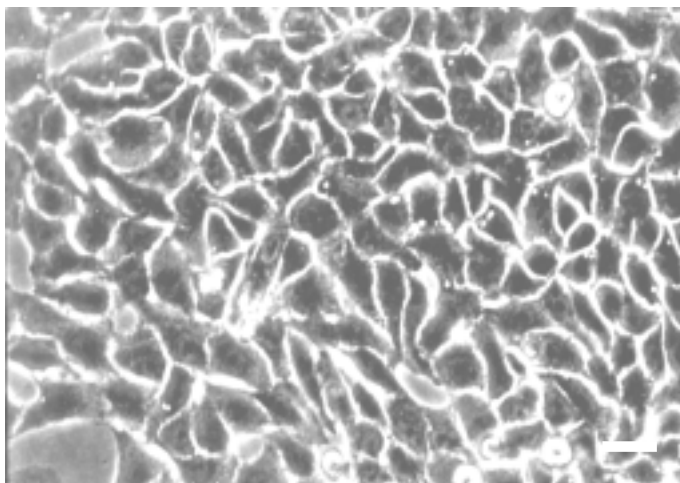
รูปที่ 4 ลักษณะเซลล์ HN12 เจริญเติบโตบน
Matrigel (scale bar = 100 μm)



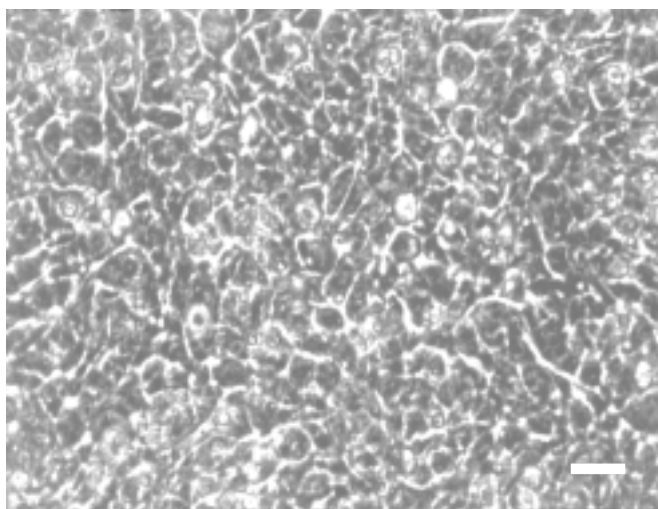
รูปที่ 5 ลักษณะเซลล์ HN12 เจริญเติบโตบน
Collagen ชนิดที่ I (scale bar = 100 μm)



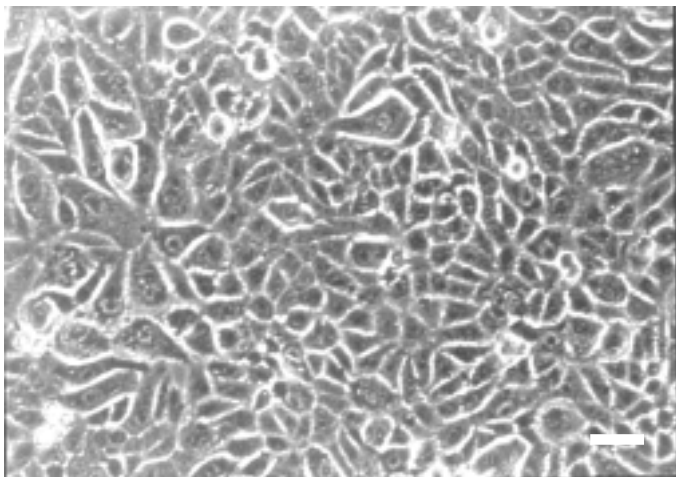
รูปที่ 6 ลักษณะเซลล์ HN30 เจริญเติบโตบน
พลาสติก (scale bar = 200 μm)



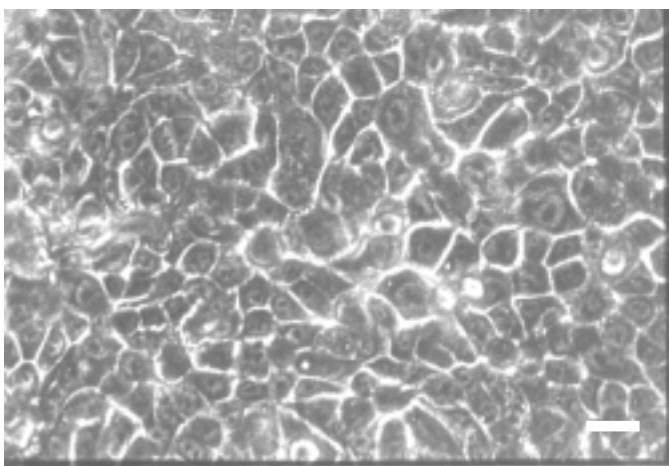
รูปที่ 7 ลักษณะเซลล์ HN30 เจริญเติบโตบน
Matrigel (scale bar = 100 μm)



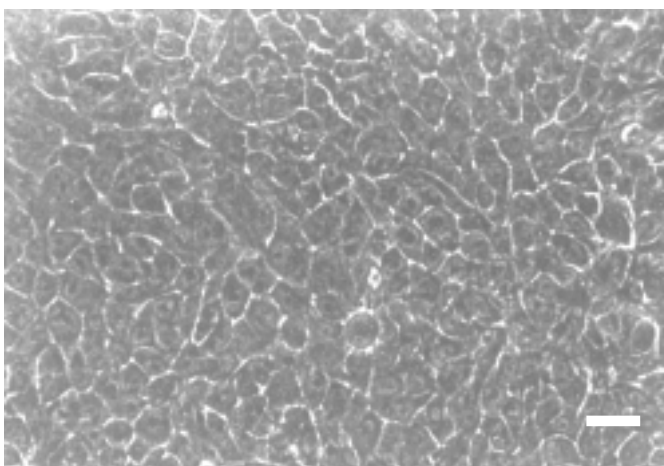
รูปที่ 8 ลักษณะเซลล์ HN30 เจริญเติบโตบน
Collagen ชนิดที่ I (scale bar = 100 μm)



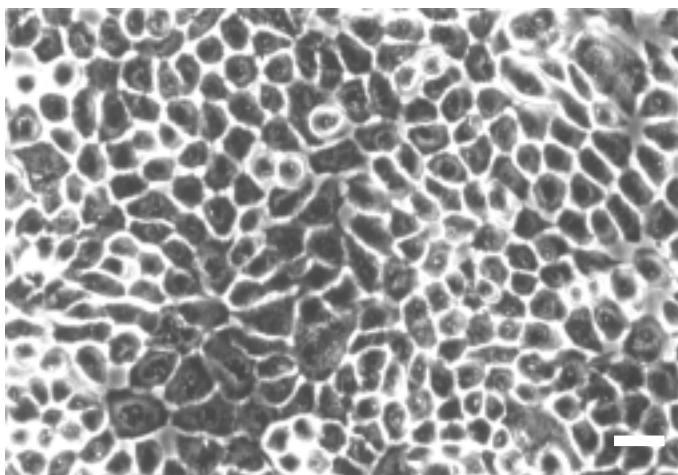
รูปที่ 9 ลักษณะเซลล์ HN31เจริญเติบโตบนพลาสติก
(scale bar = 100 μm)



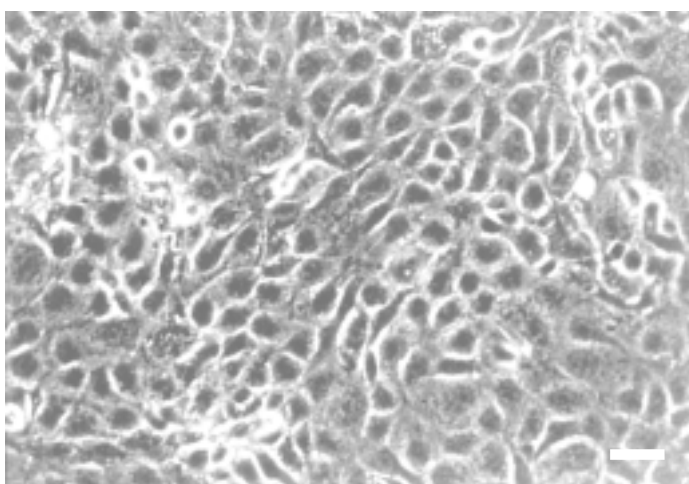
รูปที่ 10 ลักษณะเซลล์ HN31เจริญเติบโตบน
Matrigel (scale bar = 100 μm)



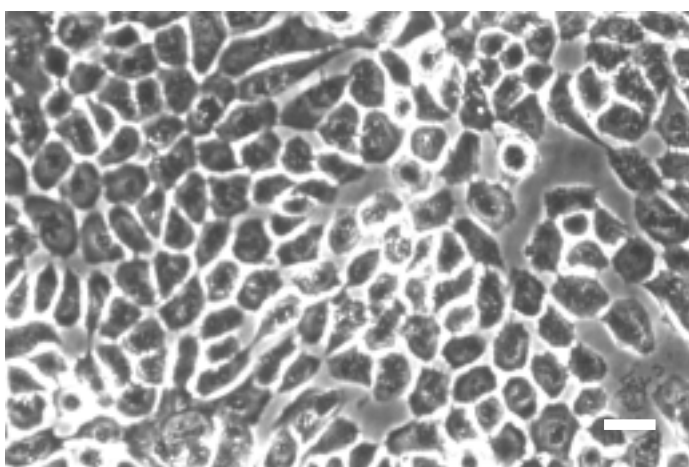
รูปที่ 11 ลักษณะเซลล์ HN31เจริญเติบโตบน
Collagen ชนิดที่ I (scale bar = 100 μm)



รูปที่ 12 ลักษณะเซลล์ HaCaT เจริญเติบโตบน
พลาสติก (scale bar = 100 μm)



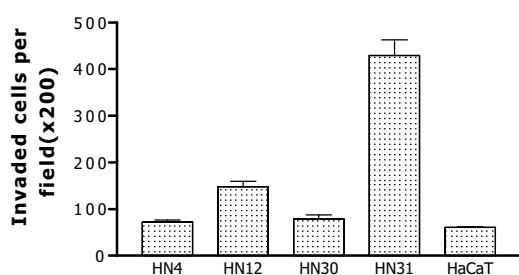
รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์ HaCaT เจริญเติบโตบน
Matrigel (scale bar = 100 μm)



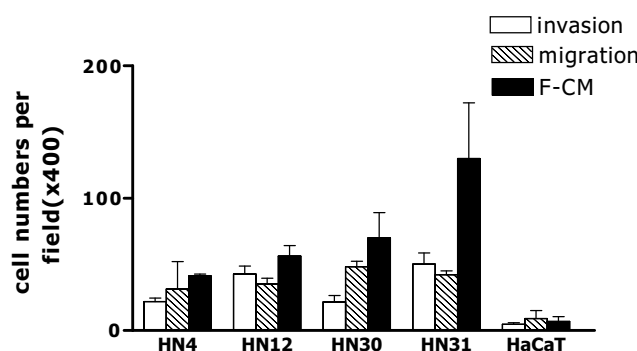
รูปที่ 14 ลักษณะเซลล์ HaCaT เจริญเติบโตบน
Collagen ชนิดที่ I (scale bar = 100 μm)

2. *In vitro* invasion และ migration assay

จากการทดลองเซลล์ทั้ง 5 ชนิด พบว่า เซลล์ที่ metastasis (HN12 และ HN31) จะสามารถรุกรานผ่าน basement membrane ได้มากกว่าเซลล์มะเร็งจาก primary lesion (HN4 และ HN30) (รูปที่ 15) และเมื่อทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติในการรุกรานกับการ migration ของเซลล์ทั้ง 5 ชนิด พบว่า เซลล์ทุกชนิดมีความสามารถในการ migration ไม่แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่ metastasis จะมีความสามารถในการ migration และ invasion ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ conditioned media จากไฟโบรบลาสต์ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์ invade ได้ดีขึ้น โดยเฉพาะเซลล์ที่ metastasis (รูปที่ 16)



รูปที่ 15 แสดงความสามารถของเซลล์ในการรุกราน



รูปที่ 16 แสดงผลของ conditioned media ของไฟโบรบลาสต์ต่อการรุกรานของเซลล์

3. ผลของ substrate กับการคัดหลั่ง MMPs

ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า Matrigel และ collagen มีผลต่อการสร้าง MMPs โดยพบว่า collagen สามารถกระตุ้นให้ HN4 และ HN12 สร้าง MMP9 ได้มากขึ้น ในขณะที่ Matrigel มีผลต่อการสร้าง MMP9 ของ HN12 และ HaCaT นอกจากนี้ ยังพบว่า เซลล์ HN4 และ HN12 ยังถูกกระตุ้นให้สร้าง MMP2 ได้มากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงบน collagen (รูปที่ 17)