เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหลอดทดลอง

ทัศนีย์ เพิ่มไทย*, ศุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์, ศศิประภา ทองบพิตร, อธิเศก เรืองประชา

หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดฯ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับต้นๆของโรคมะเร็งในประเทศไทย ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell, MSC) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ (Human amniotic fluid stem cell, hAFSC) ซึ่งเป็น MSC ชนิดหนึ่งน่าจะมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ด้วย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ hAFSC ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29 cell line) เมื่อนำไปเลี้ยงร่วมกันในหลอดทดลองนาน 24 ชั่วโมง โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองแรกเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ HT29 ที่เลี้ยงร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:1 (HT29 3,000 เซลล์:hAFSC 3,000 เซลล์) และ1:3 (HT29 3,000 เซลล์: hAFSC 9,000 เซลล์) สำหรับการทดลองที่สองเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเซลล์ HT29 ที่เลี้ยงร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:3 เช่นกัน ผลของการศึกษาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ HT29 โดยเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงร่วมกับ hAFSC ไม่สร้างโคโลนีเป็นก้อนกลมเหมือนกับเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุมที่มีเซลล์ HT29 เพียงอย่างเดียว แต่มีลักษณะกระจายตัวเป็นเนื้อเยื่อชั้นเดียว (monolayer) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ HT29 นี้มีมากขึ้นตามจำนวนของเซลล์ hAFSC ที่เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบปริมาณของเซลล์มะเร็ง HT29 หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC พบว่าเซลล์มะเร็งมีปริมาณลดลง และการลดลงนี้จะมีมากขึ้นเมื่อมีจำนวนเซลล์ hAFSC เพิ่มขึ้นอีกด้วย ผลจากการศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า hAFSC มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 ในหลอดทดลองได้

คำสำคัญ: การยับยั้งการเจริญเติบโต, เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ, เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

*** Corresponding author**

ทัศนีย์ เพิ่มไทย

หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดฯ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

Tel: +66(0)-2419-4896; Fax: +66(0)-2418-2662

e-mail: sitsu@mahidol.ac.th, bsuteevun_1@yahoo.com

Human Amniotic Fluid Stem Cell In Vitro Inhibits Colon Cancer Cell Growth

Tatsanee Phermthai*, Suparat Wichitwiengrat, Sasiprapa Tongbopit, Athisek Reaugpracha
Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok.

Abstract

Colon cancer is a common malignant tumor that ranked in a group of the top ten reading cancers in Thailand. Recently, it was reported that mesenchymal stem cells (MSC) can inhibit cancer cell growth in experimental animals. Thus, human amniotic fluid stem cell (hAFSC), a kind of MSC, may show similar effect for inhibiting cancer cell growth. The aims of present study were to investigate the effects of hAFSC on colon cancer cell line (HT29 growth when these two cells were co-cultured for 24 hours. Our study was divided into 2 experiments. The first experiments was to examine the morphological appearances of HT29 cell that co-culture with hAFSC at ratio 1:1 (HT29 3000 cells:hAFSC 3000 cells) and 1:3 (HT29 3000 cells:hAFSC 9000 cells), while the second experiment was to evaluate the changes in HT29 cell number after co-culture with hAFSC at ratio 1:1 and 1:3 as well. The results showed that morphological appearances of HT29 cell were changes after co-cultured with hAFSC by losing its round shape colony forming ability as compared to the controls (HT29 cell alone). The forming colony of HT29 cell in the co-culture group was dispersed and laid in monolayer pattern. In addition, morphological appearances of HT29 cell were increased as the number of hAFSC was increased. Moreover, we found that the changes in HT29 cell number after co-culture with hAFSC were decreased higher when the hAFSC cell number was increased. The results of our preliminary study suggest that hAFSC has the ability to inhibit colon cancer cell growth.

Keywords : growth inhibition, amniotic fluid stem cell, mesenchymal stem cell, colon cancer cell

*** Corresponding author**
Tatsanee Phermthai
Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University
Tel: +66(0)-2419-4896; Fax: +66(0)-2418-2662
E-mail: sitsu@mahidol.ac.th, bsuteevun_1@yahoo.com

บทนำ

มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่สามในประชากรโลก ในระหว่างปี ค.ศ. 2008 มีรายงานว่าพบผู้ป่วยใหม่ 1.23 ล้านคน และมีผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งนี้ 608,000 คน ทั่วโลก[1] ส่วนในประเทศไทย มะเร็งลำไส้ใหญ่พบมากเป็นอันดับที่สี่ในประชากรไทย และพบว่าในระหว่างปี ค.ศ. 2004-2006 มีคนไทยป่วยด้วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ประมาณ 22.1 รายต่อประชากรแสนคน โดยมีเพศชาย และเพศหญิงไทยที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นี้ประมาณ 12.9 และ 9.2 รายต่อประชากรแสนคน (เพศชาย 11,711 ราย และเพศหญิง 9684 ราย) ตามลำดับ[2] ปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคนี้ได้แก่ การได้รับสารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหาร เช่น สารโพลีไซคลิกเอมีน[3] การดื่มสุรา[4] การสูบบุหรี่[4] การอายุที่มากขึ้น[5] เพศชาย[5] การออกกำลังกายที่ไม่เพียงพอ[6] และ การติดเชื้อเบคทีเรียชนิดเฮลิโคเบคเตอร์ ไพโรไล (Helicobacter pyroli)[7] เป็นต้น ในปัจจุบันการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ยังได้ผลไม่ดีนัก เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มาพบแพทย์เมื่อมีอาการของโรคอยู่ในระยะสุดท้าย ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นตามปกติแล้วมี 3 วิธีคือ การผ่าตัด การใช้รังสีรักษา และการใช้ยาเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาวิธีการใหม่ๆมาใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ยังคงมีการพัฒนาต่อไปอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง สำหรับการใช้เทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ รวมทั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นวิวัฒนาการใหม่ทางการแพทย์ที่น่าจะมีความเป็นไปได้สูง และเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

เซลล์ต้นกำเนิดที่พบในร่างกาย ส่วนใหญ่เป็นชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell, MSC) ซึ่งพบได้ในหลายอวัยวะ เช่น ไขมัน สายสะดือ ผิวหนัง ลำไส้ใหญ่ ไต เป็นต้น[8-9] MSC มีคุณสมบัติพิเศษสองประการ คือ สามารถนำมาเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกายชนิดอื่นๆ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน และกล้ามเนื้อ ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ และ สามารถนำมาเพิ่มจำนวนได้ภายนอกร่างกาย[10-11] ด้วยเหตุนี้ MSC จึงกลายเป็นอีกความหวังที่จะนำมาใช้ปลูกถ่ายเพื่อรักษาโรคที่เกิดจากภาวะทุพพลภาพ หรือปลูกถ่ายทดแทนเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ที่เสื่อมสภาพไป

มีรายงานว่า เมื่อปลูกถ่าย MSC เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เหล่านี้สามารถเคลื่อนที่ไปยังจุดที่มีการบาดเจ็บ บริเวณที่เซลล์มีการถูกทำลาย และบริเวณที่มีการอักเสบได้[8-9] ซึ่งไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาพบว่า MSC ยังสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีเซลล์ผิดปกติจำพวกเซลล์มะเร็งด้วย ทำให้นักวิทยาศาสตร์เกิดแนวความคิดจะใช้ MSC นี้เป็นตัวพาสารทำลายเซลล์มะเร็ง เช่น อินเตอร์ฟีรอน (interferon) และสารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ไปยังตำแหน่งที่มีเซลล์มะเร็งอยู่[12-14] และนอกจากนี้ ยังมีการวิจัยอื่นที่ยืนยันอีกว่า ตัว MSC เองนั้นสามารถเคลื่อนที่เข้ารวมกับก้อนเนื้องอกและส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกด้วย โดยในการทดลองดังกล่าวได้ทำการฉีดเซลล์ MSC เข้าไปในก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองแล้ว มีผลทำให้ก้อนมะเร็งฝ่อลงอย่างชัดเจนและไม่มีการกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ (metastasis)[15-17] และยังมีรายงานว่าเมื่อฉีด MSC เข้ากระแสเลือดของหนูทดลองที่เป็นมะเร็งเต้านม (breast carcinoma) ซึ่งมีการกระจายของเซลล์มะเร็ง

ไปที่ปอด พบว่า MSC มีการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณปอด และช่วยลดขนาดของก้อนมะเร็งที่เต้านมด้วย[18]

นอกจากนี้ MSC เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความอ่อนวัย ยังไม่มีการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะชนิดที่กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ด้วยเหตุนี้จึงมีความปลอดภัยต่อการปฏิเสธเซลล์หากนำ MSC ไปใช้ปลูกถ่ายแก่ผู้ป่วยอื่น[19-22] นอกจากนี้ยังพบว่า MSC สามารถหลั่งสารจำพวก tranforming growth factor-b (TGF-b), hepatocyte growth factor (HGF), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) และ prostaglandin E2 (PGE2) และผลิตสารไนตริกออกไซด์ (nitric oxide ; NO) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์กดการทำงานและกดการเพิ่มจำนวนของ T-cell ด้วย[23-26] ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อนำ MSC ไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งจึงได้รับความสนใจอย่างมาก

เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ (hAFSC) เป็น MSC ชนิดหนึ่งที่ได้มาจากตัวอ่อนระยะฟีตัสในขณะที่มารดามีอายุครรภ์อยู่ระหว่าง 16-20 สัปดาห์ เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีความเยาว์วัยมากทำให้มีศักยภาพในการแบ่งตัวได้ดีกว่า MSC ชนิดอื่น และมีคุณสมบัติการเคลื่อนตัวได้ไวมาก[27] ในขณะเพาะเลี้ยง hAFSC นั้นพบว่าเซลล์มีการเคลื่อนที่ไปในทุกทิศทาง โดยจะเคลื่อนเข้ารวมตัวและหลุดออกจากเซลล์รอบๆ อยู่ตลอดเวลา ด้วยเหตุนี้จึงเป็นข้อได้เปรียบหากใช้เซลล์มีเซนไคม์จากแหล่งนี้ ให้เคลื่อนที่เข้าสู่กลุ่มเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาของเซลล์ต้นกำเนิดกับเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของ hAFSC ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของมนุษย์มาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจสอบศักยภาพของ hAFSC ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่มีกำเนิดมาจากเซลล์ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยง hAFSC

คณะผู้วิจัยเลือกใช้ hAFSC ซึ่งแยกได้ในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาทางการแพทย์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โดยได้นำสายพันธุ์ hAFSC มาเพาะเลี้ยง ในน้ำยาเพาะเลี้ยง AFS medium ที่มีส่วนประกอบเป็น α-MEM (Gibco, Invitrogen, CA) และ 15% Fetal bovine serum ชนิด Embryonic stem cell grade (ES-FBS;Sigma, MO) และ 20 % Chang medium (Irvine Scientific, CA) และ 1% L-glutamine (Sigma ประเทศอเมริกา) และ 1% Penicillin-streptomycin (Sigma ประเทศอเมริกา) ในตู้บ่มเพาะที่มี ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37° ซ โดยระหว่างการเพาะเลี้ยง ได้ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำยาเพาะเลี้ยงทุก 3 วัน และการ subculture จะทำเมื่อ hAFSC มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 80 ของพื้นที่ภาชนะเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้ปริมาณเพียงพอสำหรับการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งร่วมกับ hAFSC

การทดลองเริ่มจากการนำเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ HT29 มาเพาะเลี้ยงและเตรียมเซลล์ให้ได้จำนวน 3,000 เซลล์ต่อน้ำยาเพาะเลี้ยง 10% α-MEM ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วจึงนำเซลล์ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมทดลองแต่ละหลุม โดยใช้ถาดทดลองชนิด 96 หลุม ในการทดลองนี้แบ่งเซลล์ออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยง hAFSC

ชนิดเดียวจำนวน 3,000 เซลล์ (กลุ่มควบคุมที่ 1) กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยง HT29 ชนิดเดียวจำนวน 3,000 เซลล์ (กลุ่มควบคุมที่ 2) กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยง HT29 จำนวน 3,000 เซลล์ ร่วมกับ hAFSC จำนวน 3,000 เซลล์ (อัตราส่วน 1:1) (กลุ่มควบคุมที่ 3) กลุ่มที่ 4 เพาะเลี้ยง HT29 จำนวน 3,000 เซลล์ ร่วมกับ hAFSC จำนวน 3,000 เซลล์ (อัตราส่วน 1:1) (กลุ่มทดลองที่ 1) และกลุ่มที่ 5 เพาะเลี้ยง HT29 จำนวน 3,000 เซลล์ ร่วมกับ hAFSC จำนวน 9,000 เซลล์ (อัตราส่วน 1:3) (กลุ่มทดลองที่ 2)

การเพาะเลี้ยงใช้เวลานาน 24 ชั่วโมง และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ HT29

การศึกษาลักษณะ และรูปร่าง ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ HT29 ในหลอดทดลองหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยายของเลนส์ 200 เท่า และถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเซลล์ HT29

หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT29 ร่วมกับ hAFSC นาน 24 ชั่วโมง มีการตรวจสอบจำนวนเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay ด้วยการเติมสาร 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ลงไปให้เซลล์ที่ยังมีชีวิต เมื่อเซลล์ได้รับสาร MTT เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง แล้วใส่สาร Isopropanol เพื่อกระตุ้นปฏิกิริยาการเกิดสี และวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องอ่าน microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์โดยรวมที่มีอยู่ในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น

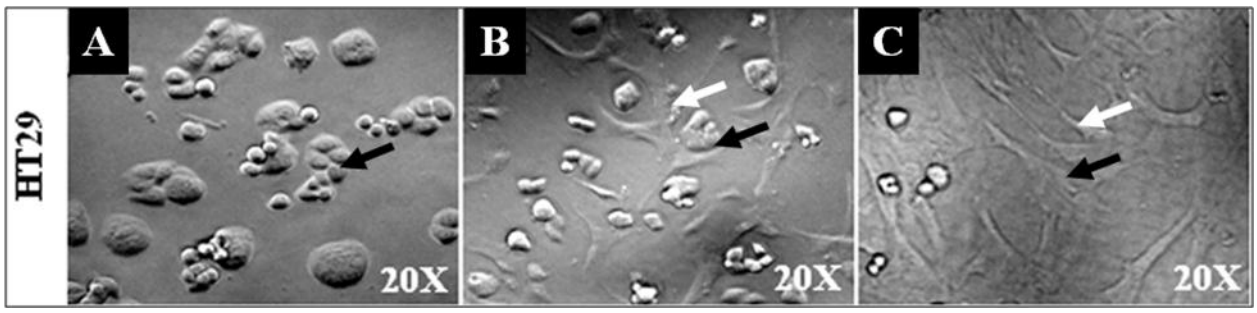
ผลการศึกษา

ในการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์มะเร็ง HT29 ภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC ซึ่งได้ทดลองใน 2 อัตราส่วน คือ เซลล์มะเร็งต่อเซลล์ต้นกำเนิด เป็น 1:1 และ 1:3 นั้น พบว่า ที่อัตราส่วน 1:1 เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่หลุดออกจากโคโลนีที่เป็นก้อนกลม แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว และปะปนอยู่กับเซลล์ต้นกำเนิด และเซลล์ที่ยังอยู่ร่วมกันเป็นลักษณะก้อนกลมนั้นมีจำนวนน้อยลงเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งอย่างเดียว ส่วนในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ HT29 ร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:3 นั้น สังเกตเห็นว่าลักษณะของเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น และเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมนั้นมีจำนวนน้อยลงกว่าที่พบในอัตราส่วน 1:1 (รูปที่ 1)

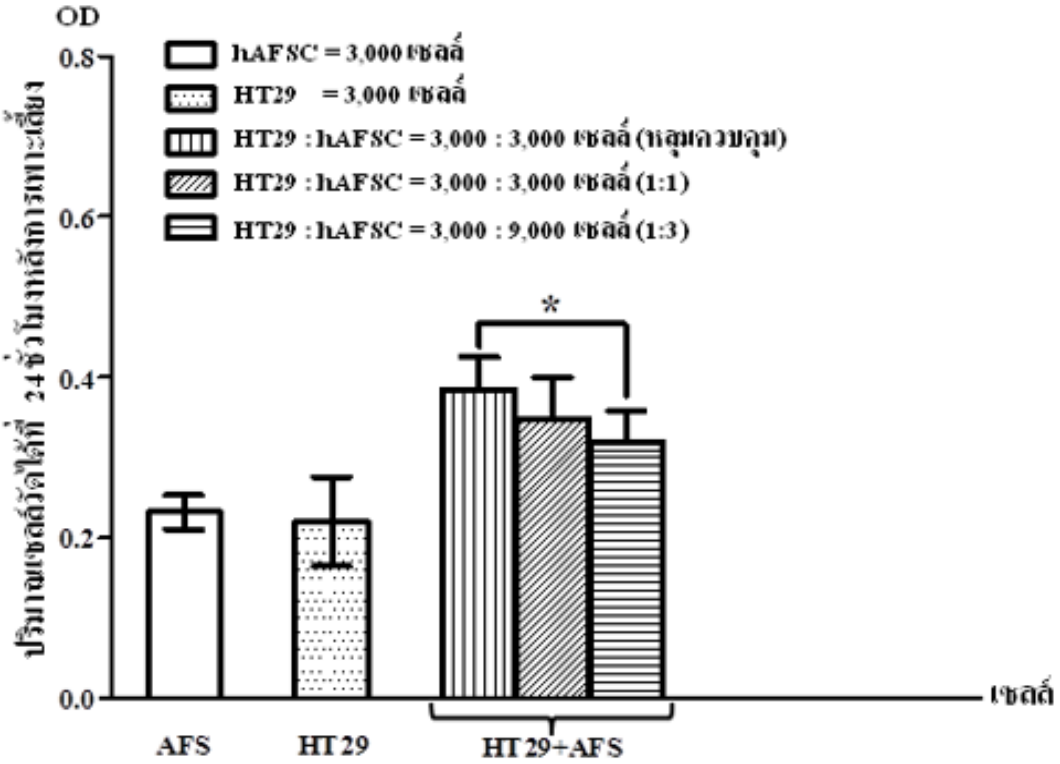
ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการภายใต้กล้องจุลทรรศน์เกี่ยวกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งในช่วงเวลานาน 24 ชั่วโมงทั้งในอัตราส่วนเซลล์ HT29 ร่วมกับ hAFSC ที่ 1:1 และ 1:3 ผลที่ได้ชี้ชัดว่า การกระจายตัวที่พบในเซลล์มะเร็ง HT29 มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเข้าสัมผัสของ hAFSC กับเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าการที่ hAFSC เคลื่อนที่เข้ารวมตัวกับกลุ่มเซลล์มะเร็งโดยตรงจะส่งผลให้ เซลล์มะเร็งบริเวณนั้นมีการเจริญเติบโตช้าลง และเซลล์มะเร็งที่อยู่ในลักษณะเป็นกลุ่มก้อนโคโลนีจะแยกออกจากกันและลงเกาะบนพื้นภาชนะเพาะเลี้ยงในลักษณะเรียงตัวชั้นเดียวแบบ monolayer

และไม่สร้างเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งอีก แต่ทั้งนี้พบว่าเซลล์มะเร็งในบริเวณที่ไม่ได้สัมผัสกับ hAFSC โดยตรงจะมีการรวมเป็นกลุ่มในลักษณะคล้ายเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุม

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HT29 ร่วมกับ hAFSC ในหลุมทดลอง ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ในหลุมทดลองจะถูกนำไปตรวจสอบวัดผลโดยให้ทำปฏิกิริยากับสาร MTT เพื่อดูจำนวนเซลล์ในหลุม และเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม โดยหลุมควบคุมเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HT29 ร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:1 แต่ทำการเพาะเลี้ยงเพียง 4 ชั่วโมงก่อนจะทำการทดสอบ MTT ผลการตรวจสอบความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา MTT พบว่า หลุมทดลองที่มีปริมาณเซลล์มะเร็ง HT29 ร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:3 นั้น มีปริมาณเซลล์โดยรวมน้อยลงกว่าหลุมควบคุมที่มี เซลล์มะเร็ง HT29 ร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งในหลุมทดลองส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้นี้ไปพิจารณาร่วมกับผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพซึ่งพบว่าหากเซลล์ต้นกำเนิดมีจำนวนมากขึ้นจะส่งผลให้โคโลนีของเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงร่วมด้วยมีจำนวนลดลงแล้ว จะแปลผลได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HT29 ร่วมกับ hAFSC ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:3 ดังกล่าวนั้น hAFSC มีอิทธิพลในการยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 ได้ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจะมีมากขึ้นเมื่อจำนวนของ hAFSC เพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 ภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC ภาพ A แสดงภาพเซลล์มะเร็งในหลุมควบคุมที่มีลักษณะเซลล์กลมและอยู่เป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ ภาพ B แสดงภาพเซลล์มะเร็งที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ โดยมีลักษณะเซลล์แบนลงและกลุ่มก้อนเซลล์มีขนาดเล็กลง (ลูกศรสีดำ) ภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC (ลูกศรสีขาว) ที่อัตราส่วน 1:1 ส่วนภาพ C แสดงภาพเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะแบน มีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) และการเกาะเป็นกลุ่มก้อนหายไป (ลูกศรสีดำ) หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC (ลูกศรสีขาว) ในอัตราส่วน 1:3 ทั้งภาพ A, B และ C เป็นภาพการเปลี่ยนแปลงที่ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200 เท่า หรือ 20x)



รูปที่ 2 กราฟแสดงปริมาณของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC

แสดงผลเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่พบในชั่วโมงที่ 24 หลังการเพาะเลี้ยง โดยการตรวจวัดด้วย MTT assay ซึ่งกราฟแท่ง ▭ และ ▭ บ่งชี้ถึงการเจริญเพิ่มจำนวนในอัตราเร็วเท่ากันของเซลล์มะเร็งและเซลล์ต้นกำเนิด ส่วนกราฟแท่ง ▭ แสดงถึงปริมาณเซลล์ในหลุมควบคุมที่ได้เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดนาน 4 ชั่วโมง สำหรับกราฟแท่ง ▭ และ ▭ แสดงถึงปริมาณเซลล์ที่ลดลงภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดในอัตราส่วนเท่ากันและในอัตราส่วนที่มีเซลล์ต้นกำเนิดมากเป็น 3 เท่าตามลำดับ

วิจารณ์และสรุป

MSC เป็นอีกความหวังหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากภาวะทุพพลภาพ และมีการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ MSC เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้รักษาโรคมะเร็ง ในการศึกษานี้ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร่วมกับ hAFSC ซึ่งเป็น MSC ชนิดหนึ่ง เพื่อดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและจำนวนของเซลล์ ให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต ซึ่งผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า hAFSC มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหลอดทดลองได้

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร่วมกับ hAFSC แล้ว พบการเปลี่ยนแปลงทาง

กายภาพของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในลักษณะต่างกัน โดยในหลุมที่มีเซลล์ 2 ชนิดนี้เพาะเลี้ยงร่วมกันนั้น hAFSC จะเคลื่อนที่เข้าปะปนในกลุ่มเซลล์มะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งสูญเสียคุณลักษณะการรวมกลุ่มและการสร้างโคโลนีตามปกติได้ และส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง แต่เซลล์มะเร็งจะไม่ถูกทำลายไปทั้งหมดในทันที ทั้งนี้อาจเนื่องจาก hAFSC ไม่มีคุณสมบัติที่จะเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรง แต่อาจจะปล่อยสารคัดหลั่งบางอย่างเพื่อยับยั้งคุณสมบัติและคุณลักษณะปกติของเซลล์มะเร็ง

การทดลองนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 cell line (ชนิด hepatocellular carcinoma) เนื่องจากเป็นมะเร็งที่มีลักษณะทางรูปร่างโคโลนีที่มีลักษณะแบนราบและสามารถมองเห็นเซลล์ทุกเซลล์ได้ชัด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC พบว่า hAFSC เข้ารวมกับเซลล์ HT29 ได้ดี ทำให้เซลล์ HT29 ส่วนใหญ่แยกออกจากกันได้เกือบหมดในชั่วโมงที่ 8 หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC การที่ hAFSC เข้าไปมีผลสลายโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่นี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Nakamura และคณะ[28] ที่รายงานว่าการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าสู่ก้อนเนื้องอกในสัตว์ทดลองจะทำให้ก้อนเนื้องอกมีขนาดลดลงได้ ทั้งนี้สามารถอธิบายโดยผลการทดลองของ Zhu และคณะ[29] ที่ได้แสดงว่า MSC สามารถผลิตและหลั่งสารที่ช่วยยับยั้งการทำงานภายในกลไก Wnt pathway ซึ่งกลไกนี้เป็นกลไกสำคัญช่วยการแบ่งตัวเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้กลไกการทำลายเซลล์มะเร็ง ของ MSC อาจอธิบายได้จากการทำงาน cytokine ที่พบแล้วว่ามีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง โดยปัจจุบัน FDA ให้การยอมรับถึงการใช้ Interleukin-II สำหรับการใช้รักษาโรคมะเร็งที่ไต (renal cell carcinoma) และรับรองการใช้ Interferon รักษาmelanoma ระยะที่ 3[30] จากการศึกษาของ Bongso และคณะ[31] ยืนยันว่า MSC มีการหลั่งสาร Interleukin ออกมามีผลต่อเซลล์มะเร็ง

สรุปเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 cell line ในหลอดทดลองได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ ทำการตรวจสอบเฉพาะการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและปริมาณของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เกิดจากอิทธิพลของ hAFSC เท่านั้น ดังนั้นเพื่อความเข้าใจและเป็นการสร้างองค์ความรู้ที่ชัดเจนยิ่งขึ้นสำหรับการค้นคว้าหาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งด้วยเซลล์ต้นกำเนิดต่อไปในอนาคต คณะผู้วิจัยเสนอแนะว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลที่เกิดจากสารคัดหลั่งของ hAFSC ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและปริมาณของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ รวมทั้งศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลภายในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับ hAFSC ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. ดนัย ทิวาเวช หัวหน้างานชีววิทยามะเร็ง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ สำหรับคำแนะนำ และข้อเสนอแนะทางวิชาการต่าง ๆ ที่ทำให้การศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010) GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide:

IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Accessed on 11 Oct 2012.

2. Khuhaprema T, Attasala P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, Sangrajrang S. Cancer in Thailand. 2012, volumeVI (2004-2006): 8-9.

3. Ignatenko NA, Gerner EW, Besselsen DG. Defining the role of polyamines in colon carcinogenesis using mouse models. J Carcinog 2011, 10:10

4. Watson AJ, Collins, PD (2011). "Colon cancer: a civilization disorder.". *Digestive diseases (Basel,Switzerland)* 29(2):222–8.

5. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N (2010). "Colorectal cancer.". *Lancet* 375 (9719): 1030–47.

6. Lee, I-Min; Shiroma, Eric J; Lobelo, Felipe; Puska, Pekka; Blair, Steven N; Katzmarzyk, Peter T (1 July 2012). "Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy". *The Lancet* 380 (9838): 219–29.

7. Infection with *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61: 177-240.

8. Wang S, Qu X, Zhao R. Clinical applications of mesenchymal stem cells. J Hematol Oncol 2012;5:19.

9. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. Stem cell Inter 2012;Doi:10.1155/2012/342968.

10. PhermthaiT, Odglun Y, Chuenwattana P, Julavijitphong S, Titapant V, Vantanasiri C. Successful Derivation and Characteristics of Xeno-Free Mesenchymal Stem Cell Lines from Human Amniotic Fluid Generated Under Allogenic Cord Blood Serum Supplementation. TERM 2011;8:216-223.

11. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol 2007;25:100-6.

12. Shah K. Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 2012 ;64:739-48.

13. Fritz V, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: an emerging tool for cancer targeting and therapy. Curr Stem Cell Res Ther 2008;3:32-42.

14. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. MolTher 2009;17:939-46.

15. Lee HJ, Doo SW, Kim DH, Cha YJ, Kim JH, Song YS, et al. Cytosine deaminase-expressing human neural stem cells inhibit tumor growth

in prostate cancer-bearing mice. Cancer Lett 2013.

15. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira, II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. J Exp Med 2006;203:1235-47.

16. Ganta C, Chiyo D, Ayuzawa R, Rachakatla R, Pyle M, Andrews G, et al. Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. Cancer Res 2009;69:1815-20.

17. Ayuzawa R, Doi C, Rachakatla RS, Pyle MM, Maurya DK, Troyer D, et al. Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Lett 2009;280:31-7.

19. Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). J Autoimmun 2008;30:121-7.

20. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 2004;363:1439-41.

21. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation 2006;81:1390-7.

22. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesisimperfecta. Nat Med 1999;5:309-13.

23. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 2002;99:3838-43.

24. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood 2004;103:4619-21.

25. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005;105:1815-22.

26. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood 2007;109:228-34.

27. Phermthai T, Odglun Y, Julavijitphong S, Titapant V, Chuenwattana P, Vantanasiri C, et

al. A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. BMC Cell Biol. 2010;11:79.

28. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. Gene Ther 2004;11:1155-64.

29. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. Leukemia 2009;23(5):925-33.

30. Lee S and Largolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. Cancer 2011;3:3856-93.

31. Gauthaman K, Fong C, Arularasu S, Subramanian A, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Human Wharton's jelly stem cell conditioned medium and cell-free lysate inhibit human osteosarcona and mammary carcinoma cell growth in vitro and in xenograft mice. J Cell Biochem 2013;114:366-77.