ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250370

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก ด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

The Development of Animal Model for Immunotherapy Study in Cervical Cancer

รายนามผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชัย นิรุตติศาสน์
ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.ปกรัฐ หังสสูต
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
นายมณฑล เลิศวรปรีชา
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

กันยายน 2554

b00251355

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250370

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก ด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

The Development of Animal Model for Immunotherapy Study in Cervical Cancer

รายนามผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชัย นิรุตติศาสน์
ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.ปกรัฐ หังสสูต
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
นายมณฑล เลิศวรปรีชา
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเลี้ยงดูสัตว์ทดลองตลอดโครงการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาสูติศาสตร์นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่องานวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาการพัฒนางานด้านอนุภาคนาโนทองคำ จนทำให้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบนำร่องได้

ในท้ายที่สุด ต้องขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ผ่านทุนอุดหนุนจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๔๙-๒๕๕๒

บทคัดย่อภาษาไทย

250370

เรื่อง การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด
ผู้วิจัยหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชัย นิรุตติศาสน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.ปกรัฐ หังสสูต และ อาจารย์มณฑล เลิศวรปรีชา

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบเป็นอันดับสองในสตรีทั่วโลก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา มีความพยายามศึกษากลไกการก่อมะเร็งของไวรัสแปปิโลมาแต่ทำได้ยาก เนื่องจากไม่มีโมเดลสัตว์ทดลองที่เหมาะสม ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาโมเดลหนูทดลองเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแกมมา-เดลตา ทีเซลล์ (gamma-delta T cell) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกเปรียบเทียบกับการทดลองในหลอดทดลอง ผลการทดลองในหนูพบว่า การปลูกถ่ายด้วยเซลล์ HeLa จำนวนน้อยที่สุดคือ 2.5×10^5 เซลล์ สามารถทำให้เกิดก้อนเนื้องอกในหนูทดลองได้ จำนวนเซลล์ที่ปลูกถ่ายมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนเนื้องอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (R^2=0.98, y=0.1171x+4.35) เมื่อนำเซลล์แกมมา-เดลตา ทีเซลล์ฉีดเข้าหนูทดลอง พบว่า เซลล์มีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกและความสามารถจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากยาปามิโดรเนท จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีความไวต่อเซลล์แกมมา-เดลตา ทีเซลล์ที่สุดคือเซลล์ HeLa รองลงมาคือ SiHa และ CaSki กลไกการฆ่าของเซลล์แกมมา-เดลตา ที่เซลล์นั้นเกี่ยวข้องกับ CD 107 กระตุ้นผ่านทาง granzyme และ perforin มีการหลั่งไซโตไคน์ชนิด Interferon gamma และ TNF alpha ด้วย ข้อมูลที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด นอกจากนี้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเตรียมโปรตีนบริสุทธิ์ของไวรัสแปปิโลมา คือ E6 และพัฒนาเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน E6 ของไวรัสแปปิโลมาเพื่อประโยชน์ในการศึกษากลไกการก่อโรคและพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

250370

Title: The Development of Animal Model for Immunotherapy Study in Cervical Cancer

Principle investigator : Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.

Co-investigators: Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D., Associate Professor Somchai Niruthisard, MD., Assistant Professor Pokrath Hansasuta, M.D., D. Phil., Mr. Monthon Lertworapreecha

Cervical cancer is the second most common cancer found in women worldwide. It causes by human papillomavirus (HPV) infection. Many attempts in studying the oncogenesis mechanism had been done with difficulty since no appropriate animal model. The objectives of this study are to develop an animal model and to study the possibility of gamma-delta T cells for immunotherapy *in vivo* (animal harbor cervical cancers) compared to *in vitro* system. The results showed that the minimal amount of HeLa cells that could induce tumor in mouse was 2.5×10^5. The amount of implanted cells correlated significantly with the size of developed tumor (R^2=0.98, y=0.1171x+4.35). After injecting gamma-delta T cells into the tumor, the cells can kill the cervical cancer cells in that tumor. The killing efficiency enhanced in pamidronate treated cervical cancer cells. The killing efficiency of gamma-delta T cells was also demonstrated *in vitro*. The most sensitive cervical cancer cells to gamma-delta T cells was HeLa followed by SiHa and CaSki cells. The killing mechanism of gamma-delta T cells involved CD 107 through granzyme pathway, degranulation of perforin and secreting of cytokines (Interferon gamma and TNF alpha). Information obtained from this study will be useful in treatment cervical cancer patients with immunotherapy. Moreover, purified protein of HPV E6 and cells expressing E6 protein were prepared for beneficially further studies in pathogenesis and development of laboratory diagnostic test.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	7
คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
บทนำ	12
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	14
ขอบเขตของโครงกาวิจัย	14
ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	15
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	15
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	18
วีธีดำเนินการวิจัย	19
วัสดุและวิธีการ	19
ผลการวิจัย	30
อภิปราย/วิจารณ์	61
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	64
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้	65
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก: ประวัตินักวิจัยและคณะ	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ oligo nucleotides ที่ใช้ในการศึกษา	20
ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและ condition ที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละ primers	21
ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด E6 และ L1	25
ตารางที่ 4 Standard cell lines used in control experiment	29
ตารางที่ 5 ผลการปลูกถ่ายเซลล์ HeLa ในปริมาณต่างๆ ในหนูทดลอง	30
ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแกมมาเคลตาทีเซลล์	41
ตารางที่ 7 การสังเกตผลปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนทองคำกับ cancer cell lysate	59
ตารางที่ 8 การสังเกตผลปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนทองคำกับ bacterial cell lysate	60

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1	Dorsal- Skinfold Chamber เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดจะนำปลูกลงใน Chamber	22
รูปที่ 2	ลักษณะของหนูที่เกิดตุ่มนูนคล้าย papillomatosis และกราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ ขนาดก้อนเนื้อและระยะเวลา	31
รูปที่ 3	ภาพถ่ายเส้นเลือดแสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง	32
รูปที่ 4	ลักษณะทางเซลล์วิทยาที่พบการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดในชิ้นเนื้อ	33
รูปที่ 5	ลักษณะทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง	34
รูปที่ 6	ผลการทดสอบและจำแนกสารพันธุกรรมของ HPV	35
รูปที่ 7	ผลการตรวจสอบยืนยันสารพันธุกรรมของ HPV โดยวิธี *in situ* hybridization	36
รูปที่ 8	เซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงได้จากเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก	37
รูปที่ 9	ปริมาณร้อยละของแกมมาเดลตาทีเซลล์หลังจากการกระตุ้น PBMC ด้วย pamidronate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	38
รูปที่ 10	การทำให้แกมมาเดลตาทีเซลล์บริสุทธิ์	39
รูปที่ 11	ผลการตรวจแกมมาเดลตาทีเซลล์ที่ทำให้บริสุทธิ์และย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะชนิดต่าง ๆ ด้วย Flow cytometry	40
รูปที่ 12	ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ IFNγ (pg/ml, ± SD) ที่หลั่งหลังจากแกมมาเดลตาทีเซลล์	42
รูปที่ 13	ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ TNFα (pg/ml, ± SD) ที่หลั่งหลังจากแกมมาเดลตาทีเซลล์	43
รูปที่ 14	ภาพหนูทดลองขณะกำลังมีชีวิต	44
รูปที่ 15	ผลการฆ่าเซลล์มะเร็งในหนูทดลองของแกมมาเดลตาทีเซลล์	45
รูปที่ 16	ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16E6	47
รูปที่ 17	ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16L1	48
รูปที่ 18	ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue A: GST-HPV16E6, B: GST-HPV16L1	49
รูปที่ 19	SDS-PAGE and Western blot analysis ของ GST-HPV16E6	50
รูปที่ 20	SDS-PAGE analysis ของ GST-HPV16L1	51
รูปที่ 21	ผลการเพิ่มจำนวนยีน HPV-16E6	52
รูปที่ 22	จำนวนเซลล์ RKO ที่มีชีวิตหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ neomycin ที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000 and 2,500 μg/ml	53

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 23 pCI-Neo-E6 transfected RKO cells 53

รูปที่ 24 การตรวจหาโปรตีน HPV16E6 ที่สกัดจากเซลล์ RKO-E6 54

รูปที่ 25 กราฟแสดงค่า OD 580 nm เฉลี่ย ที่ระดับความเจือจางของแอนติบอดี E6 56

รูปที่ 26 กราฟแสดงการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกันของอนุภาคนาโนทองคำ กับแอนติเจน L1 57

รูปที่ 27 ปฏิกริยาของอนุภาคนาโนทองคำ 58

รูปที่ 28 กราฟแสดงความไวของการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกัน 58

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ATCC	=	American Type Culture Collection
Au	=	Gold
AuNPs	=	Gold nanoparticles
CaCx	=	Cervical cancer
CIN	=	Cervical intraepithelial neoplasia
CSF	=	Cerobrospinal fluid
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte
DAB	=	Diaminobenzidine
Db	=	Decibell
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxnucleotide triphosphates
DTT	=	Dithiothreitol
E2F	=	Elongation factor 2
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetate
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	=	Fetal bovine serum
FDA	=	Food and Drug Adminstration
FITC	=	Fluorescein isothocyanate
GST	=	Glutathione S-transferase
HCl	=	Hydrocolic acid
HEPES	=	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPV	=	Human papillomavirus
Hr	=	Hour
IgG	=	Immunoglobulin G
IFN-γ	=	Interferon-γ (gamma)
IP	=	Intra peritoneal
IPP	=	Isopentenyl pyrophosphate
IPTG	=	Isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside
IL	=	Interleukin
K_2CO_3	=	Potassium carbonate

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

KCl	=	Potassium chloride
kDa	=	Kilodalton
KH_2HPO_4	=	Dipotassium hydrogen phosphate
L	=	Liter
LDH	=	Lactate dehydrogenase
M	=	Molar
mAb	=	Monoclonal antibody
MACS	=	Magnetic activating cell sorter
MCP-1	=	Monocyte chemoattractant protein-1
MEM	=	Minimal essential medium
MEP	=	Mevalonate pathways
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
MHC I	=	Major histocompatibility complex class I
MHC II	=	Major histocompatibility complex class II
Min	=	Miniute
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Messenger RNA
Na_2HPO_4	=	Sodium phosphate
NaCl	=	Sodium chloride
nBP	=	Nitrogen bisphosphonate
NF-KB	=	Nuclear factor kappa B
nm	=	Nanometer
OD	=	Optical density
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
pRb	=	Retinoblastoma protein
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	Revolutions per minute

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

RPMI	=	Rosewell Park Memorial Institute
SDS	=	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	=	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ssDNA	=	Single strand DNA
TBS	=	Tris buffer saline
TEMED	=	Tetramethylethylenediamine
TNF-α	=	Tumor necrosis factor-α
μl	=	microliter