3. วิธีการทดลอง (METHODS)

3.1 การเตรียมเซลล์ fibroblast จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

นำเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มารับการผ่าตัดรักษา ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาคัดแยกตามขั้นตอนการทำ primary culture เพื่อเตรียมเซลล์ Cf และ Lf ในขณะที่ left-over skin จากผู้ป่วยรายเดียวกันจะถูกนำมาใช้เตรียม normal skin fibroblast (Sf) การเตรียมเซลล์ fibroblast ทั้ง 3 ชนิดจากผู้ป่วยรายเดียวกันจะเป็นการลด genetic variation ระหว่างตัวอย่าง ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างได้ผ่านการพิจารณา จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่อนุมัติ HE490143

3.2 การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีน (transcriptomic study)

นำเซลล์ Cf มาศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีนทั้งหมดในเซลล์ (whole gene expression analysis) โดยเทคนิค microarray โดยใช้ human gene chip จาก Affymetrix® วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม GeneSpring® เพื่อบ่งชี้จีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Sf และ Lf การทดลองในส่วนนี้ได้รับความร่วมมือในการศึกษาวิจัยจาก Professor Yoshimitsu Abiko ในการรับนักศึกษาไปทำวิจัยที่ Nihon University of Dental School at Matsudo หลังจกนั้นทำการยืนยันระดับการแสดงออกของจีนในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยเทคนิค real time RT-PCR

3.3 การศึกษายืนยันการแสดงออกของจีนโดย real time PCR

ผลิต cDNA โดยใช้ First strand cDNA synthesis kit (AMV) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) ตามวิธีที่ทางบริษัทแนะนำ จาก total RNA จำนวน 1 ug ที่สกัดจากเซลล์ Cf, Lf, หรือ Sf ประมาณ 1-2 ล้านเซลล์ นำ cDNA ที่ได้มาวัดระดับการแสดงออกของจีนแต่ละชนิดที่คัดเลือกจากผล microarray (ตารางที่ 1) โดยวิธี SYBR Green-based real time PCR ในเครื่อง ABI 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA) นำค่า C_T ที่ได้มาคำนวณระดับการแสดงออกของจีนเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของจีนเดียวกันในเซลล์ Lf โดยใช้สูตร

$$\text{Fold of gene expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

โดย $\Delta C_T = C_T$ of interesting gene - C_T of internal control

$\Delta\Delta C_T = C_T$ (Cf)-C_T (Lf)

ในที่นี้ใช้ระดับการแสดงออกของ β-*actin* เป็น internal control เพื่อควบคุมปริมาณของ cDNA ที่ใช้ในและละปฏิกิริยาให้ใกล้เคียงกัน และ primer ของแต่ละจีนที่ศึกษาในที่นี้ออกแบบโดยโปรแกรม Primer 3 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

3.4 การตรวจวัดะดับโปรตีน perisotin (PN) ในเซลล์โดยเทคนิค western blot analysis

นำ total cell lysate protein ปริมาณ 20 µg มาแยกใน 10% SDS-PAGE และ transfer ไปสู่ PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA) โดยเทคนิค semidry blot ใน Towbin buffer นำ membrnae ไปทำ immunodetection โดยใช้ 1:500 rabbit anti-human PN (Biovendor) และ 1:1,000 goat anti-rabbit conjugated HRP (Abcam, Cambridge, MA) ตรวจสอบสัญญาณของโปรตีน PN โดย ECL (Pierce, Rockford, IL) ในที่นี้ใช้ระดับการสร้าง β-actin เป็น internal control ของปริมาณ loading protein

ตารางที่ 1 จีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อยืนยันการแสดงออกด้วยเทคนิค real time RT-PCR

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Size (bp)	Accession no.
ADAM12	tttgggggtcaacagttttc	agagctgggttccctttgt	191	NM_003474
AREG	tggggaaaagtccatgaaaa	tttcgttcctcagcttctcc	174	NM_001657
AGN2	ccacctgaggaactgtctcg	ggtcttgctttggtccgtta	191	NM_001147
ER	catatgggagaaggggagt	aagtgcaattacagagtgcaaaa	166	NM_001432
JAGL1	gcctgccttaagtgaggaaa	gccaagaacaacacatcaaaga	169	U77914
LAMA5	gtgatgaaaagcgggaatgt	acctccacagagcgagtcat	221	BC003355
NOV	tgcaattccaagaaaatatcactg	cttggatttggagcttggaa	167	NM_002514
PDGF-A	acacgagcagtgtcaagtgc	tctggttggctgctttaggt	250	X03795
PN	cactctttgctcccaccaat	tcaaagactgctcctcccata	157	AY140646
RL	tgctgaatttggggctactt	gggagatagggtcttcatcca	198	NM_005045
SCG2	cccgaagaatgatgataccc	aaatgttgggatttgcttgg	195	NM_003469
ITGα5	agttgcatttccgagtctgg	ccaaacaggatggctaggat	223	NM_002205
β-actin	cacactgtgcccatctacga	ctccttaatgtcacgcacga	162	X00351
gapdh	ctcctcctgttcgacagtca	gttaaaagcagccctggtga	140	NM_002046

หมายเหตุ: *ADAM12*, a disintegrin and matrix metalloproteinase 12; *AREG*, amphiregulin; *AGN2*, angiopoietin 2; *ER*, epiregulin; *JAGL1*, jagged soluble form; *LAMA5*, laminin alpha 5; *NOV*, nephroblastoma over expressed; *PDGF-A*, platelet-derived growth factor alpha; *PN*, periostin; *RL*, reelin; *SCG2*, secretogranin 2; *ITGα5*, integrin alpha 5; *β-actin*, beta-actin; *gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

3.5 การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ PN ในเนื้อเยื่อโดย immunohistochemistry

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (CCA tissues) จากผู้ป่วย 52 ราย ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยขั้นตอนการได้เนื้อเยื่อได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เลขที่ HE490143 ข้อมูลต่างๆ ของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ ผลการวินิฉัย ผลการอ่านเนื้อเยื่อและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ เก็บรวบรวมโดยศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในที่นี้ใช้เนื้อเยื่อตับที่ไม่เป็นมะเร็งแต่มีภาวะการอักเสบจากสาเหตุต่างๆ (benign liver tissue) เป็นตัวเปรียบเทียบ เนื้อเยื่อทั้ง 2 กลุ่มถูกนำมาเตรียมเป็น paraffin-embedded tissues โดยภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขั้นตอนการทำ immunohistochemical staining ได้แก่ การนำ paraffin-embedded tissues มา retrieve antigen ใน 10 mM citrate buffer pH 6.0 ที่ 95°Cเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นยับยั้ง endogenous peroxidase โดย 3% H_2O_2 และลด non-specific binding โดย 2% bovine serum albumin เป็นเวลา 20 นาที ตรวจหาการสร้าง PN โดยใช้ 1:10,000 rabbit anti-human PN (Biovendor, Heidelberg, Germany) ที่อุณหภูมิห้อง overnight และใช้ anti-rabbit Envision$^+$ System-HRP labeled polymer (Dako, Carpinteria, CA) เป็น secondary antibody โดยแช่กับเนื้อเยื่อนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สัญญาณของ PN วัดได้โดยใช้ diaminobenzidine (DAB; Sigma, St Louis, MO) และย้อมเซลล์ด้วยสี hematoxylin ดูผลภายใต้กล้อง light microscope โดยดูจำนวนของเซลล์ fibroblast ที่ย้อมติด PN (positive PN staining) และความเข้มของระดับการสร้าง PN (intensity)

กำหนดคะแนนของ Number of positive PN staining ดังนี้

0	= <10% (negative)	+1	= 10–25%
+2	= 26–50%	+3	= >50%

กำหนดคะแนนของ Intensity of PN expression ดังนี้

0	= weak staining	1	= intermediate or focal weak staining
2	= focal intense staining	3	= intense staining

ระดับการสร้าง PN ในเนื้อเยื่อคำนวณโดย Number of positive PN staining x Intensity of PN expression ซึ่งจะให้ผลอยู่ในช่วง 0-9 ผลที่ได้นี้นำมาจัดกลุ่มระดับการสร้าง PN โดยกลุ่มที่มีระดับการสร้าง PN ต่ำจะมีค่า ≤ 4 ในขณะที่กลุ่มที่มีระดับการสร้าง PN สูงจะมีค่า > 4 ทั้งนี้ทำการอ่านผลโดยผู้เชี่ยวชาญ (pathologist) 1 คน และนักวิจัย 2 คน แบบ double blind และเมื่อผลการอ่านไม่สอดคล้องกันได้นำเนื้อเยื่อนั้นมาอ่านซ้ำ หากผลยังขัดแย้งกันอีกใช้ผลจากการอ่านของผู้เชี่ยวชาญหรือผลที่ตรงกันจำนวน 2 ใน 3

3.6 การย้อม α-SMA และ PN ในเนื้อเยื่อแบบ Double immunofluorescence staining

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ fibroblast สร้าง PN เป็นเซลล์ชนิด activated fibroblast จริง ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค double immunofluoresecence staining ในการย้อมดู α-SMA และ PN โดยใช้ตรวจเป็นสี fluoresence ต่างกัน ในที่นี้ใช้ anti-mouse IgG-Alexa 488 และ anti-rabbit IgG-Cy3 (Invitrogen) สำหรับ 1:200 mouse anti-human α-SMA antibody (Sigma) และ 1:500 rabbit anti-human PN antibody (Biovendor) ตามลำดับ และย้อม nucleus โดยสี Hoechst (Invitrogen) ดูผลการย้อมด้วย LSM 510 Meta laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) หน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการสนับสนุนเครื่องมือ

3.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีชนิด immortalized non-tumorigenic

Human CCA cell lines ชนิดต่างๆ ได้แก่ KKU-M055, KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213, และ KKU-M214 ได้รับการอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์ non-tumorigenic immortalized bile duct epithelial cell ชนิด MMNK1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Naoya Kobayashi, Department of Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama Japan และชนิด H69 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ตวงพร สุทธิพงศ์ชัย เลี้ยงเซลล์ใน Ham F-12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), และ 5 µg/ml amphotericin B (Advanced Remedies Pvt. Ltd, Solapur, India) ใน 5% CO_2 incubator ที่ 37°C เมื่อเซลล์โตเต็มพื้นที่ทำการ trypsinize เซลล์โดย 0.25% trypsin-EDTA และนำเซลล์ที่มี viability มากกว่า 90% ไปใช้ในการทดลอง

3.8. การศึกษา proliferative effect ของ PN ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

นำ CCA cells มาศึกษาผลของ rPN ต่อ CCA cell proliferation โดยนำเซลล์มาเลี้ยงใน 96-well plate เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวได้ดี จากนั้นใส่ recombinant PN (rPN) (Biovendor) ในปริมาณต่างๆ กัน เลี้ยงเซลล์ร่วมกับ rPN เป็นเวลาต่างๆ เมื่อครบกำหนดเวลา นับจำนวนเซลล์ในแต่ละสภาวะโดย MTS assay (Promega, Madison, WI) นำจำนวนเซลล์ที่วัดได้ในแต่ละสภาวะเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ treat ด้วย rPN

3.9 การศึกษาผลของ PN ต่อวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

นำ CCA cell ที่เก็บจากสภาวะที่เลี้ยงใน HAM-F12 ที่มีและไม่มี rPN มาย้อมด้วย propidium iodide (Invitrogen) ตามวิธีมาตรฐาน จากนั้นนำเซลล์ไปวิเตราะห์การกระจายตัวใน cell cycle ในเครื่อง flow cytometer และวิเคราะห์โดย CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

3.10 การศึกษาผลของ PN ต่อ Colony formation ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Soft agar colony formation assay ทำเพื่อทดสอบความสามารถของ rPN ในการเหนี่ยวนำให้เกิด cell growth ทำโดยเพาะเลี้ยง CCA cell ใน HAM-F12 บน agarose-coating 6-well plate ที่มี 0.5% และ 0.35% MetaPhor® agarose (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) เป็น gel ชั้นล่างและบนตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี และไม่มี rPN เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นย้อม colony ของเซลล์โดย fix เซลล์ 5% v/v glutaraldehyde และย้อมเซลล์ด้วย 0.5% w/v crystal violet ใน 40% v/v methanol นับจำนวน colony ภายใต้ light microscope เฉพาะที่มีจำนวนเซลล์มากกว่า 30 เซลล์ขึ้นไป เปรียบเทียบจำนวน colony ของ CCA cell ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย rPN เปรียบเทียบกับ negative control ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไม่ rPN

3.11 การศึกษาผลของ PN ต่อ invasion ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เพาะเลี้ยงเซลล์ KKU-M213 และ KKU-M156 ใน 10% FBS-HAM-F12 ที่มี 100 ng/ml rPN ใน Matrigel invasion chamber (BD Biosciences, San Jose, CA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่มีความสามารถในการ invade จะเคลื่อนที่เข้าไปรูของ upper chamber นับจำนวน invaded cell โดยนำ upper chamber ไปย้อมสี 0.5% w/v crystal violet ใน 40% v/v methanol เป็นเวลา 30 min each ภายหลัง fix ด้วย 5% v/v glutaraldehyde นับจำนวน invaded cell ภายใต้ light microscope โดยใช้กำลังขยาย 100x เปรียบเทียบจำนวน invaded cell ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย rPN เปรียบเทียบกับ negative control

3.12 การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของตัวรับ integrins บนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

วัดระดับการแสดงออกของ *integrins* (*ITGs*) ชนิด α-subunit ได้แก่ *ITGs* αv, $\alpha 5$, และ $\alpha 6$ และ β-subunit ได้แก่ *ITGs* $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, และ $\beta 5$ เตรียม cDNA จาก CCA cell lines แต่ละชนิดโดยเทคนิคที่อธิบายในข้อ 3.3 นำ cDNA ที่ได้มาวัดระดับการแสดงออกของจีน *ITGs* แต่ละชนิด โดยวิธี SYBR Green-based real time PCR ในเครื่อง Light Cycler® 480 II machine (Roche Diagnostics Ltd., Rolkreuz, Switzerland) นำค่า Cp ที่ได้มาคำนวณระดับการแสดงออกของจีน *ITGs* เทียบกับ (normalization) กับระดับการแสดงออกของ β-*actin* โดยใช้สูตร Level of gene expression = $2^{-\Delta Cp}$ ทั้งนี้ primer ของจีน *ITGs* ออกแบบโดยโปรแกรม Primer 3 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primer ในการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของตัวรับ integrins บนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Size (bp)	Accession no.
ITGαv	tgactggtcttctacccgc	ctcacagatgctccaaacca	121	NM_002210
ITGα5	agttgcatttccgagtctgg	ctctgggagcaccagatacaa	223	NM_002205
ITGα6	ggccttatgaagttggtgga	ctctgggagcaccagatacaa	144	NM_000210
ITGβ1	tccctgaaagtcccaagtgt	tttcctgcagtaagcatcca	143	NM_033666
ITGβ3	tggtcctgctctcagtgatg	tgaaggtagacgtggcctct	180	NM_000212
ITGβ4	tctcctaccgcacacagga	cttcacctgcagctctttcc	110	NM_001005619
ITGβ5	ctccactctgggaaacctga	aggacggtcaggttggactt	188	NM_002213

3.13 การวัดระดับการสร้าง ITGs ใน CCA cell โดย flow cytometry analysis

นำ CCA cell มา fix ด้วย 2% formaldehyde เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นบ่มเซลล์กับ 1:50 goat-anti human ITGα5 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ที่ละลายใน 100 µl washing solution [HAM/F-12 containing 2% (v/v) FBS, 1% (w/v) BSA และ 10 mM NaN_3] เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเซลล์เพื่อเอา excess antibody ออก นำเซลล์ไปบ่มด้วย 1:2,000 donkey-anti goat IgG-Alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ที่ละลายใน 100 µl washing solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่กั้นแสงได้ สำหรับการตรวจสอบระดับการสร้างตัวรับ ITGα6β4 เตรียมเซลล์แบบเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น โดยเปลี่ยนมาใช้ 1:100 mouse anti-integrin ITGβ4 monoclonal antibody (MAB2060) (Chemicon, Millipore, California, USA) ที่ละลายใน 100 µl washing solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4°C และ 1:100 FITC-conjugated polyclonal rabbit anti-mouse antibody (F0261) (Dako, Glostrup, Denmark) ที่ละลายใน 100 µl washing solution เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง ที่ 4°C ในภาชนะที่กั้นแสงได้ ตรวจวัดสัญญาณสี fluorescence โดยใช้เครื่อง FACSort (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) ใน FL-1 channel และวิเคราะห์ข้อมูลดิบโดยโปรแกรม CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) รายงานผลเป็นค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากเซลล์ในสภาวะที่ไม่ได้ใส่ first antibody (negative control) และรายงานเป็นค่า realative MFI ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งโดยใช้ CCA cells ที่เตรียมต่างครั้งกัน

3.14 การตรวจวัด membrane ITGα5β1 และα6β4 ใน CCA cell lines โดยเทคนิค immunocytochemistry

สำหรับ immunocytochemistry ต่อ *ITGα5β1* ทำโดยนำ CCA cell จำนวน 2×10^4 เซลล์มาเลี้ยงบน sterile cover slip ที่วางใน 24-well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ว fix cell ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที และป้องกันการเกิด non-specific binding ของ antibody โดยบ่มเซลล์กับ 1% BSA เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณภูมิห้อง จากนั้นเติม 1:50 goat anti-human ITGα5 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ที่ละลายใน 1% BSA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณภูมิห้อง แล้วเติม 1:500 donkey-anti goat IgG-Alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ที่ละลายใน 1% BSA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณภูมิห้อง โดยไม่โดนแสง

สำหรับ ITGα6β4 ทำโดยนำ CCA cell จำนวน 4×10^4 เซลล์มาเลี้ยงบน sterile cover slip ที่วางใน 24-well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และป้องกันการเกิด non-specific binding ของ antibody โดยบ่มเซลล์กับ 10% FBS ใน PBS เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณภูมิห้อง และใช้ first antibody และ secondary antibody คือ 1:500 mouse anti-integrin ITGβ4 monoclonal antibody ที่ละลายใน blocking solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณภูมิห้อง และ 1:2,000 goat anti mouse IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch 115-166-071, Pennsylvania, USA) ที่ละลายใน 1% BSA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณภูมิห้อง โดยไม่ให้โดนแสง

ย้อมเซลล์อีกครั้งด้วยสีย้อม nucleus โดยใช้ 1:1,000 Hoechst 33258 (Invitrogen, Carlsbad, CA) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณภูมิห้อง นำเซลล์ที่ผ่านการย้อมทั้งหมดดังกล่าวไปตรวจดูสัญญาณของสี fluorescence ภายใต้ LSM 510 Meta laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) หน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

3.15 การทดสอบการจับของ CCA cell lines ผ่าน ITGα5β1 และ ITGα6β4 ต่อ PN (Adhesion assay)

เพื่อยืนยันบทบาทของ ITGα5β1 และ ITGα6β4 ต่อการจับของเซลล์กับ PN เซลล์ถูกนำไปบ่มกับ neutralizing antibody specific ต่อ ITGα5β1 (1:200 mouse anti-human ITGα5β1 :Chemicon Inc., Temecula, CA) และ ITGα6β4 (1:200 mouse anti-human ITGβ4: Chemicon Inc., Temecula, CA) ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการจับของ PN กับ receptor ทั้ง 2 ตัวดังกล่าว โดยใช้เซลล์จำนวน 1 x 10^5 เซลล์ จากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวไปทดสอบ adhesion assay โดย coat 96-well plate ด้วย 1 µg rPN และใส่เซลล์ในสภาวะต่างๆ ลงไป เลี้ยงไว้ 1 ชั่วโมงที่ 37°C ล้างเซลล์ที่ไม่จับกับ PN ออกโดย serum free media จากนั้นวัดจำนวนเซลล์ที่เกาะติดกับ PN (adhesion assay) โดย MTS (Promega, Medison, WI) ตามวิธีที่บริษัทกำหนด เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เกาะติดกับ PN และจำนวนเซลล์ในสภาวะที่ไม่มี PN เปรียบเทียบกับ CCA cells ที่มี ITGα5β1 และ ITGα6β4 ปกติ

3.16 บทบาทของ ITGα5β1 ต่อการ invasion ของ CCA cells

เพื่อยืนยันบทบาทของ ITGα5β1 ต่อ invasion ของเซลล์จากการเหนี่ยวนำโดย PN ทำการทดลองโดยนำ CCA cells มาทำการลดการแสดงออกของ ITGα5 โดยเทคนิค RNA interference โดย si*ITG*α_5 (Santa Cruz) หลังจาก arrest เซลล์ใน HAM-F12 ที่ไม่มี serum supplement เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำ si*ITG*α_5 -treated cell และ untreated cell ไปเลี้ยงต่อในอาหารที่มี 1% fetal bovine serum (FBS) และ recombinant PN (rPN) (Biovendor) ในความเข้มข้นต่างๆ เป็น 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์โดย MTS assay (Promega, Madison, WI) นำจำนวนเซลล์ที่วัดได้ในแต่ละสภาวะเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ treat ด้วย rPN

3.17 การศึกษาบทบาทของ pAKT และ pERK-signaling pathway ผ่าน ITGα5β1 ต่อ PN-induced tumorigenic function ของ CCA cell

เพื่อยืนยันบทบาทของ PN ผ่าน ITGα5β1 ต่อการเหนี่ยวนำ CCA cell invasion ผ่าน signaling molecule ที่สำคัญของเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ AKT และ ERK นำเซลล์มาทำการ knockdown ITGα5 โดย RNA interference ดังกล่าวในข้อ 3.7 จากนั้นนำเซลล์มาบ่มกับ rPN 100 ng/ml ที่ 37°C เก็บเซลล์ที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที เก็บ cell pellet และนำ total cell lysate ไปทำการตรวจวัดปริมาณ pAKT และ pERK โดย Western blot analysis ดังกล่าวในข้อ 3.15 โดยใช้ mouse anti-human pAKT monoclonal antibody (Cell signaling Technology, Inc, Danvers, MA) ที่ความเข้มข้น 1:1,000 และ rabbit anti-human pERK1/2 polyclonal antibody (Cell signaling Technology, Inc, Danvers, MA) ที่ความเข้มข้น 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเป็น first antibody และใช้ 1:1,000 rabbit anti-mouse IgG-HRP (Zymed, Sanfrancisco, CA) และ 1:2,000 goat anti-rabbit IgG-HRP (Abcam, Cambridge, MA) เป็น seondary antibody ตรวจสอบสัญญาณของโปรตีน pAKT และ pERK โดย enhance chemiluminescense (ECL) โดยใช้ปริมาณ β-actin เป็น internal control

3.18 การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีน (proteomic study) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ Cf

นอกเหนือจากการศึกษา gene expression profile ของเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf แล้วนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาโปรตีนที่เซลล์ Cf สร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (secreted proteins) โดยเทคนิค Protein array เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf โดยใช้ Biotin Label-based Human Antibody Array I kit (RayBio®) ซึ่งสามารถตรวจหาโปรตีนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ดี โดยสามารถตรวจหาโปรตีนได้จำนวน 507 ชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม cytokine และ growth factor เป็นส่วนใหญ่ หลักการของเทคนิคนี้ได้แก่การติด specific antibody ต่อ human protein บนแผ่น chip และนำ conditioned-media (CM) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ Cf มาจับกับ antibody ดังกล่าวจากนั้นเปรียบเทียบความเข้มของการติดสีของโปรตีนแต่ละตัวเทียบกับการตรวจสอลโดยใช้ CM ของเซลล์ Lf สรุปขั้นตอน protein array ดังนี้

เตรียม CM จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% serum เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปั่น CM ด้วยความเร็ว 1,000 g เก็บน้ำส่วนบน (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย BCA protein assay kit (Pierce®) เพื่อปรับปริมาณโปรตีนของ Lf-CM และ Cf-CM ให้เท่ากัน ทำการ dialysis samples ด้วย dialysis buffer อย่างน้อย 3 ชั่วโมงก่อน นำไปจับ (hybridize) กับ protein chip โดยติดฉลากโปรตีนใน CM ด้วย biotin ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที และ stop reaction โดยเติม stop solution ลงไป จากนั้น dialysis sample อีกครั้งลดการเกิด non-specific binding ด้วย blocking buffer ลงบน array chip เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ biotimylated-CM บ่มกับ protein chip ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ ที่ 4°C overnight จากนั้นทำการล้างโปรตีนส่วนเกินออกด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมสาร Alexa Fluor 555-conjugated streptavidin เพื่อจับกับ biotin นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ตามด้วย deionized water 1 ครั้ง ปล่อยให้ chip แห้งสนิทก่อนนำไปตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่อง Axon GenePix วิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีนโดย RayBio Analysis Tool จัดกลุ่มโปรตีนที่มีระดับการสร้างมากขึ้นมากกว่า/เท่ากับ 2 เท่า (up-regulated proteins) หรือน้อยลงเท่ากับ/น้อยกว่า 0.5 เท่า (down-regulated proteins) ในเซลล์ Cf เมื่อเทียบกับ Lf โดยโปรแกรม Gene Spring

3.19 การศึกษาระดับการแสดงออกของ angiogenic marker ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และความสัมพันธ์ทางคลินิก

นำเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมาศึกษาระดับการสร้างของ angiogenic marker ที่มีผลการศึกษาจาก Protein chip ว่ามีระดับการสร้างเพิ่มขึ้นในเซลล์ Cf ได้แก่ endoglin (CD105), vascular endothelial growth factor (VEGF) และจากข้อมูลของ Gene chip ได้แก่ platelet-derived growth factor-α (PDGFA) โดยเทคนิค immunohistochemistry ดังกล่าวในข้อ 3.5 นำผลการอ่านค่าระดับการสร้างของ angiogenic markers ดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับข้อมูลทางคลินิคของผู้ป่วย ได้แก่ survival time, invasion, metastasis และอื่นๆ โดยใช้ CD31 ซึ่งเป็น gold standard สำหรับการตรวจหา vessels เป็น positive control

3.20 Statistical analysis

ข้อมูลดิบจากการทดลองมากกว่า 1 ครั้ง รายงานในรูป mean ± SD เปรียบเทียบข้อมูลของสภาวะที่แตกต่างกันเป็นคู่โดย Student's t-test กำหนดให้ค่าความแตกต่างที่มีความสำคัญทางสถิติ คือค่า P value ≤ 0.05