



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง กลไกระดับโมเลกุลของ CD147 ต่อการดื้อยาโดยการควบคุมการแสดงออกของยีน MDR1 และ Survivin ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ที่ดื้อยา

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล และคณะ

8 มีนาคม 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง กลไกระดับโมเลกุลของ CD147 ต่อการดื้อยาโดยการควบคุมการแสดงออกของยีน MDR1 และ Survivin ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ที่ดื้อยา

ผู้วิจัย

- ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชกุล ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- รศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ศ. ดร. วัชร กสิณฤกษ์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

รายงานวิจัยฉบับนี้ ได้จัดทำขึ้นเพื่อเสนอเป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ต่อทุนอุดหนุนการวิจัยซึ่งได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2555 โดยโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการดื้อยาในมะเร็งเม็ดเลือดขาวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา คือ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร်ไววิน ตลอดจนศึกษาถึงบทบาทของโปรตีน CD147 ที่ควบคุมการดื้อยาผ่านพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร်ไววินในมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ (เชี่ยวชาญพิเศษ) ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ มาใช้ในการศึกษาถึงบทบาทของโปรตีน CD147 ในครั้งนี้ โดยผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยในเบื้องต้นดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยที่สนใจเกี่ยวกับมะเร็งเม็ดเลือดขาว และสามารถพัฒนาหาแนวทางการแก้ไขปัญหการดื้อยาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2555 ที่ได้มอบเงินสนับสนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

.....
(ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชกุล)

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ (เชี่ยวชาญพิเศษ) ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ อาจารย์ประจำแขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของผู้วิจัยตั้งแต่เรียนระดับปริญญาเอก จนถึงปัจจุบัน อาจารย์ยังคงเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาด้านงานวิจัยมาโดยตลอด โดยอาจารย์ได้ให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนทั้งทางด้านการศึกษา ความสำเร็จของงานวิจัย ความรู้ตลอดจนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา อาจารย์ประจำรพ. คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ช่วยให้แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ และให้การสนับสนุนงานคำปรึกษาทำวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับสถานที่ในการทำงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ น.ส. อรณิชา สมโน นักศึกษาปริญญาโทแขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ได้ช่วยเหลือทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ อ. ดร. สุพรรณษา ปาโต๊ะ ดร. ณัฐพล เครือคำหล่อ และเพื่อนร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอ ขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่เข้าใจและเป็นกำลังใจที่ดีในการทำงานวิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2555 ได้มอบเงินสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

.....
(ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชกุล)

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รหัสโครงการ : RSA5580030
ชื่อโครงการ : กลไกระดับโมเลกุลของ CD147 ต่อการดื้อยาโดยการควบคุมการแสดงออกของยีน MDR1 และ Survivin ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ที่ดื้อยา
ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ ประเทศไทย
E-mail Address : sawitree.chiampa@cmu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคมะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์เม็ดเลือด เป็นผลให้ไขกระดูกมีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดในปริมาณที่ผิดปกติ การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่พบว่าการดื้อยาแบบหลายชนิด (Multidrug resistance; MDR) เป็นปัญหาหลักของการรักษา ปัจจุบันพบว่ามีสองกลไกที่สำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยา คือ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ พี-ไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein; P-gp) บนผิวเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนในกลุ่ม โปรตีนยับยั้งอะพอพโทซิส (Inhibitor of apoptosis proteins; IAPs) ได้แก่ เซอร์ไววิน (survivin) อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมโปรตีนดังกล่าวของมะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โมเลกุล CD147 เป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายของหน้าที่ และพบว่า CD147 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งและเกี่ยวข้องกับการดื้อยาแบบหลายชนิดของเซลล์มะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน กับโมเลกุล CD147 ในการควบคุมการดื้อยาแบบหลายชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ร่วมกับปัจจุบันโมโนโคลนอล แอนติบอดีจัดเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของโปรตีนที่สนใจ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโมเลกุล CD147 พี-ไกลโคโปรตีนและโปรตีนเซอร์ไววิน ในการควบคุมการดื้อยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ในการทดลอง การศึกษาการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและโมเลกุล CD147 โดยโพลีไซโตเมตรี เวสเทิร์น บลิตทิง และอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่าโมเลกุลทั้งสามชนิดมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อยา K562/Adr ทั้งในระดับโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอแสดงให้เห็นว่า ความสัมพันธ์ของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและโมเลกุล CD147 ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา เพื่อศึกษาการควบคุมผ่าน CD147 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน จึงนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ได้แก่ M6-1E9 M6-1D4 MEM-M6/1และ MEM-M6/6 มาใช้ในการทดลอง พบว่ามีเพียงโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 โคลน MEM-M6/6 เท่านั้นที่สามารถลดการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินในระดับโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/Adr เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่เติม

แอนติบอดี แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการควบคุมการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนโดยโมเลกุล CD147 ไม่ผ่านการส่งสัญญาณทาง MAPK/ERK ในทางตรงกันข้ามพบว่า MEM-M6/6 ไม่มีผลต่อการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไรวินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/Adr ผลการทดลองสรุปได้ว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 (MEM-M6/6) ลดการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไรวินในระดับโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไรวิน จากการศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล CD147 เกี่ยวข้องกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยาโดยการควบคุมผ่านการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไรวิน

คำหลัก : การดื้อยาแบบหลายขนาน มะเร็งเม็ดเลือดขาว พี-ไกลโคโปรตีน CD147 เซอร์ไรวิน

Project Code: RSA5580030

Project Title: Molecular Mechanism of CD147 Driving MDR Phenotype by Regulating *MDR1* and *Survivin* Gene Expression in K562 Resistant Leukemic Cell Line

Investigator: Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

E-mail Address: sawitree.chiampa@cmu.ac.th

Project Period: 3 years

Abstract

Leukemia is a hematologic malignant disease and results in the high number of abnormal white blood cells. While chemotherapy is the most effective treatment, multidrug resistance (MDR) is a major problem. Two major mechanisms have been proposed to promote MDR that are the overexpression of ATP-binding cassette (ABC) drug transporter proteins, P-glycoprotein (P-gp, ABCB1, MDR1), and increased expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) such as survivin. However, the regulation mechanisms of these proteins are unclear. CD147, a functional molecule, has been reported that it was overexpressed and involved in the multidrug resistance of various cell lines. However, the relative of P-gp, survivin, and CD147 in the regulation of multidrug resistance in leukemia have not been reported. To date, monoclonal antibodies (mAbs) have been used as a powerful tool to study expression and function of target proteins. In this study aimed to determine the linkage exists between the expression of CD147, P-gp, and survivin in the regulation of drug resistance in leukemic cell line using mAbs against CD147. The studies of P-gp, survivin, and CD147 expressions were investigated by flow cytometry, Western blotting, and RT-PCR. The P-gp, survivin, and CD147 expressions showed the significant increase both protein and mRNA levels in drug resistant K562/Adr cells suggesting the involvement of P-gp, survivin and CD147 in drug resistance leukemic cells. To determine the regulatory effect of CD147 on P-gp and survivin expression, mAbs against CD147 including M6-1E9, M6-1D4, MEM-M6/1, and MEM-M6/6 were used. It was found that MEM-M6/6 clones decreased the P-gp and survivin mRNA and protein levels in drug resistant K562/Adr cells as compared to K562/Adr cells without mAbs. Moreover, CD147-mediated expression of P-gp was not blocked by U0126 (inhibitor of MAPK/ERK). In contrast, treatments of anti-CD147 mAbs MEM-M6/6 had no effects on P-gp and survivin functions in K562/Adr cells. In summary, mAbs against CD147 (MEM-M6/6) can decrease P-gp and survivin

expression in both mRNA and protein levels but not P-gp and survivin functions. This knowledge, this is the first report showing CD147 mediates leukemia with multidrug resistance phenotype through regulation of P-gp and survivin expressions.

Keywords: Multidrug resistance, Leukemia, P-glycoprotein, CD147, survivin

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	iii
Abstract	v
สารบัญ	vii
สารบัญอักษรย่อ	viii
สารบัญภาพประกอบ	x
สารบัญตาราง	xiii
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบทวนเอกสาร	3
วิธีการทดลอง	15
ผลการทดลอง	22
บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	55
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	69

สารบัญัอักษรย่อ

%	Percentage
μ	Micro
°C	Degree celcius
μg	Microgram
μL	Microliter
μM	Micromolar
Ab	Antibody
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AML	Acute myeloblastic leukemia
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CML	Chronic myelogenous leukemia
DNA	Deoxynucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECL	Enhanced chemiluminescence
FAB	French-American-British
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	Horseradish peroxidase
h	Hour
IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50% growth
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
Igs	Immunoglobulins
kDa	Kilodalton
M	Molarity
mAb	Monoclonal antibody
mg	Milligram
min	Minute

mL	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4, 5 dimethylthiazole-2yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanometer
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium 1640
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Second
TEMED	N, N, N, N, -tetramethylethylenediamine

สารบัญภาพประกอบ

รูปภาพที่		หน้า
1	กลไกการติดยาของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว	6
2	แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ ATP binding cassette (ABC) transporters	8
3	การทำงานของโปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) transporters	8
4	โครงสร้างของพีไกลโคโปรตีน	10
5	โครงสร้างของโปรตีนเซอร์โววิน	11
6	กลไกของเซอร์โววินต่อการยับยั้งกระบวนการอะพอพโตซิส	12
7	โครงสร้างของโมเลกุล CD147	13
8	ความเป็นพิษของยา Adriamycin ต่อเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr	22
9	การแสดงออกของพีไกลโคโปรตีน และ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr	23
10	การแสดงออกของเซอร์โววินภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr	24
11	การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์โววินและ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr	26
12	การแสดงออกของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr	27
13	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	29
14	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของเซอร์โววินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	30
15	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของ CD147 ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	31
16	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	32
17	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant	33

	K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	
18	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	34
19	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	35
20	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	36
21	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting	37
22	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของ MDR1, BIRC5, and BSG mRNA	39
23	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ MDR1 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	40
24	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ MDR1 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	41
25	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BIRC5 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	42
26	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BIRC5 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	43
27	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	44
28	ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	45
29	ผลการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของโมเลกุล CD147 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโค	46

	โปรตีน	
30	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี M6-1E9 และ M6-1D4 ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนโดยโพลไซโตเมตรี	48
31	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนโดยโพลไซโตเมตรี	49
32	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี anti-CD147 ต่อการทำงานของโปรตีน เซอร์ไววิน โดย cell cycle	51
33	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี M6-1E9 และ M6-1D4 ต่อการตายของเซลล์ (sub-G ₁ peak)	52
34	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการทำงานของเซอร์ไววิน โดย cell cycle	53
35	ผลของโมนโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการตายของเซลล์ (sub-G ₁ peak)	54

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบอาการทางคลินิกและการดำเนินโรคของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia)	4
2	แสดงลำดับเบสที่ใช้เป็น primer ในการทำ RT-PCR	19
3	แสดง reaction mixture ในกระบวนการ RT-PCR	19
4	การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และเซอรัไววินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจ	24

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นโรคมะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ปัจจุบันมะเร็งเม็ดเลือดขาวจัดเป็นอันดับที่ 6 ของมะเร็งทั้งหมดและพบประมาณ 4% ของโรคมะเร็งทั้งหมด การรักษาโดยยาเคมีบำบัดเป็นวิธีการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีประสิทธิภาพที่สุด อย่างไรก็ตามการดื้อยาเคมีบำบัดของผู้ป่วยเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่ประสบผลสำเร็จ การดื้อยาแบบหลายขนาน (multidrug resistance; MDR) เป็นเหตุการณ์ที่ผู้ป่วยดื้อยาเคมีบำบัดซึ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง กลไกหลักที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการดื้อยาคือ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของพี-ไกลโคโปรตีนซึ่งกำหนดการสร้างโดยยีนเอ็มดีอาร์วัน (*MDR1* gene) โดยพี-ไกลโคโปรตีนทำหน้าที่ขับยารักษามะเร็งออกนอกเซลล์จึงเป็นสาเหตุให้ต้องเพิ่มปริมาณยาในการรักษาและก่อให้เกิดการดื้อยา จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการแสดงออกของยีน *MDR1* เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloid leukemia (AML) chronic lymphocytic leukemia (CLL) และ multiple myeloma หลายการศึกษายังได้ยืนยันว่า การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนมีความสำคัญในการพยากรณ์การหายของโรคและการมีชีวิตอยู่ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว จากการศึกษาของ Misra และคณะ (1) พบการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ที่ดื้อต่อยา doxorubicin ดังนั้นวิธีการที่สามารถปรับเปลี่ยนการดื้อยาของเซลล์มะเร็งจึงเกี่ยวกับการใช้ตัวควบคุมพี-ไกลโคโปรตีน เรียกว่า efflux pump modulator ส่วนอีกวิธีที่จะหลีกเลี่ยงการดื้อยาของเซลล์มะเร็งที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนคือ ลดการแสดงออกของยีน *MDR1* อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันกลไกการควบคุมการดื้อยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนั้นการควบคุมการแสดงออกของยีน *MDR1* ก็มีความซับซ้อนและขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และโปรตีนที่ควบคุม

โมเลกุล CD147 (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer; EMMPRIN) เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ใน immunoglobulin superfamily ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต การลุกลาม การเกิดอะพอพโทซิสและการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าโมเลกุล CD147 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้โมเลกุล CD147 ยังเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็งต่อยาเคมีบำบัดด้วย โดยพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ CD147 ในเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อยา จากรายงานพบว่าโมเลกุล CD147 เปลี่ยนแปลงการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *MDR1* (2) และการศึกษาโดยยับยั้งการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์มะเร็งรังไข่โดยวิธี RNA interference (RNAi) ทำให้เซลล์มะเร็งรังไข่มีความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด paclitaxel (3) ถึงแม้ว่ากลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาจะมีมากกว่าหนึ่งกลไก แต่กลไกที่ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล CD147 และยีน *MDR1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวยังไม่มีการศึกษารายละเอียด นอกจากนี้ในห้องปฏิบัติการของเรายังมีการ

ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 และ พี-ไกลโคโปรตีนซึ่งได้มีการศึกษาการทำงานและความจำเพาะของแอนติบอดีทั้งสองชนิดแล้ว (4-6) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีเหล่านี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

นอกจากนี้ จากการศึกษายังพบอีกว่ากลไกการดื้อยาขึ้นอยู่กับการยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง และโมเลกุล CD147 มีบทบาทต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง (7) โดยมีรายงานว่า โมเลกุล CD147 มีบทบาททำให้เซลล์มะเร็งมีการดื้อยาโดยผ่านวิธีการยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (8-9) โดย Kuang YH และคณะ (9) แสดงให้เห็นว่า โมเลกุล CD147 เหนี่ยวนำโปรตีนยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (inhibitor of apoptosis proteins; IAPs) ของเซลล์มะเร็งช่องปากทำให้เซลล์มะเร็งช่องปากไม่ตายมีผลทำให้ดื้อต่อยาเคมีบำบัด โปรตีนยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (IAPs) มีความสำคัญในการยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสโดยทำงานยับยั้งโมเลกุลแคสเปส (caspase) โปรตีนเซอร์ไววิน (survivin) เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม IAPs จากรายงานของ Mori A และคณะ (10) พบว่ามีการแสดงออกของเซอร์ไววินเพิ่มขึ้นในมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเซอร์ไววินเกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัด (11-12) อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล CD147 กับ เซอร์ไววินในการดื้อยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยคือ ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของ ยีน *MDR1* และยีน *BIRC5* ที่กำหนดการสร้างพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน โดยโมเลกุล CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่มีการดื้อยาโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 รวมทั้งศึกษาวิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการดื้อยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยโมเลกุล CD147

2. วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล CD147 พี-ไกลโคโปรตีน และเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง drug-resistant K562/Adr และ drug-free K562/Adr
- 2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโมเลกุล CD147 กับการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน
- 3) เพื่อศึกษาบทบาทของโมเลกุล CD147 ในการควบคุมการดื้อยาและการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงโดยใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147
- 4) เพื่อศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ CD147 ในการควบคุม พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน ต่อการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

3. ทบทวนเอกสาร

มะเร็งเม็ดเลือดขาว

มะเร็งเม็ดเลือดขาว คือ โรคมะเร็งเม็ดเลือดชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการที่มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อน (blast cells) หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวแก่ (mature leukocytes) เพิ่มขึ้นผิดปกติ พบได้ทั้งในไขกระดูก (bone marrow) และในกระแสโลหิต (blood circulation) โดยพบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์การเกิดเป็นอันดับ 6 ของโรคมะเร็งทั้งหมดที่พบทั่วโลก และพบประมาณร้อยละ 32.6 ของโรคมะเร็งในเด็ก (13) ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของโรค แต่พบว่าการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ เช่น การติดเชื้อไวรัส ได้แก่ Human-T-lymphocytic Leukemia Virus (HTLV) การได้รับสารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนและข้อมูลทางพันธุกรรมในเซลล์ เช่น สารเบนซีน การได้รับสารรังสีที่มีผลทำให้สารพันธุกรรม (DNA) ได้รับความเสียหายและเกิดความผิดปกติทางโครงสร้างและการทำงานของโครโมโซม ยกตัวอย่างเช่น โรค chronic myelocytic leukemia (CML) ตรวจพบที่มีการแสดงออกของ Philadelphia chromosome (Ph') ซึ่งเกิดจากความผิดปกติแบบ translocation ของโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 22 [t(9;22)(q34;q11)] โดยพบว่ายีน *c-abl* proto-oncogene บนโครโมโซมคู่ที่ 9 มีการย้ายที่ไปอยู่ที่ลำดับเบส 5.8 kb ของโครโมโซมคู่ที่ 22 ซึ่งเป็น *bcr* gene ทำให้เกิดการสร้าง chimeric *bcr/abl* mRNA ที่สามารถสร้างโปรตีนขนาด 210 กิโลดาลตัน ออกมามีชื่อว่า p210**bcr/abl** ก่อให้เกิดความผิดปกติของ pluripotent stem cells ส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ในสายไมอีลอยด์ (myeloid series) ได้ (14)

การจัดแบ่งชนิดของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะอาศัยหลักเกณฑ์การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell maturity) และหลักเกณฑ์ของสายการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell lineage) ซึ่งทำให้สามารถแบ่งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้คือ

1. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)
2. Acute Myeloblastic Leukemia (AML)
3. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)
4. Chronic Myelocytic Leukemia (CML)

โดยลักษณะอาการทางคลินิกและการดำเนินของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) มีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบอาการทางคลินิกและการดำเนินโรคของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) (15)

Presentation	Acute leukemia	Chronic leukemia
Onset	Abrupt	Insidious
Death	Months	Years
Ages	All	Adults
White cell counts	Elevated/Normal/Low	Elevated
Appearance of cells	Blasts (Immature)	Mature
Neutropenia	Present	Absent
Anemia	Present	Present
Platelets	Low	Normal/Increased
Organomegaly	Mild	Severe

การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (16)

การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีหลากหลายวิธีและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสที่จะหายขาดจากโรคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งวิธีการรักษาในปัจจุบันประกอบด้วย การให้ยาเคมีบำบัด การรักษาโดยการกดภูมิคุ้มกัน รังสีรักษา การปลูกถ่ายไขกระดูกและการรักษาด้วยยีน

การรักษาโดยยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) (17-19)

การรักษาโดยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) คือ การรักษาผู้ป่วยด้วยการให้ยาเคมีบำบัด โดยมีจุดมุ่งหมายหรือวัตถุประสงค์แตกต่างกัน สำหรับเป้าหมายของการรักษาจะแบ่งออกเป็น การให้ยาเคมีบำบัดเพื่อทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากโรคมะเร็ง (definitive chemotherapy) และการให้ยาเคมีบำบัดเสริมการรักษาวิธีอื่น (adjunctive chemotherapy) เช่น การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการผ่าตัดหรือรังสีรักษา

วิธีให้ยาเคมีบำบัดรักษาผู้ป่วยมะเร็ง มีอยู่ 2 วิธีใหญ่ คือ

1. การรักษาโดยใช้ยาเคมีบำบัดเพียงชนิดเดียว (monotherapy) ในปัจจุบันวิธีนี้ใช้กันน้อยลงเนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำ ได้ผลในมะเร็งเพียงบางชนิดเท่านั้น
2. การใช้ยาเคมีบำบัดหลายชนิดร่วมกัน (combination chemotherapy หรือ polytherapy) ปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากขึ้นเพราะมีผลการรักษาดีกว่า และมีผลข้างเคียงน้อย เนื่องจากเลือกเคมีบำบัดที่ออกฤทธิ์เสริมกัน โดยมีพิษหรือผลข้างเคียงต่างกันมาใช้ร่วมกัน

ความเป็นพิษของยา

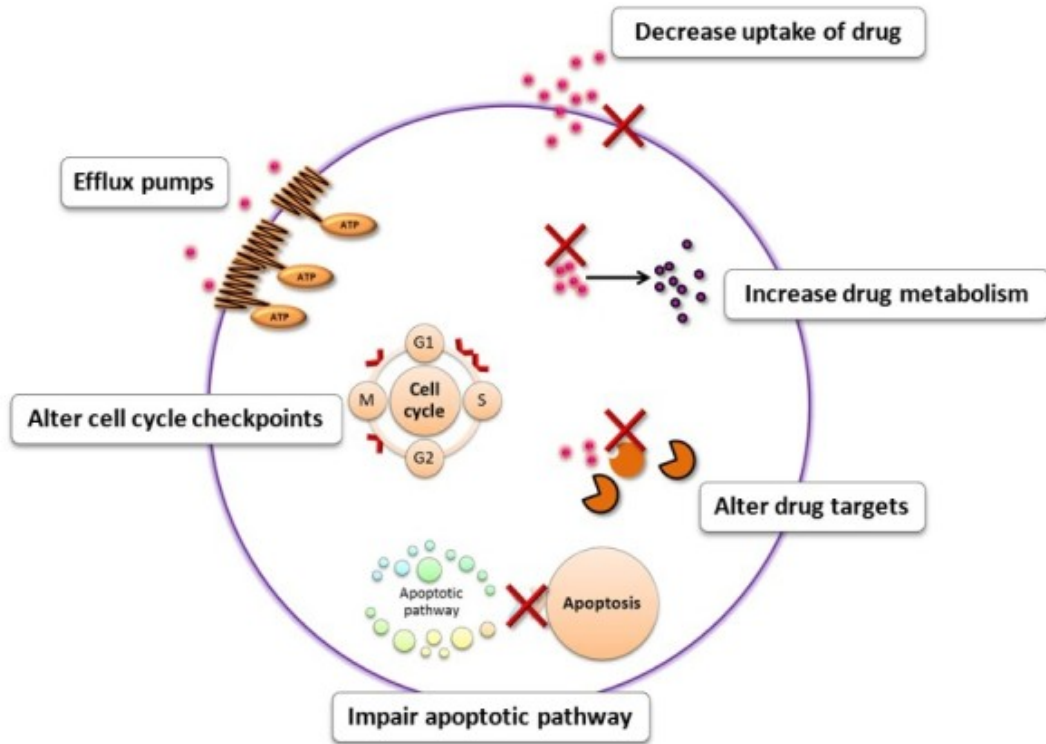
ฤทธิ์ยาเคมีบำบัดนอกจากทำลายเซลล์มะเร็งแล้ว ยายังมีผลต่อเนื้อเยื่อปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีการแบ่งตัวมาก เช่น เซลล์เม็ดเลือดในไขกระดูก และเยื่อระบบทางเดินอาหาร

มะเร็งเม็ดเลือดขาวและการดื้อยา (Multidrug Resistant; MDR)

ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการรักษาโดยให้ยาเคมีบำบัดมักประสบปัญหาเนื่องจากผู้ป่วยเกิดการดื้อยา ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งล้มเหลว และก่อให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง (16, 20) สำหรับกลไกที่ก่อให้เกิดการดื้อยาในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวปัจจุบันพบว่า มีหลายกลไก ดังแสดงในรูปที่ 1

- 1) การขนส่งยาเคมีบำบัดเข้าสู่เซลล์ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากกรณีของการให้ยาในระดับที่ต่ำเกินไปทำให้มีการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์น้อยอันเป็นผลจากกระบวนการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์จะอาศัยกระบวนการ passive transport ซึ่งขนส่งยาจากความเข้มข้นสูงไปต่ำ ดังนั้นปริมาณการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณยาที่อยู่นอกเซลล์ (21)
- 2) การปรับเปลี่ยนกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาเคมีบำบัดซึ่งเป็นผลต่อการลดความเป็นพิษของยา เช่น กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบกลูตาไธโอนเมตาบอลิซึม (GSH system) (22-26)
- 3) การปรับเปลี่ยนวัฏจักรของเซลล์อันเป็นผลให้เซลล์ค่อนข้างทนต่อความเป็นพิษของยา (27)
- 4) การปรับเปลี่ยนโมเลกุลเป้าหมายของยา เช่น การปรับเปลี่ยนตรง DNA topoisomerase II ซึ่งเป็นหนึ่งในโมเลกุลเป้าหมายของยาเคมีบำบัดหลายชนิด (28-34)
- 5) การดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis resistance) ของเซลล์มะเร็ง (21,27) เนื่องจากการแสดงออกที่มากขึ้นของโปรตีนในกลุ่มโปรตีนยับยั้งอะพอพโทซิส (Inhibitor of Apoptosis Proteins; IAPs) ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการอะพอพโทซิส (35)
- 6) การเพิ่มการขับยาออกจากเซลล์มะเร็งโดยอาศัยปั๊ม เช่น พี-ไกลโคโปรตีน (21, 27, 36) เกิดจากการแสดงออกที่มากขึ้นของพี-ไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็น ATP-dependent transporter โดยพี-ไกลโคโปรตีนทำหน้าที่ขับยาเคมีบำบัดออกจากเซลล์ ทำให้ลดการสะสมของยาภายในเซลล์ ซึ่งในการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน สัมพันธ์กับการดื้อยาแบบหลายขนานในเซลล์มะเร็ง

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อยาพบว่ามี 2 กลไกหลักที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งคือ การแสดงออกที่มากขึ้นของพี-ไกลโคโปรตีนและการดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิส (36)



กลไกการดื้อยาของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (27)

โปรตีนขนส่งยา (Drug Transporter protein) (37)

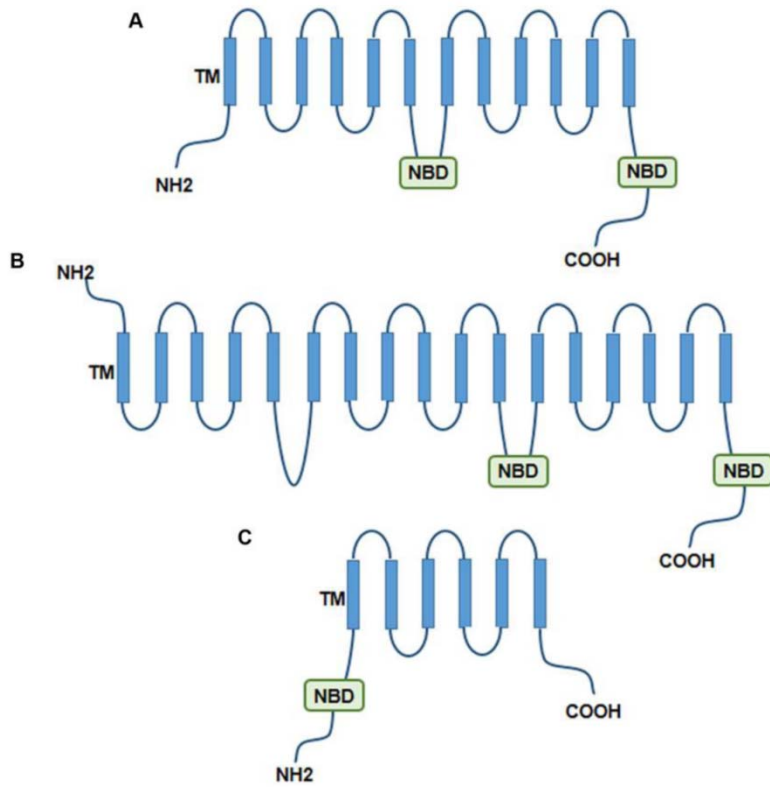
Drug transporter protein เป็นโปรตีนขนส่งที่ทำหน้าที่ในการขนส่งสารต่างๆ ผ่านเยื่อเบรนของเซลล์ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขับสารออกและรับสารเข้าเซลล์ ในเซลล์มะเร็งจะพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้จะส่งผลต่อเซลล์ในด้านการตอบสนองและการดื้อต่อยาเคมีบำบัดหลายชนิด โดยโปรตีนที่มีหน้าที่ในการขับสารออกจะทำงานโดยการขับยาเคมีบำบัดออกจากเซลล์ได้ ส่วนโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการรับสารเข้าเซลล์ อาทิเช่น ไอออนและสารอาหารต่างๆ พบว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มนี้สูงก็จะช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ หรืออาจช่วยให้เซลล์มะเร็งมีการตอบสนองต่อยามากขึ้น ปัจจุบันพบว่ามีโปรตีนขนส่ง 2 กลุ่มที่มีความสำคัญต่อการดูดซึม การแพร่กระจายและการขับยาออกจากเซลล์ ได้แก่ โปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) และ solute-carrier (SLC) superfamilies ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะกล่าวถึงโปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC)

ATP-Binding Cassette Transporter (ABC Transporter) (37)

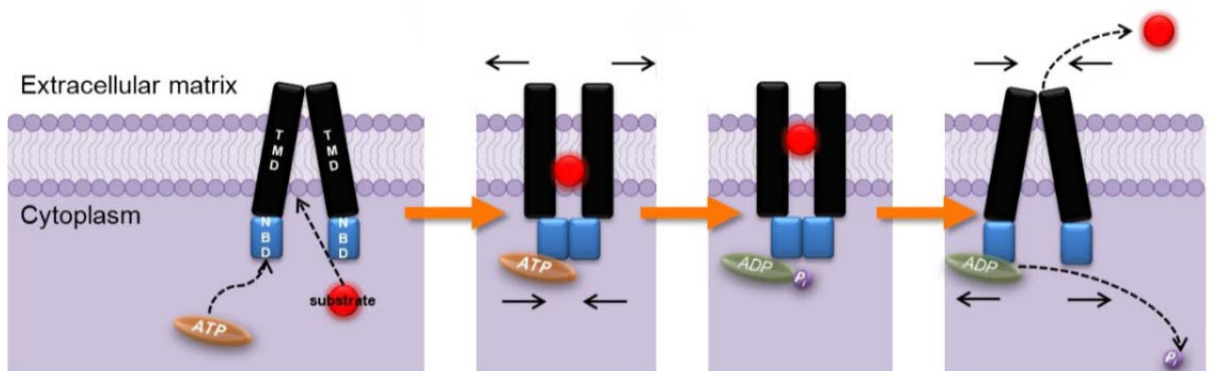
ABC transporter เป็นโปรตีนที่พบบริเวณเมมเบรนของเซลล์ทำหน้าที่ในการนำสารเข้า-ออกเซลล์ ส่วนใหญ่โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ขนส่งสารโดยอาศัยพลังงานจาก ATP ปัจจุบันพบว่าโปรตีนที่มีความสำคัญในการขนส่งยาและการเกิดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งได้แก่ พี-ไกลโคโปรตีนจากการถอดรหัสของ *ABC1 gene* หรือ *MDR1 gene* โปรตีน Breast cancer resistance protein จากการถอดรหัสของยีน *ABCG2* และโปรตีน multidrug resistance proteins (MRP) จากการถอดรหัสของยีนในกลุ่ม *ABCC family* (*ABCC1* ถึง *ABCC6*)

ABC transporter เป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีส่วนของ ATP binding regions โดยโปรตีนทุกตัวในกลุ่มยกเว้น *ABCG2* ประกอบด้วย ATP binding regions 2 ตำแหน่งและส่วนของ transmembrane domains 2 ตำแหน่ง ซึ่งในส่วนของ transmembrane domains จะประกอบด้วยเกลียวของสายแอลฟาหลายสายพาดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจำนวนของสายแอลฟาจะขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนในแต่ละกลุ่ม สำหรับส่วนของ ATP binding regions จะอยู่บริเวณภายในของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2

การศึกษาการทำงานของ ABC transporter พบว่าโปรตีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่โดยอาศัยพลังงานจาก ATP ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน (conformational change) (39-40) โดยมีกลไกการทำงานเริ่มจากเมื่อ ATP และยาเข้าไปจับบริเวณ binding site หลังจาก ATP เข้าไปจับแล้วจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนส่งผลให้ ATP binding domain ทั้งสองข้างจับตัวเข้าหากัน ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของบริเวณ substrate binding site มีการแยกกันเกิดช่องออกสู่ข้างนอกเซลล์ และปล่อยยาที่จับอยู่ออกจากเซลล์ หลังจากนั้นก็จะเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสของ ATP ทำให้โปรตีนกลับเข้าสู่สภาวะเดิม โดยกระบวนการดังกล่าวจะแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ ATP binding cassette (ABC) transporters ประกอบด้วย extracellular domain, transmembrane domain และ cytoplasmic domain ซึ่งเป็นที่อยู่ของ nucleotide binding domain (NBD) บริเวณที่จับของ ATP (38)



รูปที่ 3 การทำงานของโปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) transporters (27)

โปรตีนในกลุ่ม ABC transporters ที่สำคัญได้แก่

1) พี-ไกลโคโปรตีน (41)

พี-ไกลโคโปรตีนเป็นโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีน *ABCB1* หรือ *MDR1* ทำหน้าที่ในการขนส่งยาหลายชนิด เช่น anthracyclines, vincas, taxanes, etoposide และ mitoxantrone จากการศึกษาพบว่าพี-ไกลโคโปรตีนมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ หลายชนิด แต่จะพบมากที่เซลล์เยื่อบุ (endothelial cells) ของหลอดเลือดฝอยในสมองและในอวัยวะอื่นๆ เช่น ลำไส้เล็ก อัณฑะ และผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบว่ามีแสดงออกสูงในมะเร็งไต มะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งต่อมหมวกไต โดยการทำงานจะเริ่มจากยาสามารถจับกับพี-ไกลโคโปรตีนตรงตำแหน่ง substrate binding sites แล้วส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเกิดการขับยาออกจากเซลล์

2) Multidrug-resistance-associated protein 1 (MRP1)

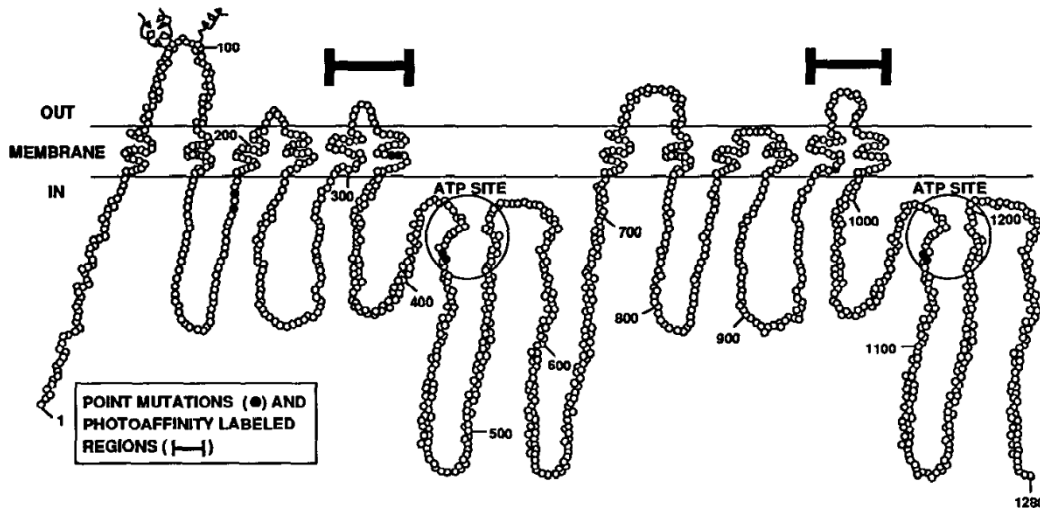
โปรตีนในกลุ่ม ABCC subfamily ได้จากการถอดรหัสของยีน *ABCC1* (42) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ค้นพบครั้งแรกในเซลล์ปอดที่มีการดื้อต่อยา doxorubicin พบการแสดงออกสูงบริเวณกล้ามเนื้อลาย และในเซลล์มะเร็งปอด ลำไส้ใหญ่และมะเร็งเม็ดเลือดขาว

3) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)

โปรตีนในกลุ่ม ABCC subfamily จากการถอดรหัสจากยีน *ABCC2* พบครั้งแรกในเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อต่อยา mitoxantrone ที่ไม่พบการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนและโปรตีน MRP1 โดยโปรตีนกลุ่มนี้มีหลายชื่อ เช่น BCRP, ABCP และ MXR พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิด โดยพบมากในตับและเซลล์เยื่อบุของลำไส้เล็ก มีหน้าที่ในการขนส่งยา สารเมตาบอไลต์ที่เป็นพิษ สารพิษและสารก่อมะเร็ง

พี-ไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein; P-gp)

พี-ไกลโคโปรตีน เป็นโปรตีนขนาด 170 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1,280 ตัว ถูกสร้างจากการถอดรหัสของยีนเอ็มดีอาร์วัน (*MDR1* gene) บนโครโมโซมที่ 7q21 ที่มีขนาด mRNA ยาว 4,871 คู่เบส พี-ไกลโคโปรตีนจัดอยู่ในกลุ่ม ATP binding cassette (ABC) transporter โดยมีโครงสร้างเป็น transmembrane glycoprotein ประกอบด้วย 12 transmembrane domains และ 2 cytoplasmic ATP-binding sites (16) แสดงดังรูปที่ 4 การทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีนจะอาศัยพลังงาน ATP ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์



รูปที่ 4 โครงสร้างของพี-ไกลโคโปรตีนประกอบด้วย 12 transmembrane domains และ 2 cytoplasmic ATP-binding sites (16, 43-44)

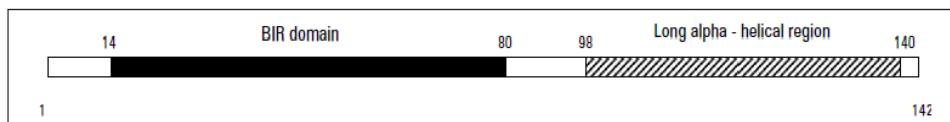
จากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในมนุษย์ (45) และในสัตว์ทดลอง (46) พบว่า พี-ไกลโคโปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ ในระดับที่ต่ำ แต่จะมีการแสดงออกมากขึ้นที่ผิวเซลล์ชนิด epithelial cell ของลำไส้ใหญ่ (colon) ลำไส้เล็ก (small intestine) ท่อของตับอ่อน (pancreatic ductules) ท่อน้ำดี (bile ductules) และส่วนของ proximal tubules ของไต ซึ่งแสดงให้เห็นว่า epithelial cells ที่มีหน้าที่ในการขับสารออกจากเซลล์จะมีการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนมาก นอกจากนี้ยังพบว่า พี-ไกลโคโปรตีนมีหน้าที่ในการขับสารพิษและยาออกจากเซลล์มะเร็ง (efflux pump) ส่งผลให้มีการลดลงของการสะสมยาเคมีบำบัดภายในเซลล์มะเร็ง ทำให้ความเป็นพิษของยาลดลง ดังนั้นเซลล์มะเร็งจึงไม่ตาย (47) โดยกลไกการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนในการขับสารออกจากเซลล์สามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 3 และจากการศึกษาพบว่ายาบางชนิด เช่น cyclosporine สามารถเป็นได้ทั้งสับสเตรตและตัวยับยั้งของพี-ไกลโคโปรตีน ส่วนยาตัวอื่นๆ นั้นส่วนมากจะเป็นสับสเตรตหรือตัวยับยั้งเพียงอย่างเดียว (37) โดยสับสเตรตของพี-ไกลโคโปรตีนมักจะเป็นยาที่มีโมเลกุลมีขั้ว (hydrophobic drugs) พร้อมกับมีโครงสร้างเป็นแบบ polyaromatic และมีประจุเป็นกลางหรือบวก (48) จากการศึกษาพบว่ายาเคมีบำบัดที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic chemotherapeutic agents) หลายชนิดสามารถถูกขับออกนอกเซลล์ได้โดยพี-ไกลโคโปรตีน เช่น protease inhibitors, immunosuppressant, calcium channel blockers, beta blockers, statins, steroids, antihistamines, anticonvulsants, และ antidepressants (49-50)

การศึกษาในเซลล์มะเร็งพบว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนสูง จะมีการลดการสะสมของยาเคมีบำบัดภายในเซลล์ ยกตัวอย่างยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน เช่น anthracyclines vincristine (Vcr) amsacrine (AMSA) mitoxantrone (MIT) และ etoposide (VP16) โดยจากการที่พี-ไกลโคโปรตีนมีคุณสมบัติในการขับยาเคมีบำบัด

ออกนอกเซลล์มะเร็งจึงเป็นสาเหตุให้การรักษาจำเป็นต้องใช้ยาในขนาดที่สูงขึ้นนำไปสู่การดื้อยาแบบหลายขนาน โดยหลายการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนสัมพันธ์กับการดื้อยาแบบหลายขนานในเซลล์มะเร็ง โดยพบการแสดงออกของยีน *MDR1* ในระดับสูงในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งไต และ มะเร็งรังไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและชนิดเรื้อรัง และมะเร็งเม็ดเลือดชนิด myeloma (51-52) อีกทั้งหลายงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึง การตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดีในผู้ป่วย acute leukemia ซึ่งสัมพันธ์กับการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนในระดับที่สูงทั้งในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามานาน และผู้ป่วยใหม่ที่เพิ่งได้รับการวินิจฉัย และงานวิจัยได้ให้ผลยืนยันว่าการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เป็นปัจจัยบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและการมีอยู่ของเซลล์มะเร็ง (53-55) ปัจจุบันวิธีการส่วนใหญ่ที่ช่วยลดการเกิดการดื้อยา คือการใช้ตัวปรับเปลี่ยนปั๊ม (efflux pump modulator) ในการควบคุมการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน

เซอร์ไววิน (survivin)

เซอร์ไววินเป็นโปรตีนที่อยู่ภายในไซโทพลาซึมและนิวเคลียส มีขนาด 16.3 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 142 ตัว ถูกกำหนดการสร้างโดยยีน *BIRC5* ขนาด 14.5 กิโลเบส อยู่บริเวณตำแหน่งเทโลเมียร์ (telomeric region) ของโครโมโซมคู่ที่ 17q25 ประกอบด้วย 4 exons และ 3 introns โดยเซอร์ไววินถูกจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนยับยั้งอะพอพโทซิส (Inhibitor of Apoptosis Proteins; IAPs) ทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งอะพอพโทซิส (56) เซอร์ไววินเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม IAPs ลักษณะโครงสร้างของโปรตีนเซอร์ไววิน แสดงดังรูปที่ 5

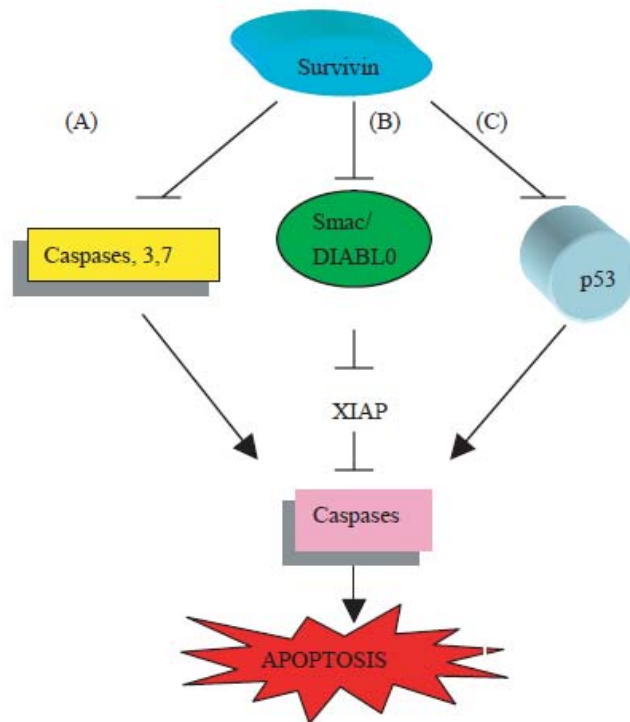


รูปที่ 5 โครงสร้างของโปรตีนเซอร์ไววิน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 142 ตัว มีส่วนของ BIR domain ที่ปลาย N-terminal และ long alpha-helical region ทางปลาย C-terminal (57)

จากการศึกษาพบว่าเซอร์ไววิน มีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อทารกและยังพบการแสดงออกของเซอร์ไววินที่มากกว่าปกติในเซลล์มะเร็งทุกชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งสมอง และเมลาโนมา แต่ในเซลล์ปกติทั่วไปมักจะไม่พบเซอร์ไววินหรืออาจจะพบได้เล็กน้อยในเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เช่น $CD34^+$ สเต็มเซลล์ในไขกระดูก ไทโมไซท์ และเซลล์เยื่อปิว (56, 58-59)

ในสภาวะปกติโปรตีนในกลุ่ม IAPs ทำงานเกี่ยวกับกระบวนการอะพอพโทซิส โดยทำงานยับยั้งผ่านทาง caspase-9 หรือ effector caspases ทั้งทางตรงและทางอ้อม จากการศึกษพบว่า

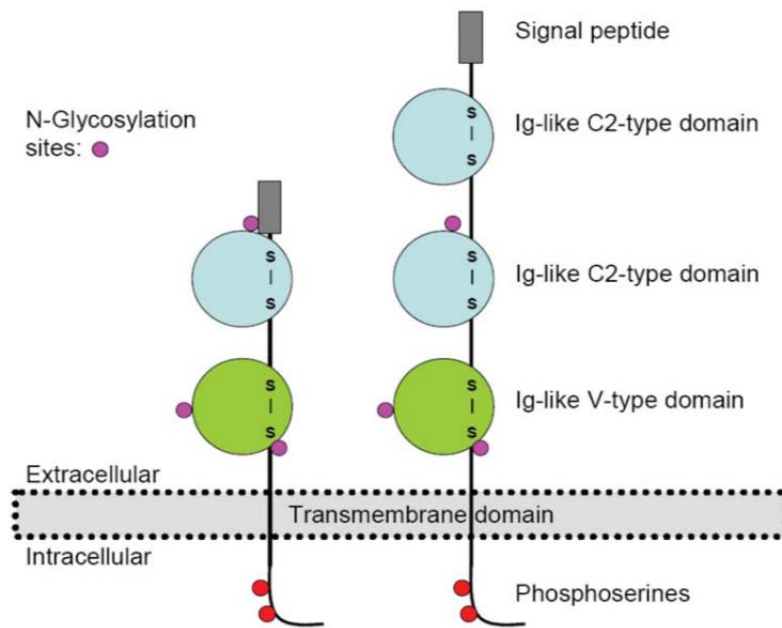
เซอร์ไววิน มีส่วนเกี่ยวข้องกับ caspase-9 และ Smac/DIABLO แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งกระบวนการอะพอพโตซิสผ่านทาง intrinsic pathway (60-61) นอกจากนี้หลายสมมติฐานกล่าวว่า กลไกของเซอร์ไววินในการเป็น anti-apoptotic activity เกิดจากการยับยั้งผ่านทาง caspases โดยตรงเหมือนกับโปรตีนในกลุ่ม IAPs อื่น เช่น XIAP (61) ดังแสดงในรูปที่ 6 นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับ apoptotic cell death pathways พบว่าเซอร์ไววินเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยาเคมีบำบัดที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส (62) และหลายการศึกษาพิสูจน์ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของเซอร์ไววินสูงจะมีการดื้อยาเคมีบำบัดที่มีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิส (12, 63) โดยพบว่าในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงที่ดื้อยา มีการแสดงออกของเซอร์ไววินที่สูงขึ้นและเมื่อลดการแสดงออกของเซอร์ไววินพบว่ามีความไวต่อยาของเซลล์ (64) นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของเซอร์ไววินและพี-ไกลโคโปรตีน มีความสัมพันธ์กัน โดยมีผลต่อการยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสเนื่องจากยาเคมีบำบัดและช่วยให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เกิดการดื้อยา (65)



รูปที่ 6 กลไกของเซอร์ไววินต่อการยับยั้งกระบวนการอะพอพโตซิส (A) เซอร์ไววินยับยั้งอะพอพโทซิสผ่านทาง การยับยั้ง caspase 3 และ caspase 7 (B) เซอร์ไววินยับยั้งอะพอพโทซิสผ่านทาง Smac/DIABLO มีผลยับยั้งการทำงานของ caspase และ (C) เซอร์ไววินยับยั้ง p53 ในการกระตุ้นกระบวนการอะพอพโตซิส (61)

CD147

CD147 หรือ Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) หรือ Basigin (66) หรือ M6 antigen (4) เป็นโปรตีนที่ถูกกำหนดการสร้างมาจากยีนบีเอสจี (*BSG* gene) โมเลกุล CD147 จัดเป็น transmembrane glycoprotein ในกลุ่ม immunoglobulin superfamily member (67) มีโครงสร้างประกอบด้วยส่วน extracellular region ที่มี immunoglobulin domain 2-3 domains ส่วนของ transmembrane region และส่วน cytoplasmic region (66) แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 โครงสร้างของโมเลกุล CD147 ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 1) extracellular region มีลักษณะโครงสร้างคล้าย 2) immunoglobulin transmembrane region และ 3) cytoplasmic region (68)

หน้าที่ของโมเลกุล CD147 มีหลายอย่างได้แก่ กระตุ้นการสร้าง matrix metalloproteinases ของเซลล์ชนิด fibroblasts endothelial cells และ tumor cells (69) นอกจากนี้โมเลกุล CD147 มีความสัมพันธ์กับตัวขนส่งแลคเตท (lactate transporters) ชนิด MCT1 และ MCT4 โดยผ่านการแสดงออกบนผิวเซลล์ (70) ควบคุมการเข้าเก็บและปล่อยแคลเซียม (71) และทำหน้าที่ในการเป็น receptor สำหรับ cyclophilins (72)

CD147 เป็นโมเลกุลที่พบการแสดงออกทั้งใน hemopoietic และ nonhemopoietic cell lines สำหรับเซลล์เม็ดเลือดพบว่า CD147 มีการแสดงออกบนเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด (73) นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแสดงออกของ CD147 สูงในเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้ง เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (74-76) โดยพบว่าการแสดงออกที่สูงขึ้นของ CD147 สัมพันธ์กับ

ความรุนแรงของโรคมะเร็ง (77-78) การศึกษาหน้าที่การทำงานของ CD147 ในเซลล์มะเร็งพบว่า โมเลกุล CD147 กระตุ้นการสร้าง matrix metalloproteinases ซึ่งนำไปสู่การทำลาย extracellular matrix เพิ่มการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (79) นอกจากนี้โมเลกุล CD147 ยังมีผลต่อการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสและการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็ง (80) และจากการศึกษายังพบว่า CD147 มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาแบบหลายขนานในการรักษาผู้ป่วยโดยวิธีเคมีบำบัด การศึกษาของ Li และคณะ (2) พบว่า CD147 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการดื้อยาในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง (breast cancer cells) ผ่านการควบคุมการแสดงออกของ *MDR1 gene* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างพี-ไกลโคโปรตีน นอกจากนี้การยับยั้งการแสดงออกของ CD147 โดยใช้ RNAi (RNA interfere) สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อยา paclitaxel ในเซลล์มะเร็งรังไข่ (ovarian cell line) จากการศึกษาของ Kuang และคณะยังพบว่า CD147 เหนี่ยวนำกระบวนการดื้อยาโดยการควบคุมกระบวนการอะพอพโทซิสผ่านการดำเนินงานของตัวยับยั้งอะพอพโทซิส (IAPs) (9) ดังนั้นจะเห็นว่า CD147 เป็นโมเลกุลสำคัญชนิดหนึ่งที่คอยควบคุมเซลล์มะเร็งผ่านการควบคุมการเจริญเติบโต การแพร่กระจายและการดื้อยาเคมีบำบัด ดังนั้นจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษา กลไกการควบคุมการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยโมเลกุล CD147

วิธีการทดลอง

1. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการศึกษา

เซลล์ชนิด human leukemia cell line, K562/ADR (Adriamycin resistant K562/ADR) จาก Riken (Riken, Ibaraki, Japan)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr ใน 10% FCS-RPMI 1640 (GIBCO™ Grand Island, NY, USA) ที่ 37°C ในตู้ที่มีสภาวะ 5% CO₂

ก่อนเริ่มการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr ใน 10% FCS-RPMI ที่เติมยา Adriamycin ความเข้มข้น 0.5-1 μM เพื่อคงสภาพลักษณะการดื้อยา และใช้เป็นเซลล์ drug-resistant K562/Adr สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562/Adr ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา Adriamycin เป็นเวลา 5 เดือน จะใช้เป็นเซลล์ drug-free K562/Adr

3. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลพี-ไกลโคโปรตีน CD147 และเซอร์ไววิน

เพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อพี-ไกลโคโปรตีน (โคลน MT-Pgp1) CD147 (โคลน M6-1D4 และ M6-1E9) และเซอร์ไววิน (โคลน SVV-A) เพื่อใช้ในการศึกษา

ฉีด pristane ทางช่องท้องของหนู BALB/c ปริมาตร 500 μl ครบ 1 สัปดาห์ ฉีดไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ พี-ไกลโคโปรตีน (โคลน MT-Pgp1) หรือ CD147 (โคลน M6-1D4 และ M6-1E9) หรือเซอร์ไววิน (โคลน SVV-A) ความเข้มข้นเซลล์ 1×10⁷ cells/ml สังเกตการสร้าง ascitic fluid ของหนู ดูดเก็บน้ำจากช่องท้อง (ascitic fluids) ที่มีแอนติบอดี แยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์จากน้ำช่องท้องโดยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Hitrap Protein G column หรือ Hitrap IgM column (GE Healthcare)

4. การศึกษาฟิโนไทป์การดื้อยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-resistant K562/Adr เปรียบเทียบกับ drug-free K562/Adr โดยวิธี MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide] assay

เพื่อยืนยันความแตกต่างของฟิโนไทป์การดื้อยาอะเดียมัยซินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด จึงทำการทดสอบโดยวิธี MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide] assay โดยเติมเซลล์จำนวน 1×10⁴ เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100 μL ใน 96-well plate เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมยาอะเดียมัยซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 μM เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 μL และเติม MTT dye (Bio Basic Canada Inc, Canada) ปริมาตร 15 μL บ่ม

เซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการคว่ำเพลาและเติม DMSO (RCI Labscan, Thailand) ปริมาตร 200 μ L นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และ 630 nm คำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงระหว่างหลุมทดสอบกับหลุมควบคุมตั้งสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบ})}{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม})} \times 100$$

5. การศึกษาการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และ เซอร์ไววิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr เปรียบเทียบกับ drug resistant K562/Adr

5.1 ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลพี-ไกลโคโปรตีน และ CD147 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธีโฟลไซโตเมตรี (Flow cytometry)

นำเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr บั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็ว 1700 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 1×10^7 cells/ml เติม 10% AB serum และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ครอบคลุมเซลล์ความเข้มข้น 1×10^7 cells/ml ปริมาตร 50 μ L ผสมกับ primary antibody ความเข้มข้น 20 μ g/ml ปริมาตร 50 μ L ย้อมเซลล์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาบั่นล้างเซลล์ และเติม rabbit anti-mouse IgG-PE (Immunotech, Marseille, France) หรือ rabbit anti-mouse IgM-Alexa Fluor488 (Life Technologies) บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ครอบคลุมบั่นล้างเซลล์และเติม 1% paraformaldehyde ปริมาตร 350 μ L วิเคราะห์ผลโดยโฟลไซโตเมตรี

5.2 การแสดงออกของโมเลกุลเซอร์ไววินภายในเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธีโฟลไซโตเมตรี

นำเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr มาบั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็วรอบ 200 g นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 1×10^7 cells/ml และเติม 10% AB serum บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที ครอบคลุมเซลล์ปริมาตร 50 μ L และเติม fixative medium (Caltag laboratories, An Der Grub, Vienna, Australia) ปริมาตร 500 μ L บ่มนาน 15 นาทีและเติม permeabilization medium (Caltag laboratories) จากนั้นเติมแอนติบอดีต่อเซอร์ไววิน ความเข้มข้น 20 μ g/ml ปริมาตร 50 μ L ย้อมเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที ครอบคลุมบั่นล้างเซลล์ 3 ครั้ง และเติม rabbit anti-mouse Igs-FITC

(Chemicon) ปริมาตร 25 μL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้ง และเติม 1% paraformaldehyde ปริมาตร 350 μL วิเคราะห์ผลโดยโพลีไซโตเมตรี

5.3 การศึกษาการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน โปรตีน CD147 และเซอรูไววิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western blot analysis

5.3.1 การสกัดโปรตีน

ปั่นล้างเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ที่ 200 g นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แยกเซลล์โดยเติม RIPA lysis buffer ตั้งไว้ 4°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลานำเซลล์ปั่นที่ 10,000 g นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำ (supernatant) ซึ่งมีโปรตีนทั้งหมดและวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Folin-Lowry method และหาความเข้มข้นโปรตีนที่วัดได้จากเซลล์ทั้งสองชนิดโดยเปรียบเทียบกับ standard bovine serum albumin (BSA) และเก็บตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ที่ -20°C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

5.3.2 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) และทำปฏิกิริยาโดย Western blot analysis

นำโปรตีนที่สกัดได้ปริมาณ 30 μg ผสมกับ 5X non-reducing buffer แยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (10% gel) จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่น PVDF membrane โดยใช้ semi-dry transfer apparatus เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลาบล็อคเมมเบรนด้วย 5% skim milk นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม primary antibody ต่อโปรตีนที่สนใจศึกษา ได้แก่ โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อพี-ไกลโคโปรตีน โปรตีน CD147 หรือ แอนติบอดีต่อเซอรูไววิน ทำปฏิกิริยาที่ 4°C นานข้ามคืนโดยการ rotate เมื่อครบเวลาล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 0.1% tween20-PBS จากนั้นเติม secondary antibody คือ anti-mouse Igs-HRP (Dako, Humburg, Germany) หรือ anti-rabbit Igs-HRP (Abcam, Cambridge, UK) และ rotate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลาทำการล้างแผ่นเมมเบรนและนำแผ่นเมมเบรนไปทำปฏิกิริยาโดยใช้หลักการ enhanced chemiluminescence system

5.4 การศึกษาการแสดงออกของ MDR1, BSG และ BIRC5 mRNA ที่กำหนดการสร้าง พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และ เซอรูไววิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semiquantitative RT-PCR

5.4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ปั่นล้างเซลล์ที่ความเร็วยรอบ 200 g นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเซลล์เป็น $5-10 \times 10^6$ cells/ml เติม Trizol reagent (Invitrogen) ปริมาตร 1 ml และ homogenize ให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็วยรอบ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บส่วน

supernatant และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ครบเวลา เติม chloroform ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เข้ากัน และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที ครบเวลาปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บของเหลวส่วนชั้นบน เติม isopropyl alcohol ปริมาตร 500 μ l เขย่าให้เข้ากันและปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ครบเวลาทำการปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูด supernatant ออกให้หมด ล้างตะกอน RNA โดยเติม 75% alcohol ปริมาตร 1 ml ปั่นที่ 7,500g นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ตั้งให้แห้ง (air dry) เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที เติม DEPC-treated water ปริมาตร 50 μ L และเติม Ribolock[™] ribonuclease inhibitor (Invitrogen) ปริมาตร 1 μ L วัดความเข้มข้นของ total RNA ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm กำหนดหาปริมาณ RNA และเก็บตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ที่ -80°C เพื่อนำไปใช้สำหรับทำ RT-PCR

$$\text{RNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorbance } 260 \text{ nm} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

5.4.2 การสังเคราะห์ cDNA

สังเคราะห์ cDNA จากกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific[™]) เตรียมหลอด template-primer mixture ดังนี้ เติมส่วนผสมของ RNA ปริมาณ 1 μ g และ random hexamer primer ปริมาตร 1 μ l ปรับปริมาตรด้วย nuclease free water ให้ได้ปริมาตรรวม 12 μ L ผสมให้เข้ากันและนำหลอดที่มีส่วนผสมข้างต้น incubate ที่ 25°C นาน 5 นาที แช่เย็นไว้ จากนั้นเตรียมหลอด master mix โดยเติม 5x reaction buffer, RiboLock RNase inhibitor, 10mM dNTP mix และ 200U RevertAid M-MuLV RT ปรับปริมาตรเป็น 20 μ L โดยใช้ nuclease free water ผสมให้เข้ากันและแช่เย็น การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายโดยใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยกระบวนการสังเคราะห์มีขั้นตอนดังนี้

- การสังเคราะห์ cDNA : 55°C , 30 นาที
- Denaturation : 94°C, 2 นาที
- PCR amplification (25 cycle) : 94°C, 2 นาที (denaturation), 55°C , 1 นาที (annealing) และ 72°C , 1 นาที (extension)
- Final extension (optimal) : 72°C, 3 นาที

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสที่ใช้เป็น primer ในการทำ RT-PCR

Gene	Primer sequence
MDR1 (64)	Sense 5'-AAAGCGACTGAATGTTTCAGTGG-3'
	Antisense 5'-AATAGATGCCTTTCTGTGCCAG-3'
BSG (9)	Sense 5'-GCAGCGGTTGGAGGTTGT-3'
	Antisense 5'-AGCCACGATGCCAGGAAAGG-3'
BIRC5 (64)	Sense 5'-TGGCTGCCATGGATTGAG-3'
	Antisense 5'-TCTGAGGAGGCACAGGTGT-3'
GAPDH (64)	Sense 5'-CAACGTGTCAGTGGTGGACCTG-3'
	Antisense 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTGG-3'

การเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดง reaction mixture ในกระบวนการ RT-PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (µL)
2X reaction mix	10
Template RNA (1 µg)	X
Sense primer (10 µM)	0.4
Anti-sense primer (10 µM)	0.4
SupreScript ^R III RT/Platinum ^R Taq Mix	0.8
Autoclaved distilled water	up to 20 µL

ผสม reaction mixture ให้เข้ากันแล้วนำ reaction mixture เข้าเครื่อง Mastercycle personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) และตรวจวัด PCR product โดยทำ 1.2%

agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ความเข้มของแถบแบนโดยเครื่อง Gel documentation system (gel documentation XR+, BioRad, USA)

6. เพื่อศึกษาบทบาทของ CD147 ในการควบคุมการดื้อยาแบบหลายขนานและการตายแบบอะพอพโทซิส ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147

นำเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐานที่มีการเติมโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 µg/mL นำเซลล์ไปศึกษาต่อดังนี้

- 6.1 การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน, CD147 และเซอร์ไววินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western blot analysis

- วิธีทำตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 5.3

- 6.2 การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ต่อการแสดงออกของ MDR1, BSG และ BIRC5 mRNA ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR

- วิธีทำตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 5.4

7. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล CD147 กับ การทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนและการทำงานของเซอร์ไววิน

- 7.1 การศึกษาการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีนด้วยวิธี rhodamine123 efflux โดยโฟลไซโตเมตรี

นำเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเก็บเซลล์มาปั่นล้างด้วย cold PBS 3 ครั้ง เติม rhodamin123 ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ บ่มที่ 37°C เป็นเวลา นาน 90 นาที ครบเวลา ปั่นล้างเซลล์ด้วย cold PBS 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลโดยโฟลไซโตเมตรี

- 7.2 การศึกษาวัฏจักรของเซลล์และการตายแบบอะพอพโทซิส (cell cycle and apoptosis)

นำเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ความเข้มข้นต่างๆ เก็บเซลล์มาปั่นล้างด้วย cold PBS 3 ครั้ง

ปรับความเข้มข้นเซลล์เป็น 1×10^5 cells/ml จากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 70% ice-cold ethanol ที่ 4° C นาน 30 นาที ครบเวลา ปั่นล้างเซลล์ด้วย cold PBS และเติม 1 μ L propidium iodide ลงใน แต่ละหลอดและวิเคราะห์โดยโฟลไซโตเมตรี

8. การศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147

เตรียมเซลล์ความเข้มข้น 2×10^5 cells/well/500 μ l ใน 24 well plate เติม U0126 (MAPK/ERK kinase inhibitor) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 μ M เพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ inhibitor เป็นเวลา 30 นาที ครบเวลากระตุ้นเซลล์ด้วยการเติมแอนติบอดีต่อ CD147 คือ MEM-M6/6 ความเข้มข้น 5 μ g/mL เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบเวลาเก็บเซลล์แต่ละหลุม สกัดโปรตีนตาม ข้อ 5.3 เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน โดย Western blotting

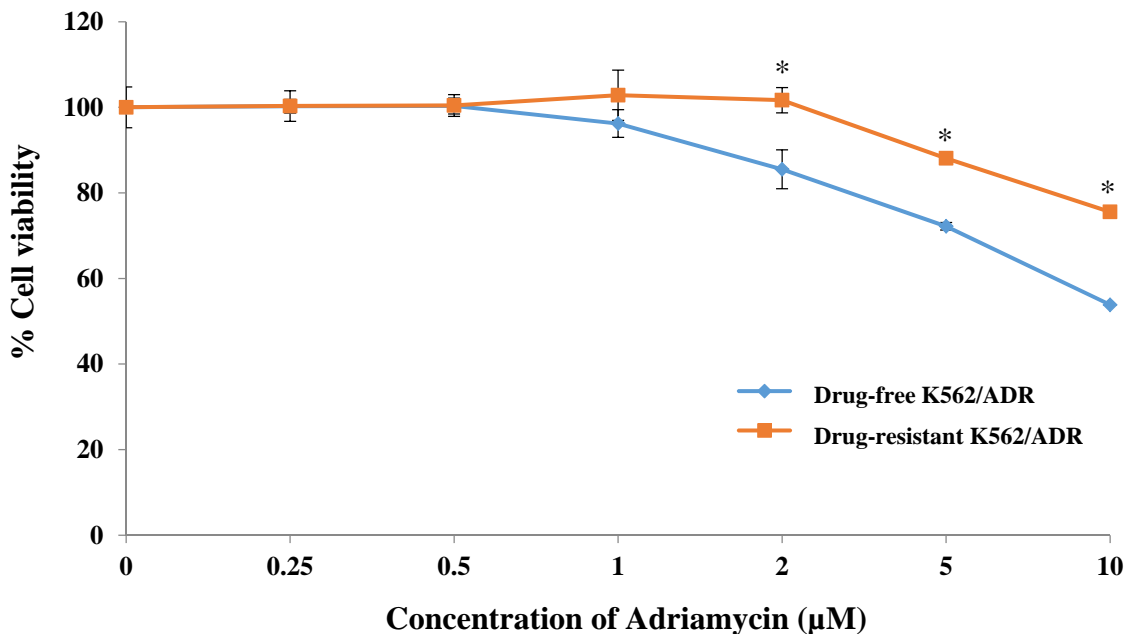
9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงในรูป Mean \pm SEM การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS 20.0 software ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสองกลุ่มทดลองใช้ Student's t test ผลการทดลองที่มีมากกว่าสองกลุ่มใช้ One-way Mann-Whitney U test และค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใช้ค่า $p < 0.05$

ผลการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะการดื้อยาของเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี MTT assay

เพื่อศึกษาลักษณะการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr นำเซลล์ทั้งสองชนิดเพาะเลี้ยงร่วมกับยา Adriamycin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 μM นาน 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์โดย MTT assay ผลการทดลองพบว่า ยา Adriamycin มีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด drug-free K562/Adr มากกว่าเซลล์ drug resistant K562/Adr แสดงว่าเซลล์ drug resistant K562/Adr มีคุณสมบัติเป็น drug resistance phenotype (รูปที่ 8)

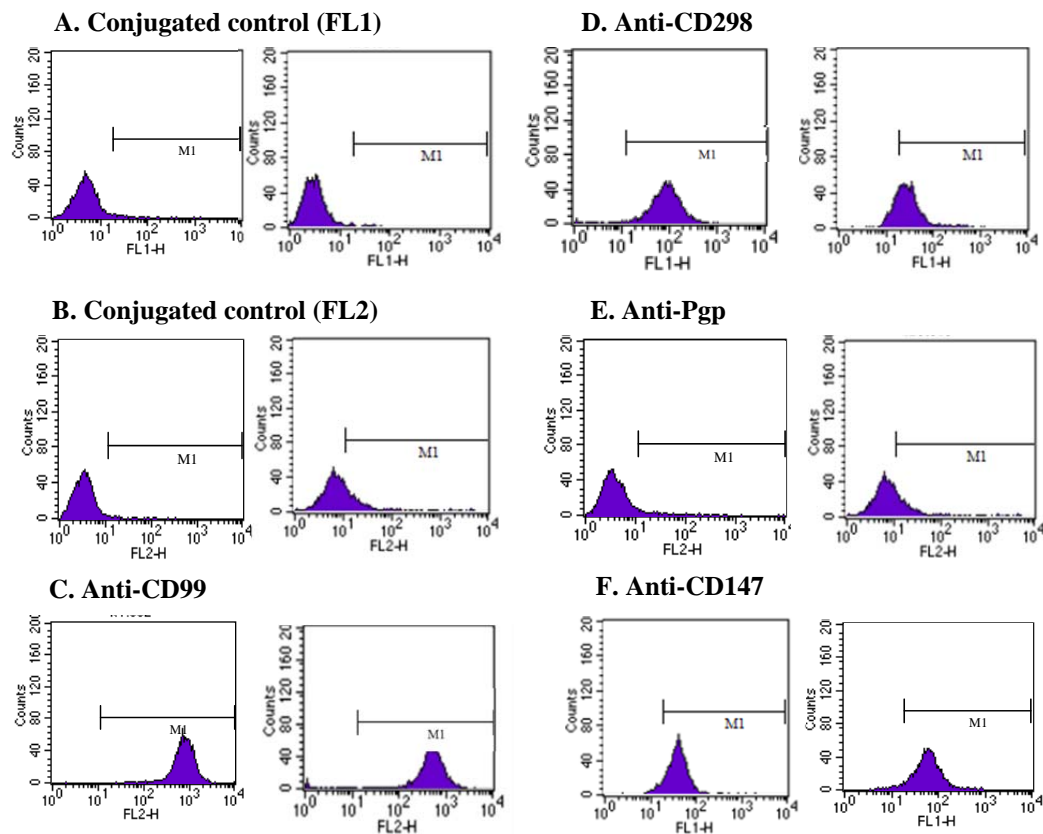


รูปที่ 8 ความเป็นพิษของยา Adriamycin ต่อเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับยา Adriamycin ที่ความเข้มข้น 0-10 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดความเป็นพิษของยาต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ผลการทดลองแสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากการทดลอง 3 ครั้งในเวลาแตกต่างกัน และ * คือค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr

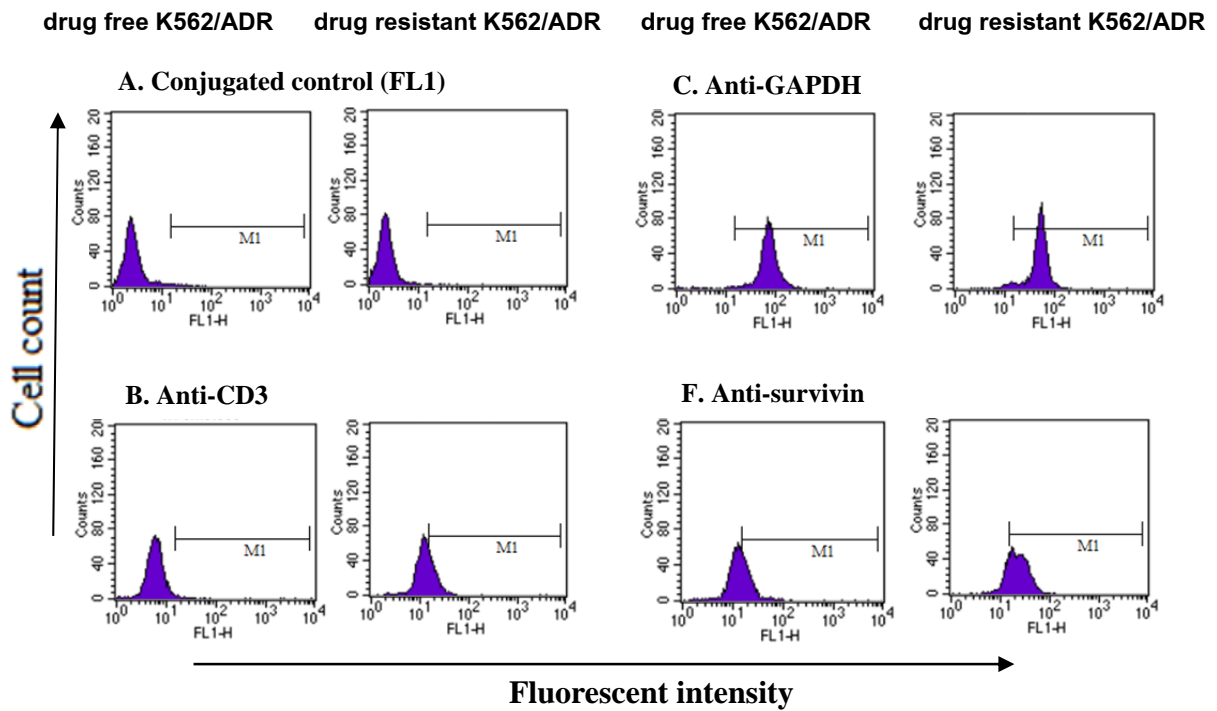
2. การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และ เซอร์ไววิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พะเลียงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี flow cytometry

ทำการศึกษาการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของ พี-ไกลโคโปรตีน และ CD147 และการแสดงออกภายในเซลล์ของเซอร์ไววิน โดยการย้อม indirect immunofluorescent staining และวิเคราะห์ผลโดยวิธี flow cytometry ผลการทดลอง พบว่าโมเลกุล พี-ไกลโคโปรตีน และ CD147 (รูปที่ 9) และ เซอร์ไววิน (รูปที่10) มีการแสดงออกมากในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวพะเลียงชนิด drug resistant K562/Adr เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ชนิด drug free K562/Adr โดยมีค่า mean fluorescent intensity (MFI) สำหรับการแสดงออกของโมเลกุล พี-ไกลโคโปรตีน โมเลกุล CD147 และเซอร์ไววิน ของเซลล์ drug free K562/Adr เท่ากับ 1.73 ± 0.38 , 16.21 ± 8.34 และ 7.68 ± 4.06 ตามลำดับ ขณะที่เซลล์ drug resistant K562/Adr มีค่า mean fluorescent intensity เท่ากับ 2.49 ± 0.59 , 29.68 ± 17.31 และ 12.10 ± 5.03 สำหรับพี-ไกลโคโปรตีน CD147 และเซอร์ไววิน (ตารางที่ 4)

drug free K562/ADR drug resistant K562/ADR drug free K562/ADR drug resistant K562/ADR



รูปที่ 9 การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน และ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวพะเลียงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr นำเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ย้อมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD99 mAb (C), anti-CD298 mAb (D), anti-Pgp mAb (E), anti-CD147 mAb (F), และ conjugate control (A and B) ตรวจวิเคราะห์โดยฟลูออริสเซนซ์



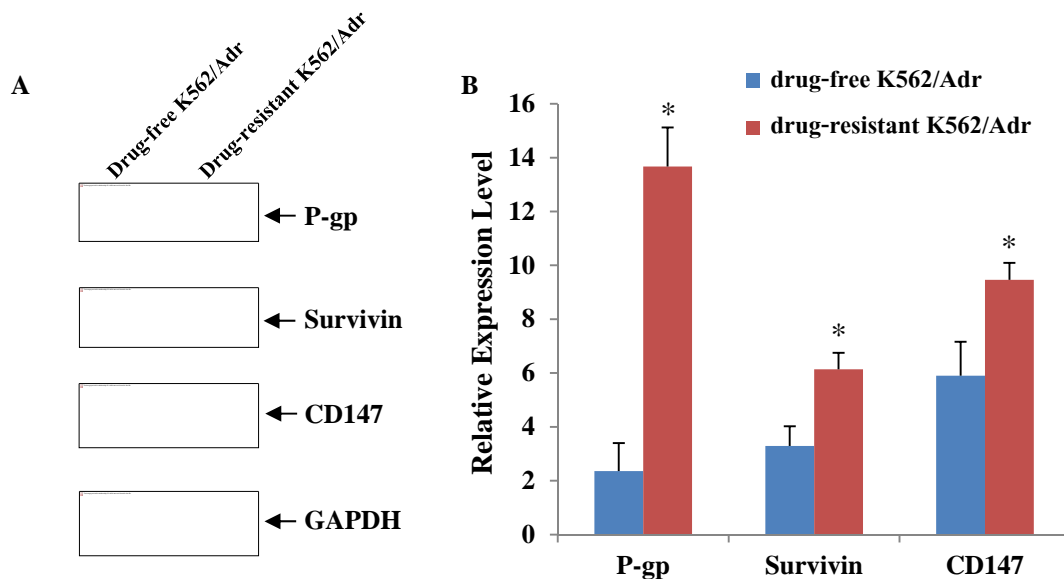
รูปที่ 10 การแสดงออกของเซอรวิเวินภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr นำเซลล์มาย้อม conjugate antibody (conjugate control) (A), anti-CD3 mAb (B), anti-GAPDH mAb (C) หรือ anti-survivin mAb (D) ตรวจสอบวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเซอรวิเวินโดยวิธีฟลูออโรไซโตเมตรี

ตารางที่ 4 การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และเซอรวิเวินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจ

โมโนโคลนอล แอนติบอดี	ค่า mean fluorescence intensities (MFI)	
	drug-free K562/Adr	drug resistant K562/Adr
Anti-P-gp	1.73±0.38	2.49±0.59
Anti-CD147	16.21±8.34	29.68±17.31
Anti-survivin	7.68±4.06	12.10±5.03

3. การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และ เซอร์ไววิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western blot analysis

การศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis โดยเทียบความเข้มของแถบแบนกับโปรตีน GAPDH ซึ่งใช้เป็น loading control จากรูป 11A แสดงแถบแบนของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ที่มีขนาดโปรตีน 170, 16.5, และ 50-60 กิโลดาลตันตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระดับการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr สูงกว่าในเซลล์ชนิด drug-free K562/Adr อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (แสดงดังรูปที่ 11B) โดยในเซลล์ drug-free K562/Adr มีค่า relative expression levels ของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 เท่ากับ 2.36 ± 1.04 , 3.29 ± 0.73 , และ 5.9 ± 1.26 ตามลำดับ สำหรับเซลล์ drug resistant K562/Adr มีค่า relative expression levels ของพี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 เท่ากับ 13.67 ± 1.45 , 6.14 ± 0.61 , และ 9.46 ± 0.63 ตามลำดับ

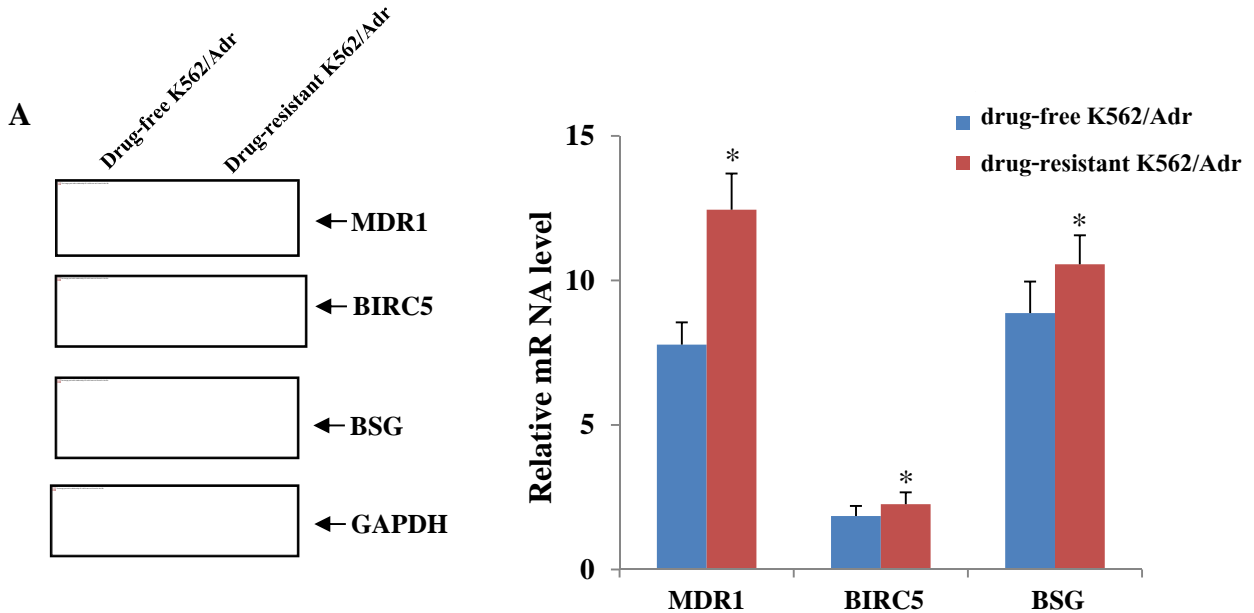


รูปที่ 11 การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr (A) แสดงแถบแบนของโปรตีน พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 (B) ระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr เมื่อเปรียบเทียบกับ GAPDH ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * เท่ากับค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr

4. การแสดงออกของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA ที่กำหนดการสร้าง พี-ไกลโคโปรตีน CD147 และ เซอร์ไววิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR

จากผลการแสดงออกในระดับโปรตีนที่สูงขึ้นของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ในเซลล์ชนิด drug resistant K562/Adr จึงนำมาสู่การศึกษาการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA ที่กำหนดการสร้าง พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 ตามลำดับ โดยวิธี semiquantitative RT-PCR ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 12A พบว่าขนาดของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA เท่ากับ 295, 497 และ 326 bp ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12B พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA ในเซลล์ชนิด drug resistant K562/Adr เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug free K562/Adr ($p < 0.05$) โดยระดับการแสดงออกของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA เท่ากับ 7.78 ± 0.77 , 1.85 ± 0.35 และ 8.87 ± 1.09 ในเซลล์ drug free K562/Adr และเท่ากับ

12.45±1.25, 2.26±0.41, และ 10.56±1.00 ในเซลล์ drug resistant K562/Adr ตามลำดับ (แสดงดังรูป 12B)



รูปที่ 12 การแสดงออกของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr (A) แสดงแถบแบนของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA โดยวิธี semi quantitative RT-PCR; (B) ระดับการแสดงออกของ MDR1, BIRC5, และ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ที่เปรียบเทียบกับ GAPDH ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * เท่ากับค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr

5. การศึกษาความสัมพันธ์ของโมเลกุล CD147 ต่อการควบคุมการดื้อยาของเซลล์ drug resistant K562/Adr โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147

เพื่อศึกษาบทบาทของ CD147 ต่อการดื้อยาในเซลล์ drug resistant K562/Adr ผู้วิจัยจึงใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 จำนวน 4 ชนิดมาเป็นเครื่องมือในการศึกษาคือ M6-1E9, M6-1D4, MEM-M6/1, และ MEM-M6/6

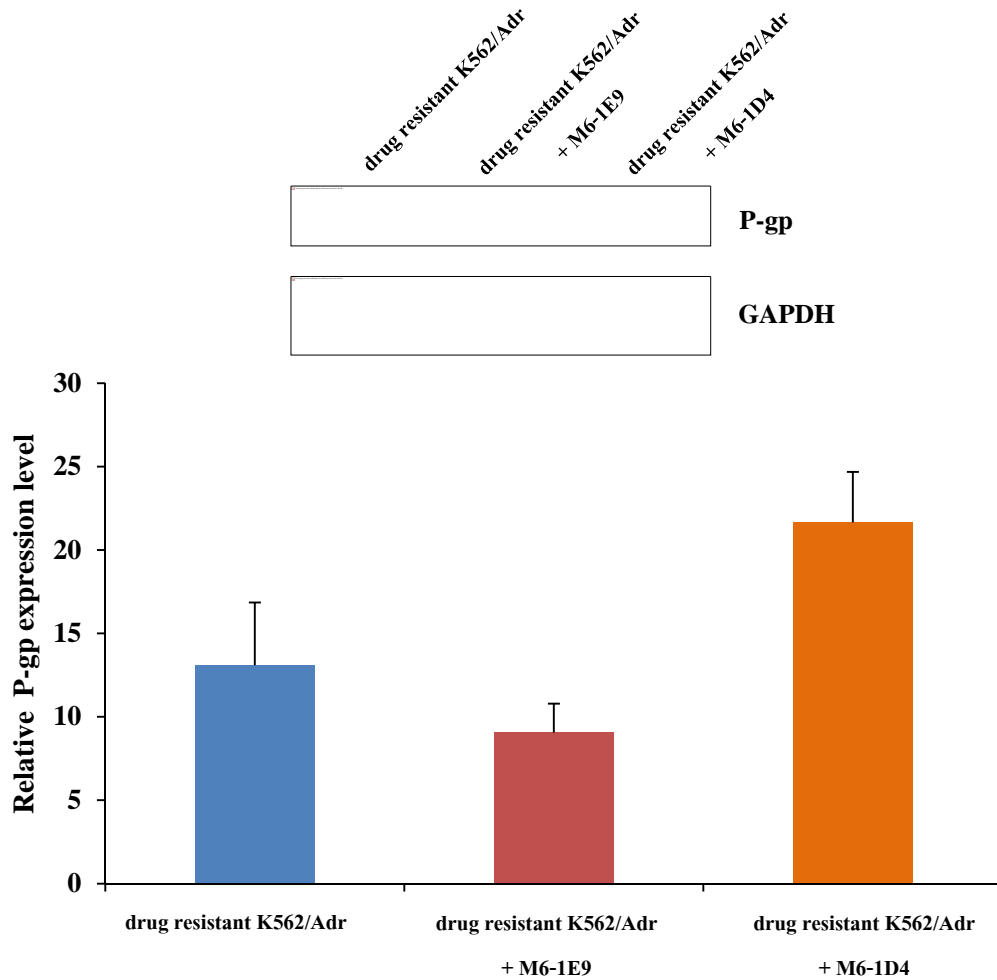
5.1 ผลของ anti-CD147 ต่อการแสดงออกของโมเลกุล พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไวกิน และ CD147

เพื่อศึกษาบทบาทของ CD147 ต่อการดื้อยาในเซลล์ drug resistant K562/Adr ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 จำนวน 4 ชนิดมาใช้ในการศึกษาคือ M6-1E9, M6-1D4, MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 โดยนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ทั้ง 4 ชนิดเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอจากเซลล์เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยวิธี Western blotting และ semiquantitative RT-PCR

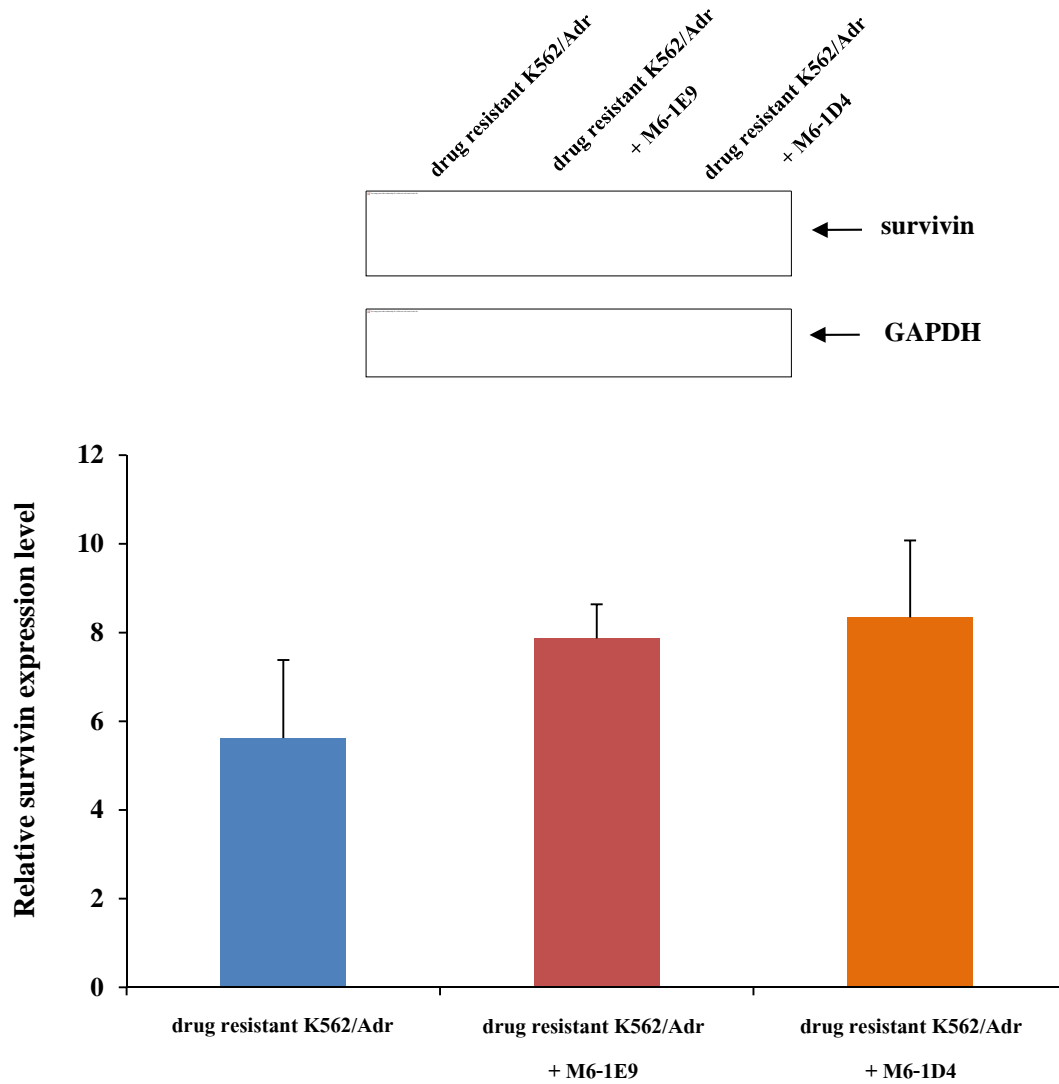
การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด M6-1E9 และ M6-1D4 ต่อการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไวกินและ CD147 พบว่า การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไวกิน และ CD147 ของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เติมแอนติบอดีไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ได้เติม M6-1E9 หรือ M6-1D4 (แสดงดังรูปที่ 13-15)

เมื่อนำเซลล์ชนิด drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด MEM-M6/1 หรือ MEM-M6/6 ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไวกิน และ CD147 ลดลงในเซลล์ที่มีการเติม MEM-M6/6 และการแสดงออกที่ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติบอดี (dose dependent manner) โดยพบว่า MEM-M6/6 ความเข้มข้น 2.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ มีผลลดการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติม MEM-M6/6 ค่าเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนลดลงเหลือ 72.13 ± 5.97 และ 53.66 ± 8.21 (รูปที่ 16) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า MEM-M6/6 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น ที่ลดการแสดงออกของโปรตีน CD147 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกเท่ากับ 37.82 ± 12.59 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี (รูปที่ 17) นอกจากนี้การเติม MEM-M6/6 มีแนวโน้มว่าจะลดการแสดงออกของโปรตีนเซอร์ไวกิน (16.5 kDa) (รูปที่ 18)

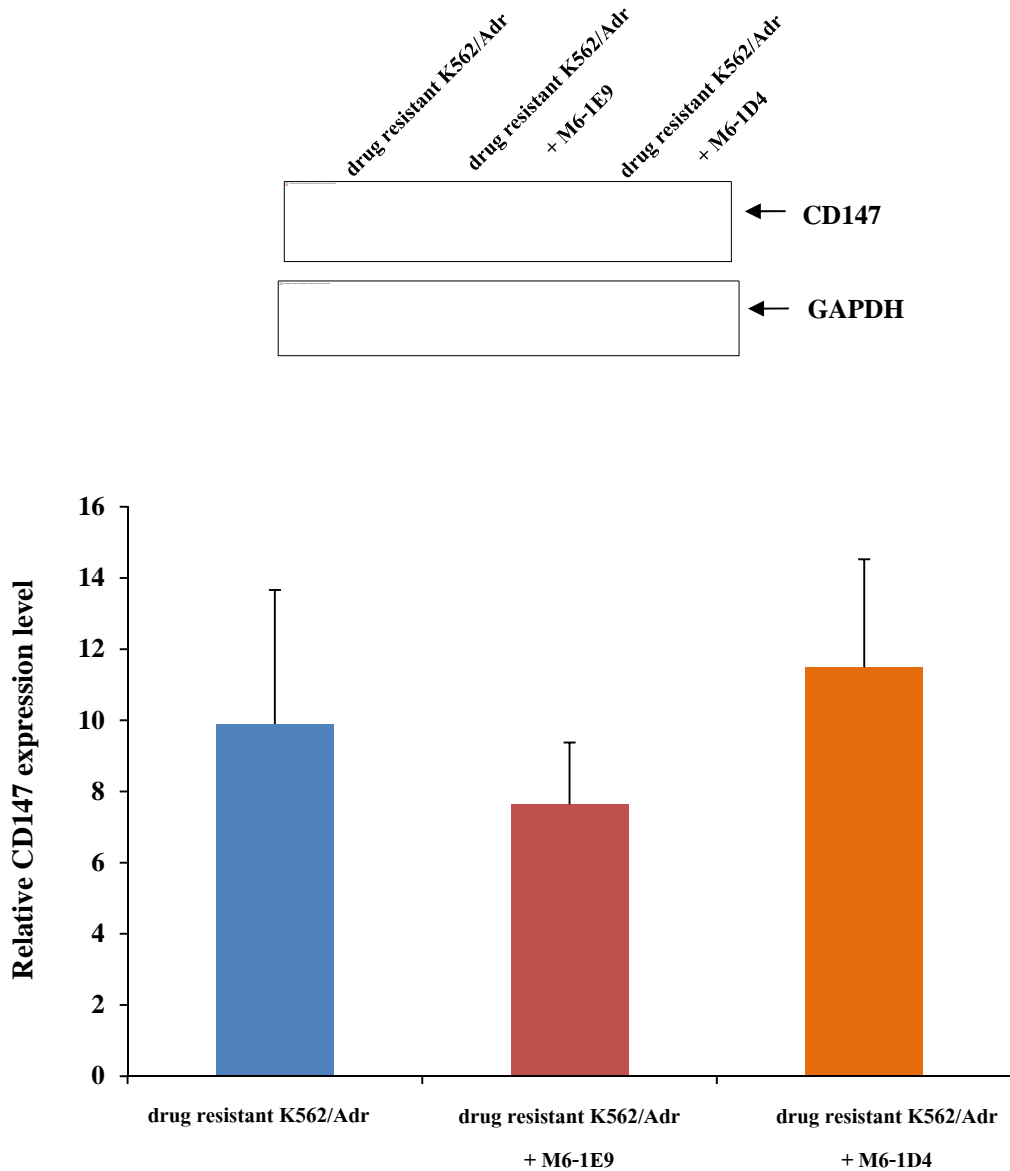
ในขณะที่การเติม MEM-M6/1 ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไวกิน และ CD147 โดยเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไวกิน และ CD147 เหลือเท่ากับ 39.23 ± 10.36 , 44.32 ± 5.99 , และ 26.06 ± 2.36 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี MEM-M6/1 (รูปที่ 16-18) ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB1 anti- γ_4 antibody ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใช้เป็น isotype matched control พบว่าการแสดงออกของโปรตีนทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันในเซลล์ที่เติมหรือไม่เติมแอนติบอดี ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกที่ลดลงของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไวกินน่าจะเกิดจากการส่งสัญญาณจากการจับกันของโมเลกุล CD147 บนผิวเซลล์กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6



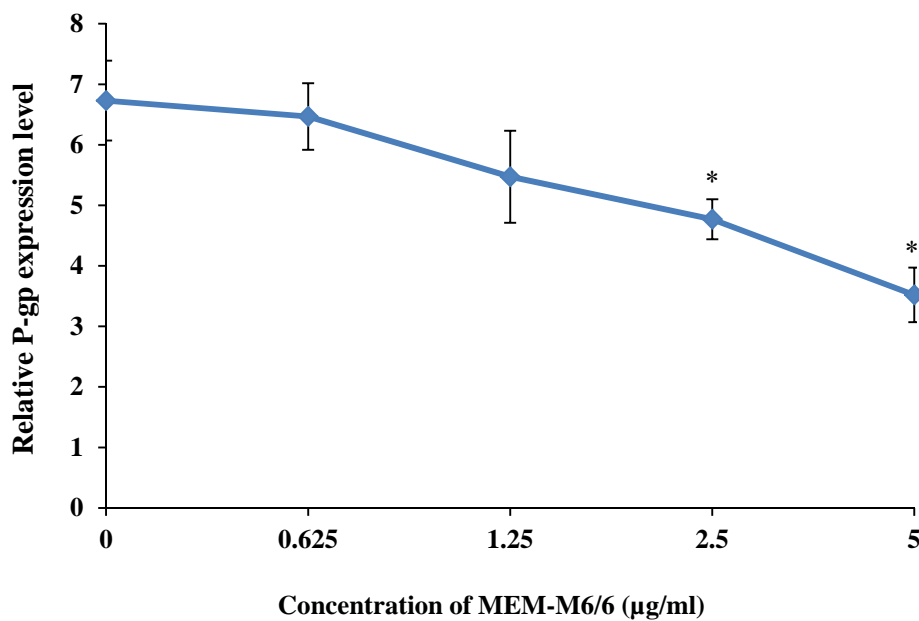
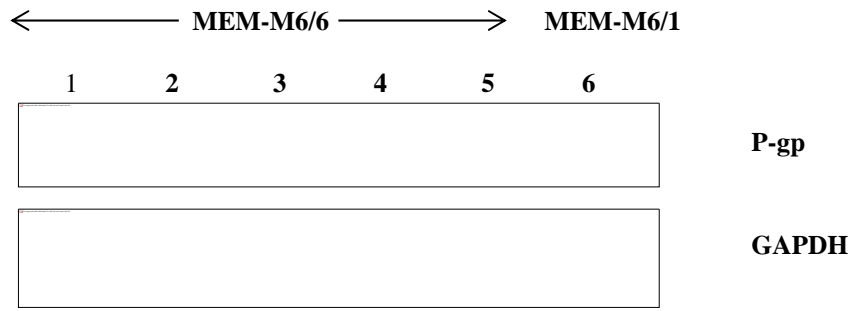
รูปที่ 13 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ 30 µg/ml M6-1E9 (เลขที่ 2) และ 30 µg/ml M6-1D4 (เลขที่ 3) นาน 48 ชั่วโมงโดยวิธี Western blotting ระดับการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนจะเปรียบเทียบกับ GAPDH (loading control) ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน



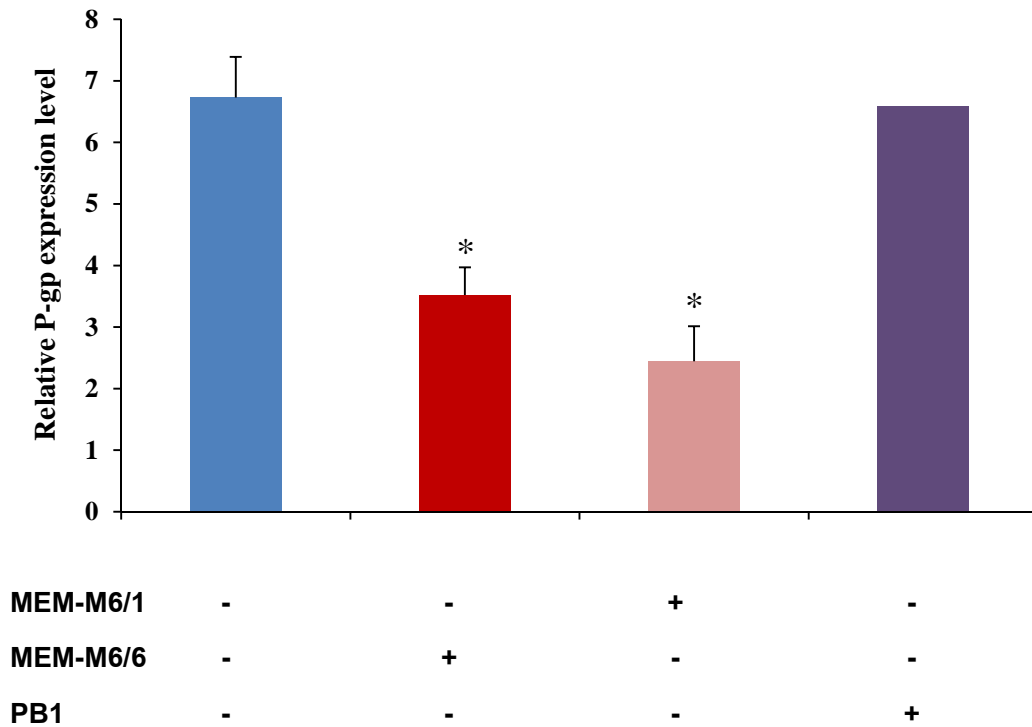
รูปที่ 14 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของเซอร์ไววินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ 30 µg/ml M6-1E9 (เลขที่ 2) และ 30 µg/ml M6-1D4 (เลขที่ 3) นาน 48 ชั่วโมงโดยวิธี Western blotting ระดับการแสดงออกของเซอร์ไววินจะเปรียบเทียบกับ GAPDH (loading control) ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน



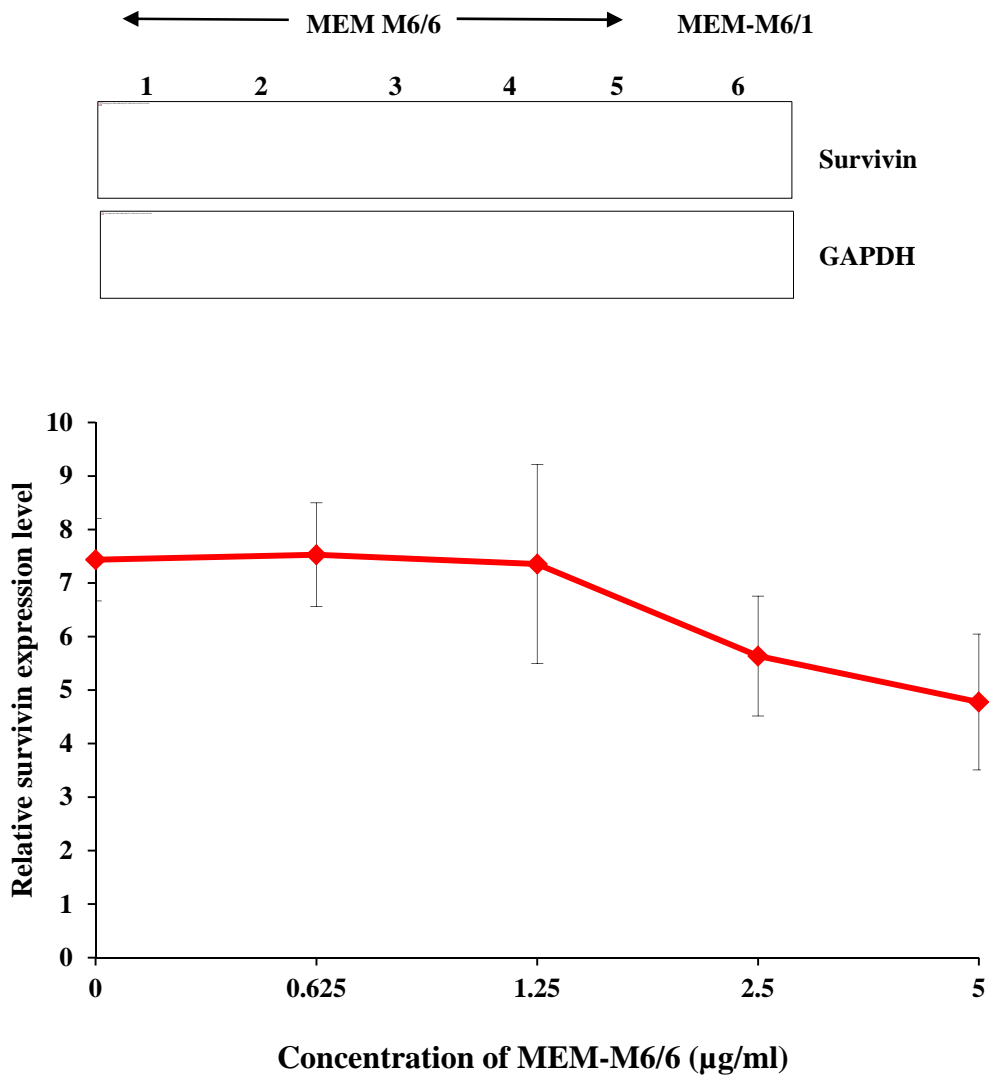
รูปที่ 15 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของ CD147 ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ 30 µg/ml M6-1E9 (เลนที่ 2) และ 30 µg/ml M6-1D4 (เลนที่ 3) นาน 48 ชั่วโมงโดยวิธี Western blotting ระดับการแสดงออกของ CD147 เปรียบเทียบกับ GAPDH (loading control) ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน



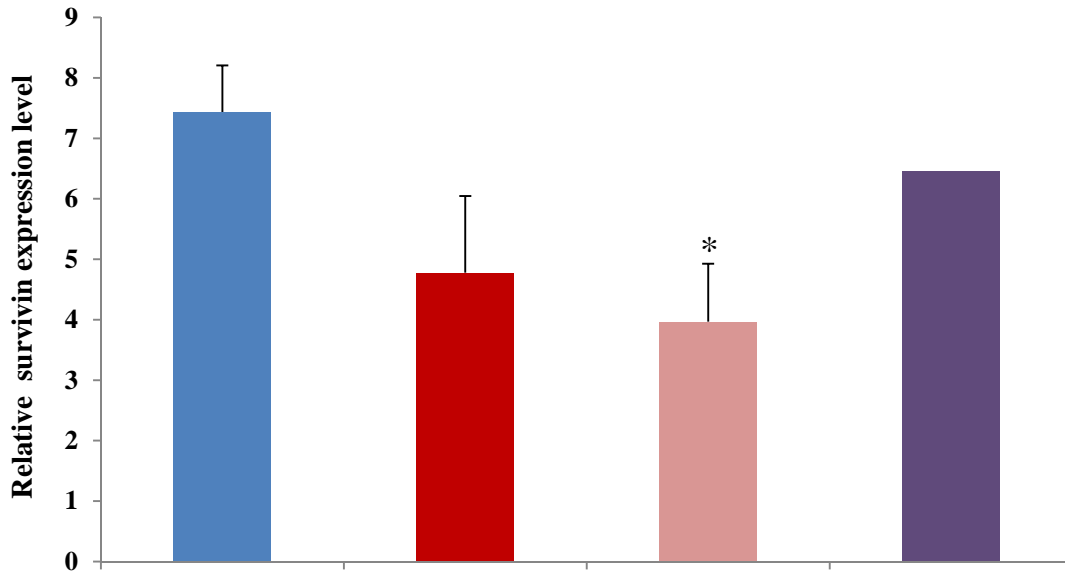
รูปที่ 16 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ที่ ความเข้มข้น 0 µg/ml (เลนที่ 1), 0.625 µg/ml (เลนที่ 2), 1.25 µg/ml (เลนที่ 3), 2.5 µg/ml (เลนที่ 4), 5 µg/ml (เลนที่ 5), และ 5 µg/ml ของ MEM-M6/1 (เลนที่ 6) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนเปรียบเทียบกับโปรตีน GAPDH ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งในเวลาแตกต่างกันโดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี



รูปที่ 17 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของพี ไกลโคโปรตีนของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 หรือ MEM-M6/6 หรือ PB1 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ระดับการแสดงออกของพี ไกลโคโปรตีนเปรียบเทียบกับโปรตีน GAPDH ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน ยกเว้นสภาวะที่เติม PB1 ได้จากการทดลอง 1 ครั้ง โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอลแอนติบอดี

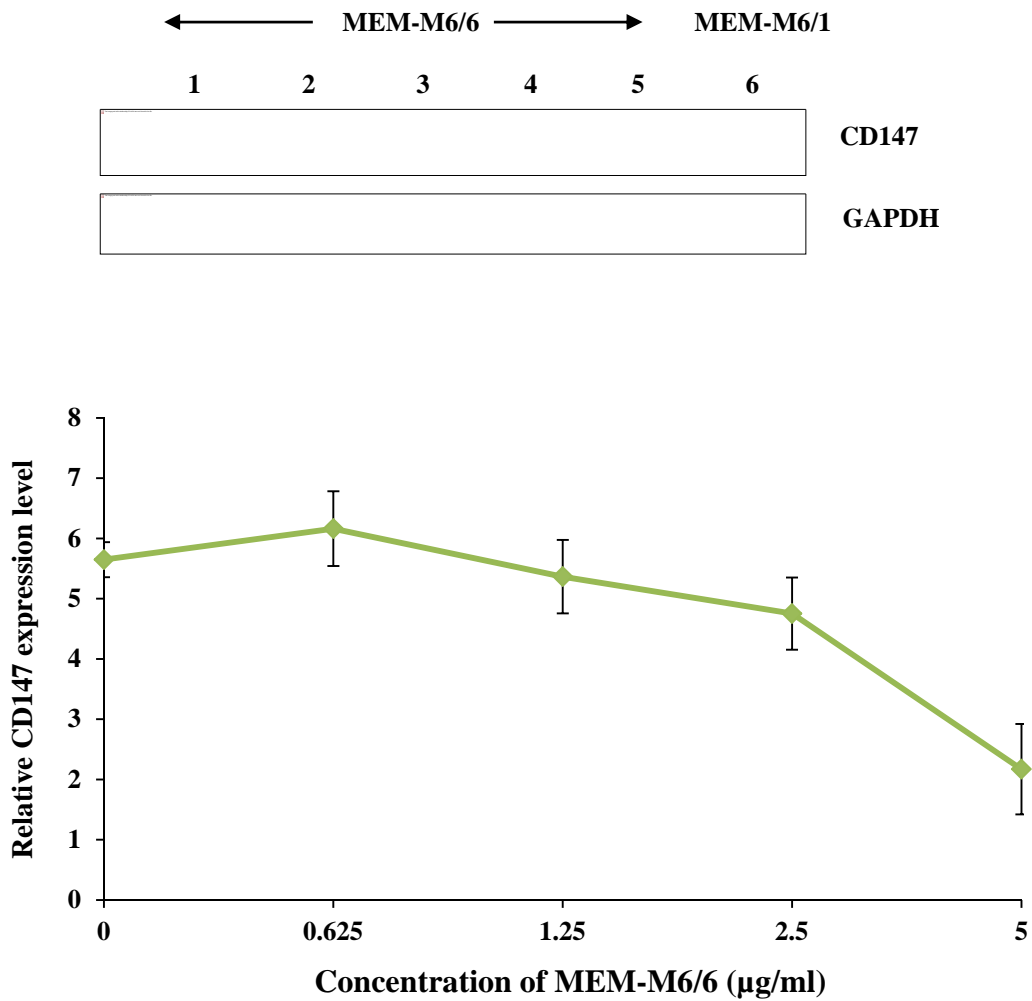


รูปที่ 18 ผลของโมนโคโนล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของเซอร์ไววิน ของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนโคโนล แอนติบอดี MEM-M6/6 ที่ความเข้มข้น 0 µg/ml (เลนที่ 1), 0.625 µg/ml (เลนที่ 2), 1.25 µg/ml (เลนที่ 3), 2.5 µg/ml (เลนที่ 4), 5 µg/ml (เลนที่ 5) และ 5 µg/ml ของ MEM-M6/1 (เลนที่ 6) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของเซอร์ไววินเปรียบเทียบกับโปรตีน GAPDH ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน

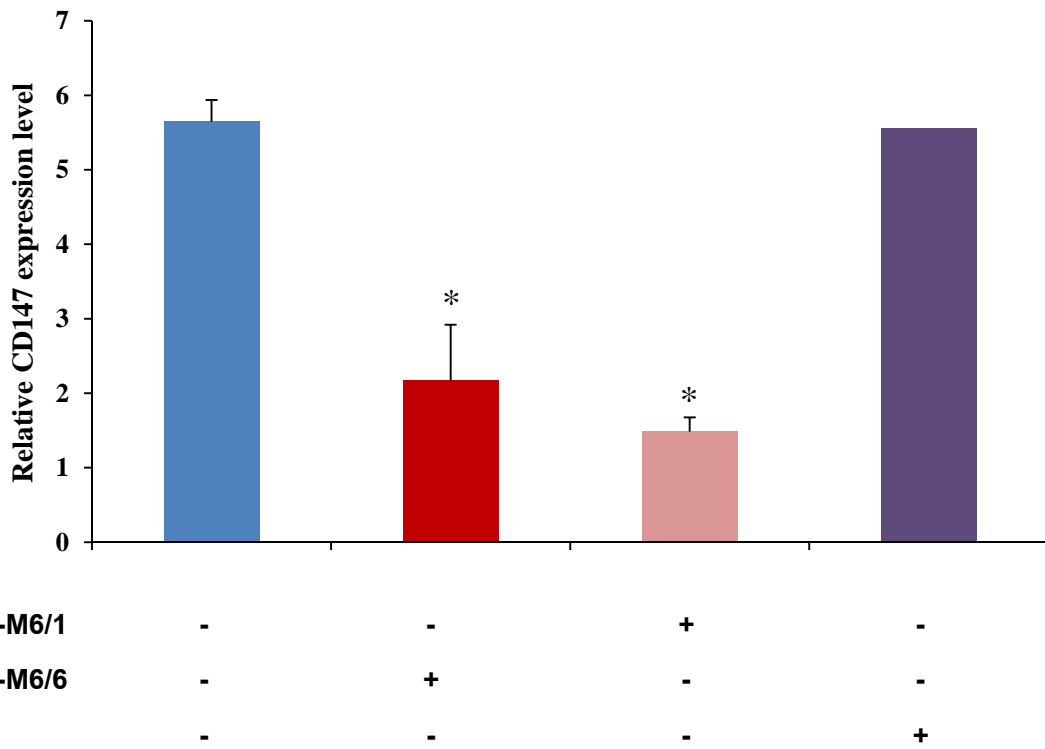


MEM-M6/1	-	-	+	-
MEM-M6/6	-	+	-	-
PB1	-	-	-	+

รูปที่ 19 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของเซอร์ไววินของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 หรือ MEM-M6/6 หรือ PB1 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ระดับการแสดงออกของเซอร์ไววินเปรียบเทียบกับโปรตีน GAPDH ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน ยกเว้นสภาวะที่เติม PB1 ได้จากการทดลอง 1 ครั้ง โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี



รูปที่ 20 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของ CD147 ของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ที่ความเข้มข้น 0 µg/ml (เลนที่ 1), 0.625 µg/ml (เลนที่ 2), 1.25 µg/ml (เลนที่ 3), 2.5 µg/ml (เลนที่ 4), 5 µg/ml (เลนที่ 5), และ 5 µg/ml ของ MEM-M6/1 (เลนที่ 6) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของ CD147 เปรียบเทียบกับโปรตีน GAPDH ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งในเวลาแตกต่างกันโดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี



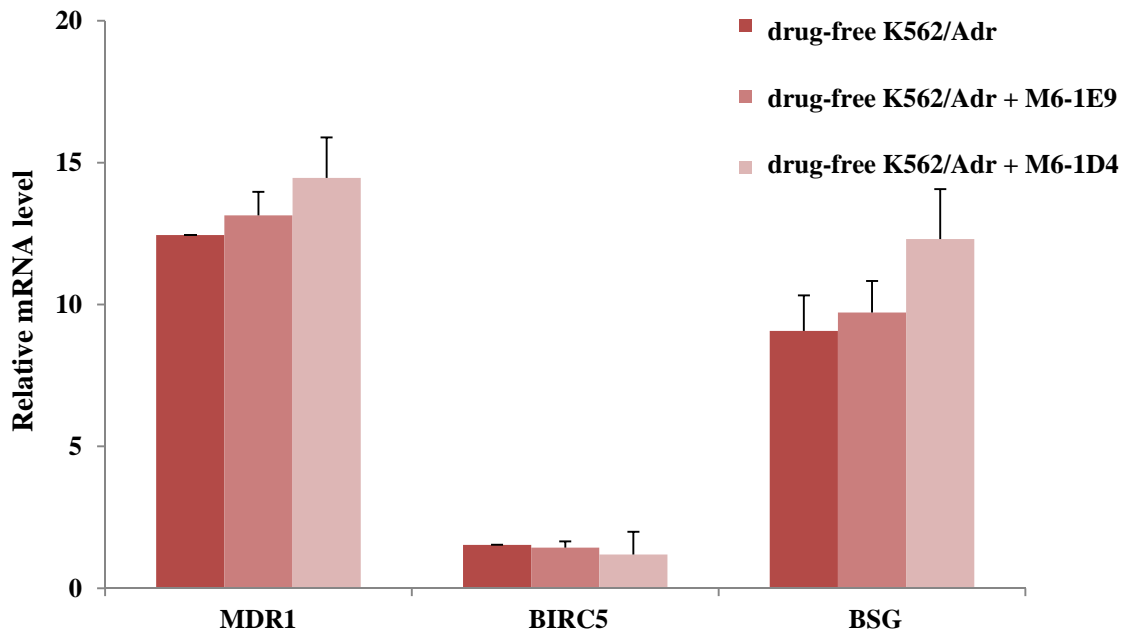
รูปที่ 21 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Western Blotting การแสดงออกของ CD147 ของเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 หรือ MEM-M6/6 หรือ PB1 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ระดับการแสดงออกของ CD147 เปรียบเทียบกับโปรตีน GAPDH ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน ยกเว้นสภาวะที่เติม PB1 ได้จากการทดลอง 1 ครั้ง โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี

5.2 การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 ต่อการแสดงออกของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA

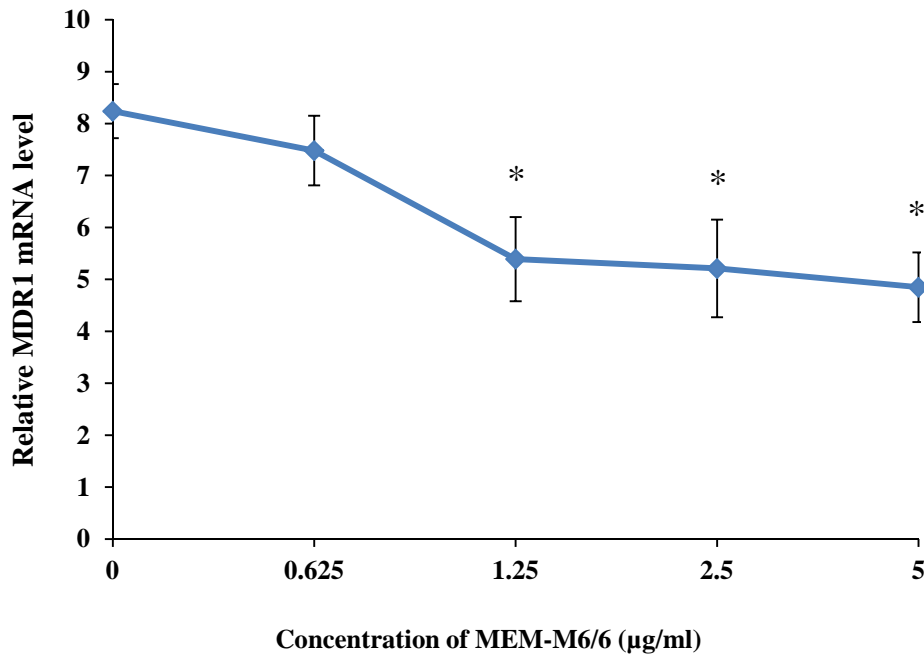
ผู้วิจัยทำการศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD 147 ต่อการแสดงออกของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA โดยนำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 จำนวน 4 โคลน (M6-1E9, M61-D4, MEM-M6/1, และ MEM-M6/6) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาสกัดอาร์เอ็นเอและศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอที่สนใจโดยวิธี semi-quantitative RT-PCR

ผลการทดลองพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1E9 และ M6-1D4 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MDR1, survivin, และ BSG mRNA ของเซลล์ drug resistant K562/Adr เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่ได้เติมโมโนโคลนอล แอนติบอดี (รูปที่ 22) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ drug resistant K562/Adr ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 หรือ MEM-M6/6 พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 สามารถลดระดับการแสดงออกของ MDR1, survivin และ BSG mRNA โดยการลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เติม (รูปที่ 24, 26 และ 28) นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 สามารถลดระดับการแสดงออกของ MDR1 mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี โดยพบว่าแอนติบอดี MEM-M6/6 ที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, และ 5 $\mu\text{g/ml}$ มีร้อยละการแสดงออกของ MDR1 mRNA ที่ลดลงเหลือ 65.27 ± 8.15 , 63.33 ± 10.12 , และ 59.43 ± 8.79 ตามลำดับ (รูปที่ 23) อย่างไรก็ตามสำหรับการแสดงออกของ BIRC5 และ BSG mRNA นั้น พบว่า MEM-M6/6 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้นที่สามารถลดระดับการแสดงออกของ mRNA ทั้งสองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี โดยร้อยละการแสดงออกของ BIRC5 และ BSG mRNA ลดลงเหลือเท่ากับ 66.67 ± 3.91 และ 54.54 ± 9.97 ตามลำดับ (รูปที่ 25 และ 27)

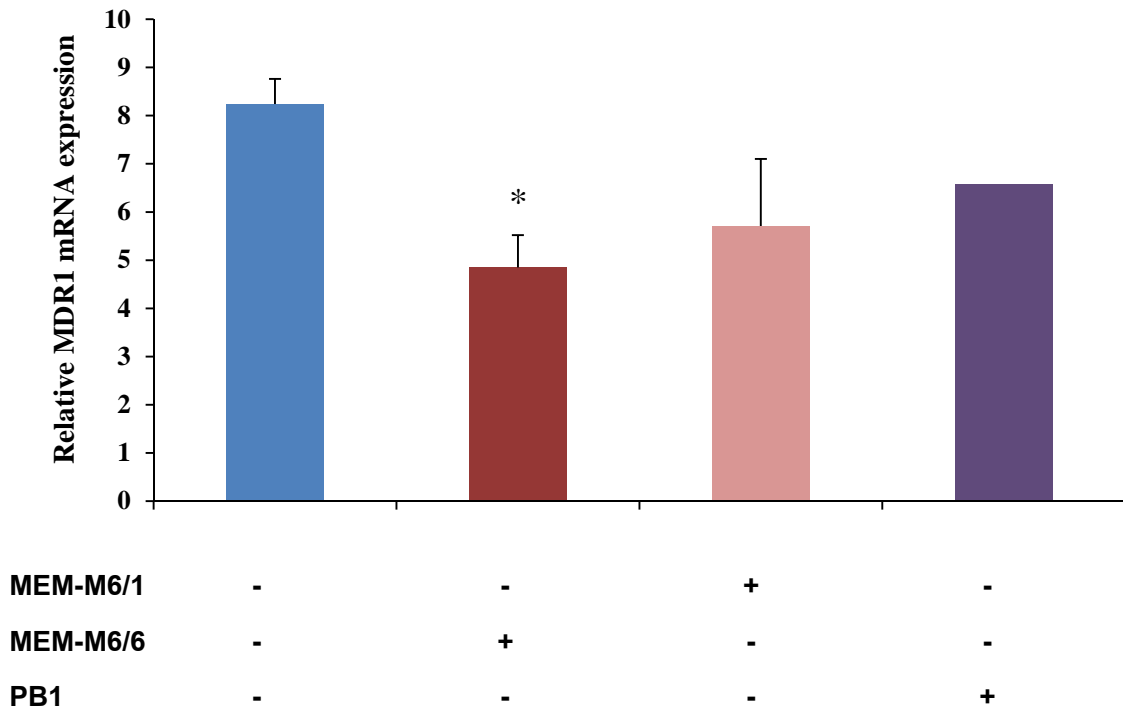
อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ drug resistant K562/Adr ร่วมกับแอนติบอดี MEM-M6/1 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลทำให้การแสดงออกของ MDR1, survivin และ BSG mRNA เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี (รูปที่ 24, 26 และ 28) สำหรับแอนติบอดี PB1 ใช้เป็น isotype matched control พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ mRNA ทั้งสามชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า การจับกันของ CD147 บนเซลล์ กับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ชนิด MEM-M6/6 ส่งผลให้เกิดการลดระดับการแสดงออกของยีน BSG, MDR1 และ BIRC5 mRNA



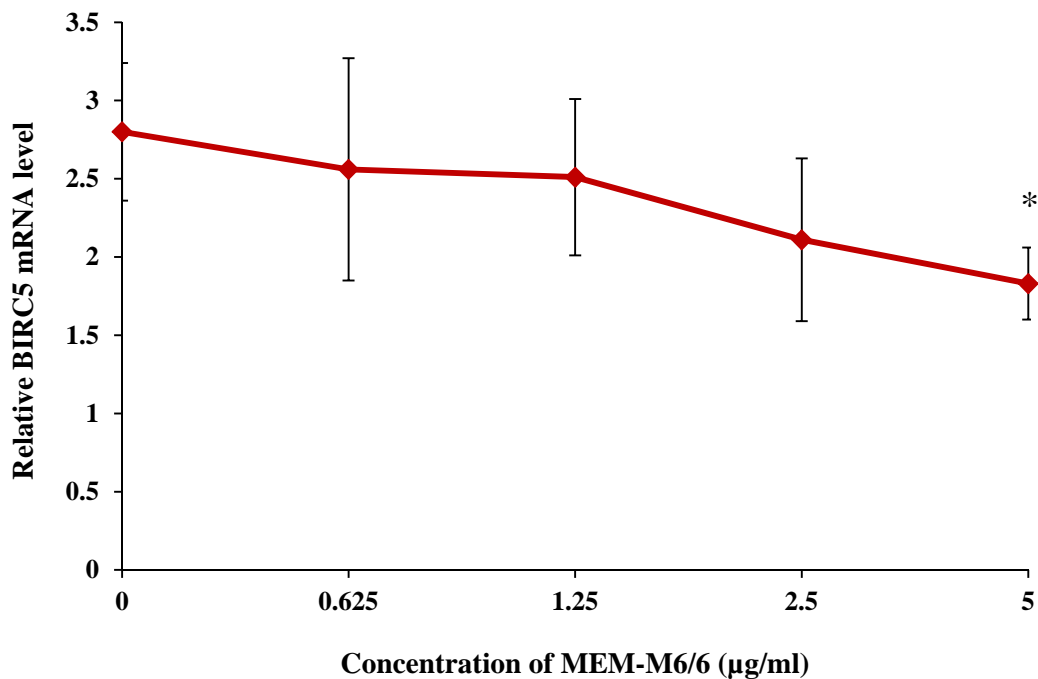
รูปที่ 22 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1D4 และ M6-1E9 ต่อการแสดงออกของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ MDR1, survivin, และ BSG mRNA ของเซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับ 30 μ g/ml M6-1E9 หรือ 30 μ g/ml M6-1D4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอที่สนใจจะนำมาเปรียบเทียบกับ GAPDH mRNA ใช้เป็น internal control ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน



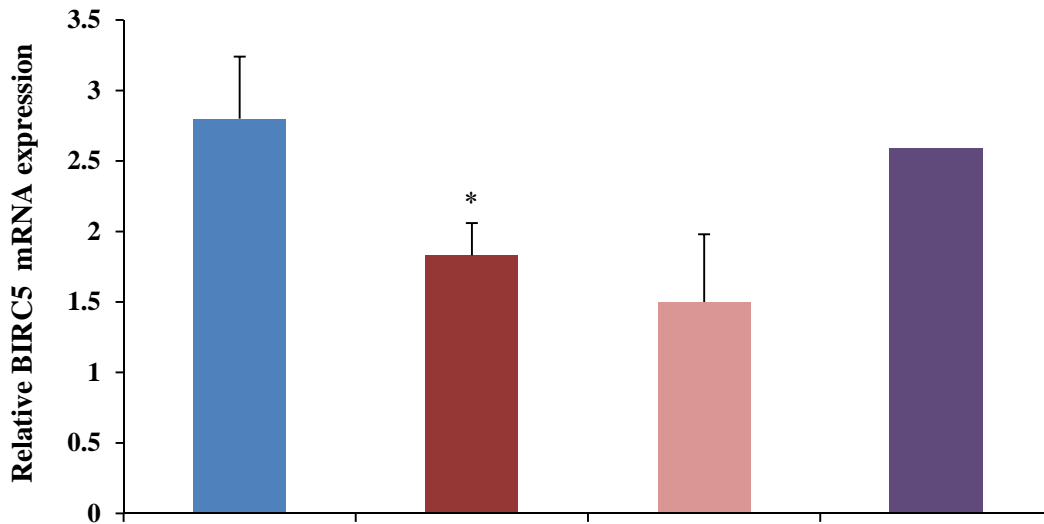
รูปที่ 23 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ MDR1 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ MDR1 mRNA ของเซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 (ความเข้มข้น 0-5 µg/ml) ระดับการแสดงออกของ MDR1 mRNA จะนำมาเปรียบเทียบกับ GAPDH mRNA ใช้เป็น internal control ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี



รูปที่ 24 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ MDR1 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ MDR1 mRNA ในสภาวะที่เซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 หรือ MEM-M6/1 หรือ PB1 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml เปรียบเทียบการแสดงออกกับ GAPDH mRNA ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี

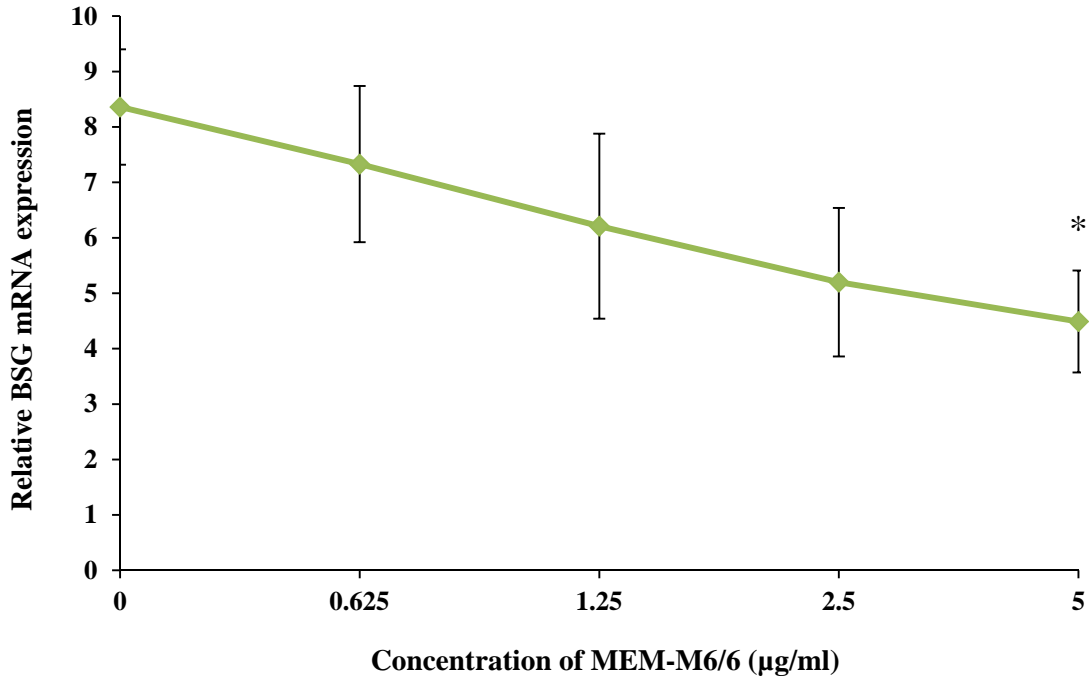


รูปที่ 25 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BIRC5 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ BIRC5 mRNA ของเซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 (ความเข้มข้น 0-5 µg/ml) ระดับการแสดงออกของ BIRC5 mRNA จะนำมาเปรียบเทียบกับ GAPDH mRNA ใช้เป็น internal control ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมโนโคลนอล แอนติบอดี

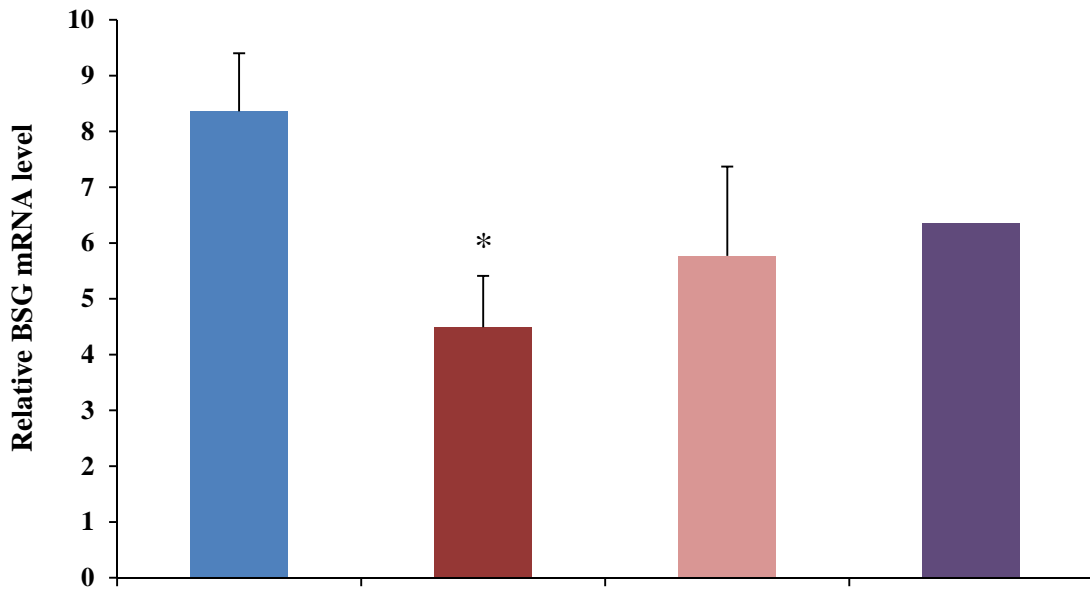


MEM-M6/1	-	-	+	-
MEM-M6/6	-	+	-	-
PB1	-	-	-	+

รูปที่ 26 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BIRC5 mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ BIRC5 mRNA ในสภาวะที่เซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 หรือ MEM-M6/1 หรือ PB1 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml เปรียบเทียบการแสดงออกกับ GAPDH mRNA ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี



รูปที่ 27 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ BSG mRNA ของเซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 (ความเข้มข้น 0-5 µg/ml) ระดับการแสดงออกของ BSG mRNA จะนำมาเปรียบเทียบกับ GAPDH mRNA ใช้เป็น internal control ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี



MEM-M6/1	-	-	+	-
MEM-M6/6	-	+	-	-
PB1	-	-	-	+

รูปที่ 28 ผลของโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 ต่อการแสดงออกของ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR การแสดงออกของ BSG mRNA ในสภาวะที่เซลล์ drug resistant K562/Adr เเพาะเลี้ยงร่วมกับโมนิโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 หรือ MEM-M6/1 หรือ PB1 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml เปรียบเทียบการแสดงออกกับ GAPDH mRNA ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-resistant K562/Adr ที่ไม่เติมโมนิโคลนอล แอนติบอดี

5.3 ผลการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของโมเลกุล CD147 ต่อการลดการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนไม่ผ่าน MAPK/ERK pathway

จากรายงานก่อนหน้ากล่าวถึงการควบคุมโมเลกุล CD147 ต่อการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนผ่านวิถี MAPK/ERK (2) จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการส่งสัญญาณดังกล่าวในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/Adr โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมกับ U0126 (ERK inhibitor) และเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับแอนติบอดีต่อ CD147 คือ MEM-M6/6 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบเวลาแตกเซลล์และศึกษาการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน โดยวิธี Western blotting ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 29 ในสภาวะที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับ U0126 (MAPK/ERK) ก่อนการเติม MEM-M6/6 ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ CD147 พบว่า การแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนไม่เปลี่ยนแปลง โดยมี PB1 anti- γ globin เป็น isotype matched control

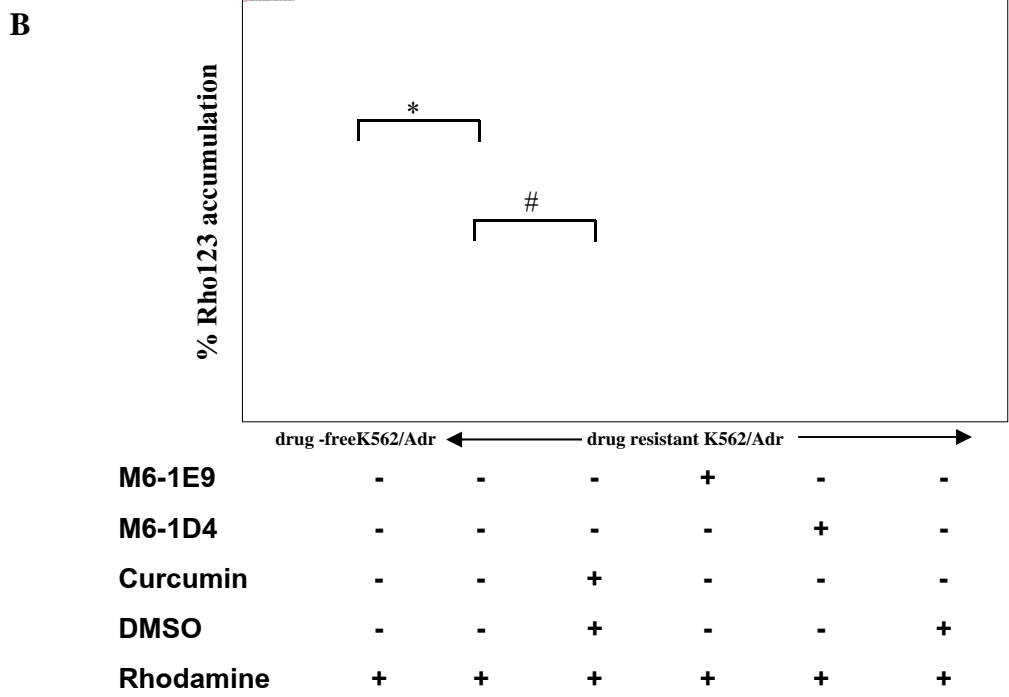
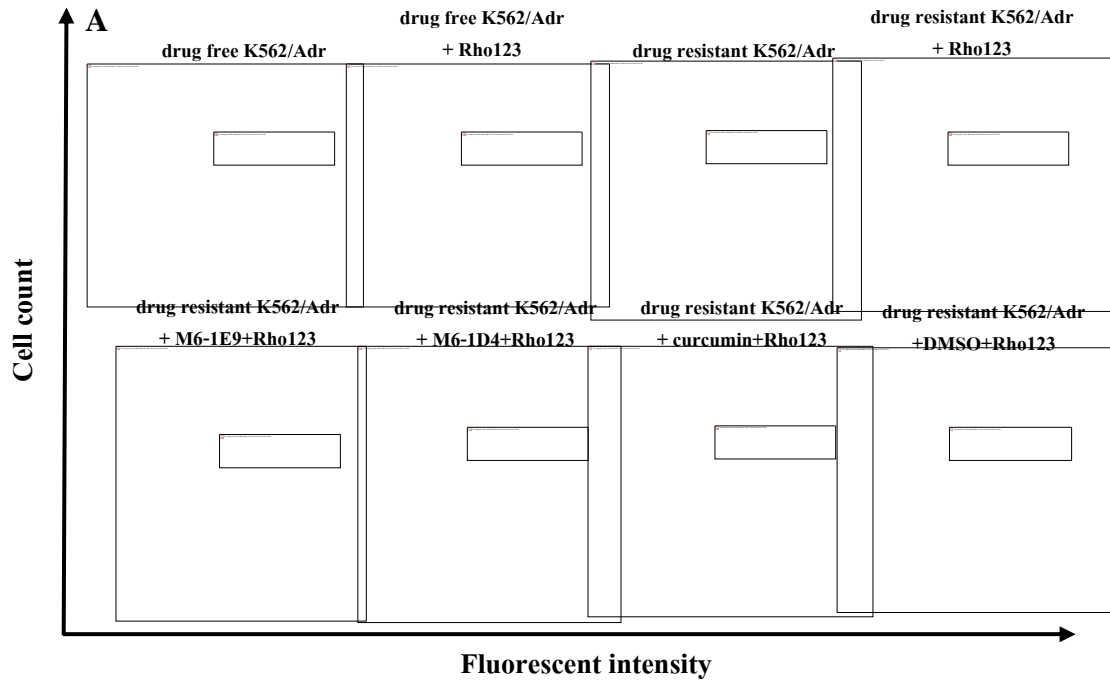
U0126	+	+	+	-	
MEM-M6/6	-	+	-	-	
PB1	-	-	+	-	
					P-gp
					GAPDH

รูปที่ 29 ผลการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของโมเลกุล CD147 ต่อการลดการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับ U0126 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนกระตุ้นเซลล์โดยการเติม MEM-M6/6 แอนติบอดีต่อ CD147 และเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบเวลาทำการแตกเซลล์และทำ SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้ anti-Pgp MT1 หรือ anti-GAPDH เป็น primary antibody

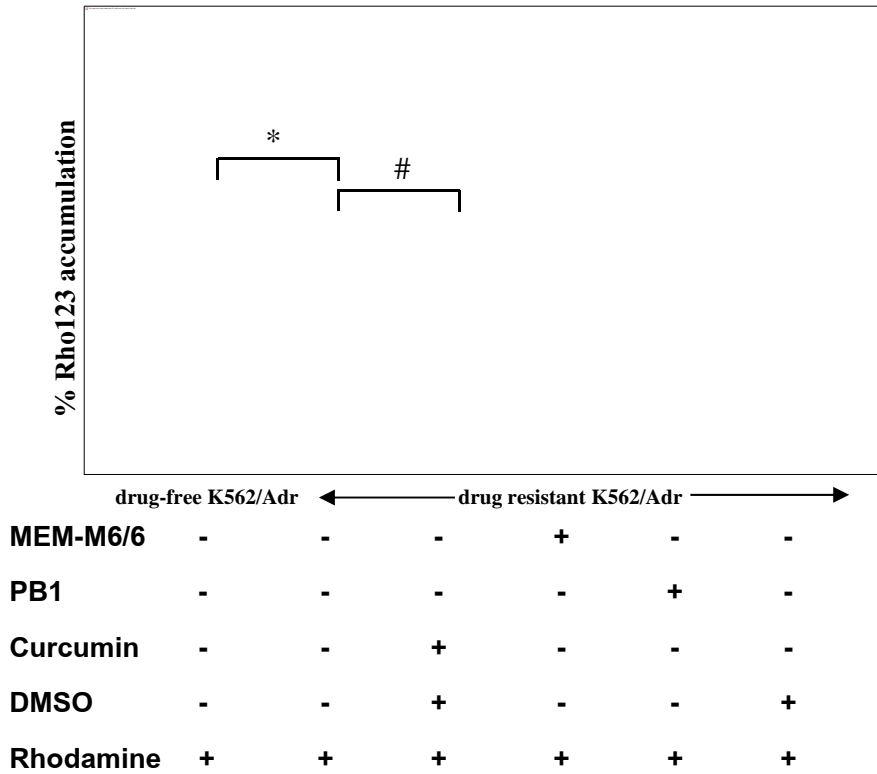
5.4 ผลของ anti-CD147 ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน โดย rhodamine123 efflux

เพื่อศึกษาผลของโมเลกุล CD147 ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 mAbs ชนิด M6-1E9, M6-1D4 และ MEM-M6/6 ในศึกษาทำโดยนำเซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับ anti-CD147 (M6-1E9, M6-1D4 หรือ MEM-M6/6) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม Rhodamine123 (Rho123) ซึ่งเป็น fluorescent dye แทนยาเคมีบำบัด และตรวจวัดปริมาณการสะสม Rho123 ภายในเซลล์โดยวิธี flow cytometry

ผลการทดลอง พบว่าการสะสมของ Rho123 ในเซลล์ drug resistant K562/Adr ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug free K562/Adr โดยร้อยละของการสะสม Rho123 ในเซลล์ drug resistant K562/Adr เท่ากับ 7.92 ± 0.71 (รูปที่ 30) และ $43.44 \pm 18.97\%$ (รูปที่ 31) เมื่อคิดการสะสมของ Rho123 ในเซลล์ drug free K562/Adr เป็น 100% อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่เติม anti-CD147 ทั้งสามโคลนคือ M6-1E9, M6-1D4 หรือ MEM-M6/6 ไม่มีผลต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน โดยค่าการสะสมสาร Rho123 ภายในเซลล์ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1E9, M6-1D4 หรือ MEM-M6/6 (รูปที่ 30 และ 31) นอกจากนี้แอนติบอดี PB1 anti- γ_4 ซึ่งใช้เป็น isotype matched control ก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสะสม Rho123 ภายในเซลล์ ขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ drug resistant K562/Adr ร่วมกับ curcumin ซึ่งเป็น MDR modulator พบว่าการสะสมของ Rho123 ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 30 และ 31)



รูปที่ 30 ผลของโมโนโคหนอล แอนติบอดี M6-1E9 และ M6-1D4 ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนโดยฟลูออโรสเซนซ์ (A) การเรืองแสงฟลูออโรสเซนซ์ของ Rho123 ภายในเซลล์ในสภาวะต่างๆ (B) ร้อยละของการเรืองแสงฟลูออโรสเซนซ์ของ Rho123 ภายในเซลล์ในสภาวะที่มีและไม่มี M6-1E9 หรือ M6-1D4 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr และ # คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ drug resistant K562/Adr



รูปที่ 31 ผลของโมนิโคนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนโดยฟลูออโรเมตริ ร้อยละของการเรืองแสงฟลูออโรเรสเซนซ์ของ Rho123 ภายในเซลล์ในสภาวะที่มีและไม่มี MEM-M6/6 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr และ # คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ drug resistant K562/Adr

5.5 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 ต่อการทำงานของโปรตีนเซอร์ไววินโดย cell cycle assay

เนื่องจากโปรตีนเซอร์ไววินจัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) ทำหน้าที่ควบคุม cell division และ apoptosis ดังนั้นเพื่อศึกษาบทบาทของโมเลกุล CD147 ต่อการทำงานของโปรตีนเซอร์ไววิน โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 mAbs ชนิด M6-1E9, M6-1D4 และ MEM-M6/6 ในศึกษาทำโดยนำเซลล์ drug resistant K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับ anti-CD147 (M6-1E9, M6-1D4 หรือ MEM-M6/6) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์และย้อมด้วยสี propidium iodide (PI) ตรวจวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์จากปริมาณ DNA โดยวิธี flow cytometry

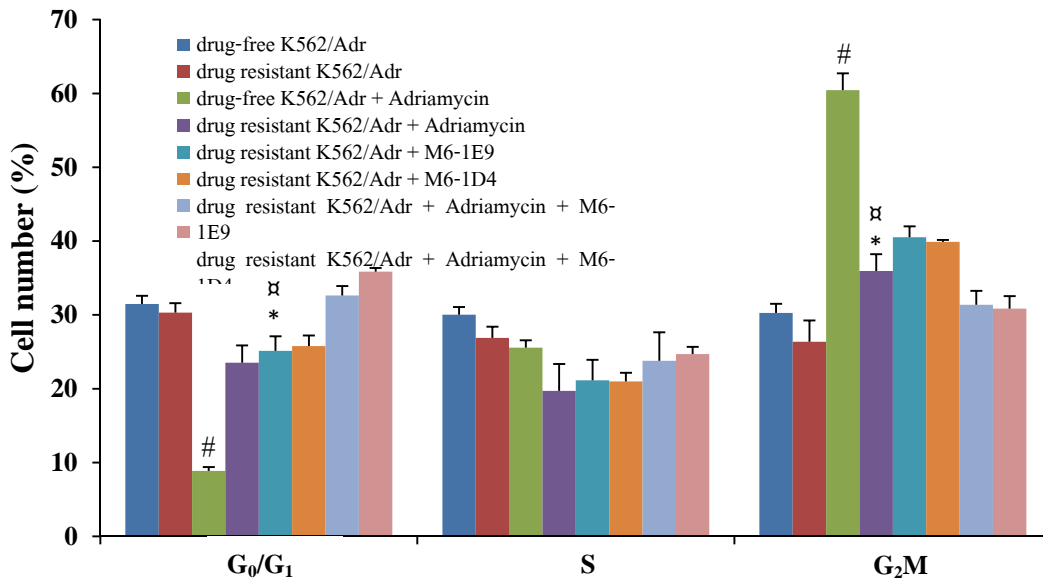
ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 32 และรูปที่ 34 ในสภาวะที่มีการเติมยา Adriamycin พบว่าเซลล์ drug free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr มีเซลล์พักอยู่ที่ระยะ G2/M phase (G2/M phase arrest) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเติมยา Adriamycin แสดงให้เห็นว่ายาเคมีบำบัด Adriamycin มีผลทำให้เซลล์ทั้งสองชนิดเกิด G2/M phase accumulation โดยพบว่าร้อยละของเซลล์ drug free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ในระยะ G2/M เท่ากับ 60.45 ± 0.25 และ 35.94 ± 0.91 ตามลำดับ (รูปที่ 32) และพบร้อยละของเซลล์ drug free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ในระยะ G2/M เท่ากับ 29.17 ± 1.44 และ 21.23 ± 0.49 ตามลำดับ (รูปที่ 34)

ขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1E9, M6-1D4 และ MEM-M6/6 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ทั้งระยะ G0/G1, S และระยะ G2/M เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug resistant K562/Adr ที่ไม่ได้เติมแอนติบอดี (รูปที่ 32 และ รูปที่ 34) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ drug resistant K562/Adr กับยาเคมีบำบัด Adriamycin ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 ผลการทดลองพบว่าวัฏจักรของเซลล์ ไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ที่เติมโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 อย่างเดียว สำหรับ PB1 anti- γ_4 ซึ่งใช้เป็น isotype matched control ก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์

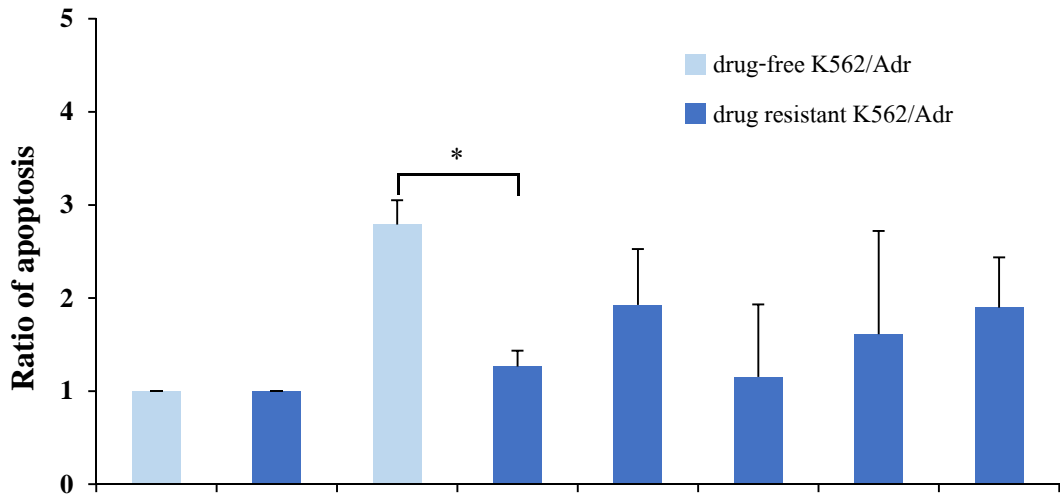
เพื่อศึกษาว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 mAbs มีผลเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัด (chemosensitivity) ของเซลล์ drug resistant K562/Adr หรือไม่ จึงทำการศึกษาการตายของเซลล์โดยวิเคราะห์จาก subG1 peak ของวัฏจักรเซลล์โดยวิธี flow cytometry ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 33 และรูปที่ 35 ในสภาวะที่มียา Adriamycin พบว่าอัตราการเกิดอะ

พอพิโทซิสของเซลล์ drug free K562/Adr เท่ากับ 2.79 ± 0.26 และ 2.46 ± 0.14 ส่วนเซลล์ drug resistant K562/Adr เท่ากับ 1.26 ± 0.17 และ 1.57 ± 0.12

ในขณะที่เซลล์ drug resistant K562/Adr พะเพาะเลี้ยงร่วมกับ anti-CD147 mAbs ได้แก่ M6-1E9, M6-1D4 หรือ MEM-M6/6 พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลง sub-G₁ peak เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ drug resistant K562/Adr ไม่ได้เติมแอนติบอดี และแอนติบอดีที่ใช้เป็น control คือ PB1 anti- γ_4 ก็ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์ drug resistant K562/Adr (รูปที่ 33 และรูปที่ 35)

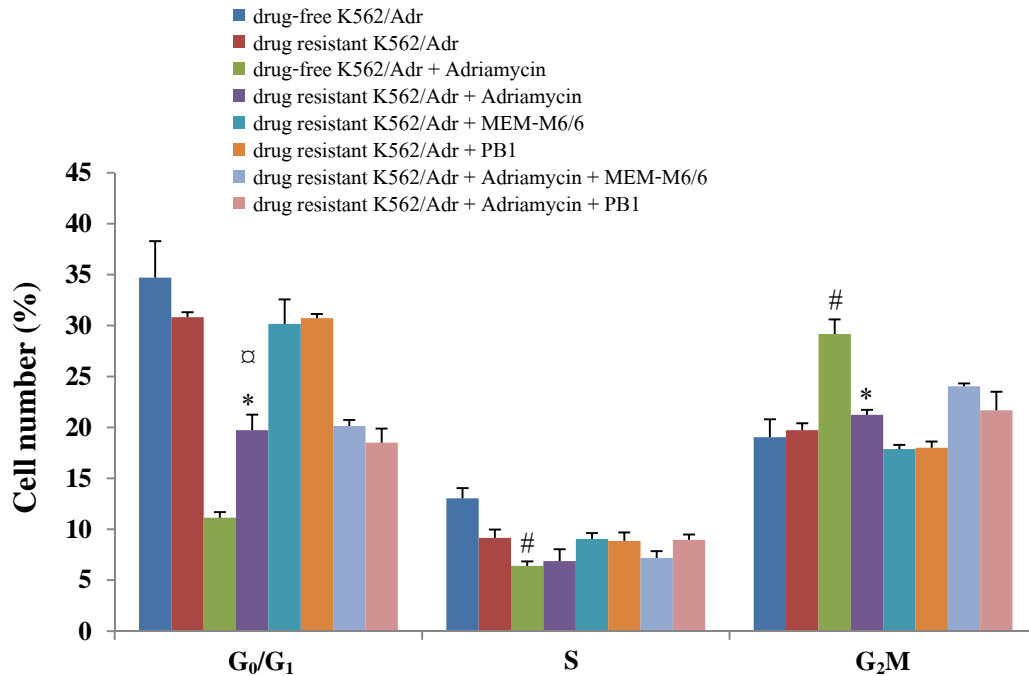


รูปที่ 32 ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี anti-CD147 ต่อการทำงานของโปรตีน เซอร์ไวกิน โดย cell cycle นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงร่วมโมโนโคลนอลแอนติบอดี anti-CD147 และย้อมกับ propidium iodide ตรวจวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยฟลูออโรไซโตเมตรี ร้อยละของเซลล์ที่ระยะ G₀/G₁, S, และ G₂/M ที่สภาวะต่างๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย # คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr; [#] คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug resistant K562/Adr และ * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ drug-free K562/Adr + Adriamycin

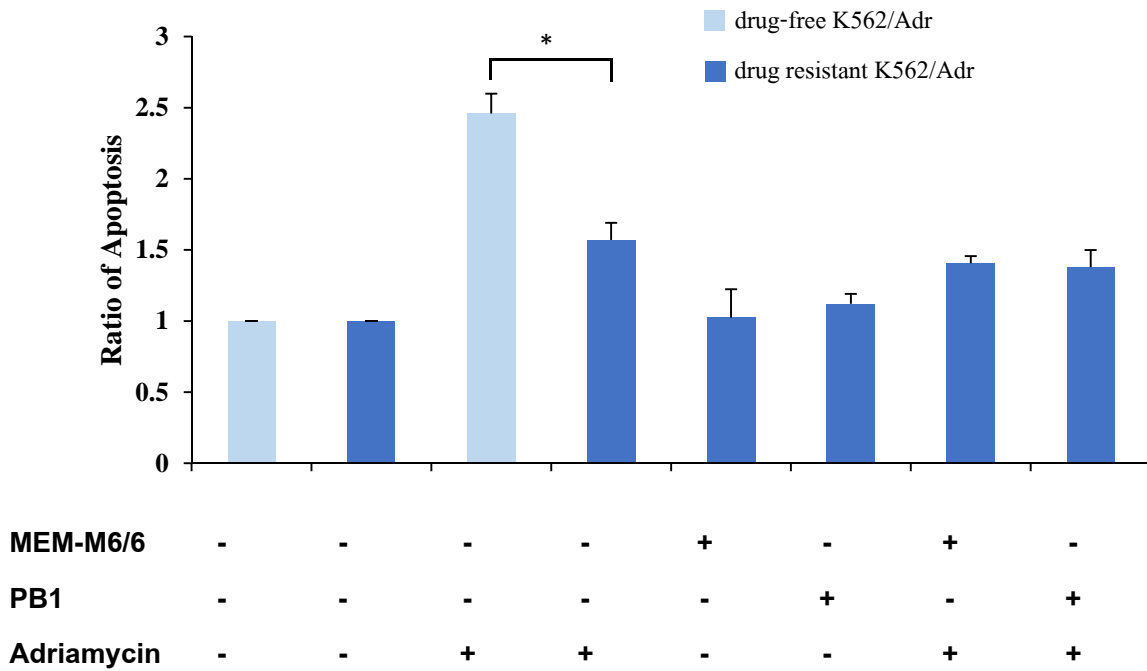


M6-1E9	-	-	-	-	+	-	+	-
M6-1D4	-	-	-	-	-	+	-	+
Adriamycin	-	-	+	+	-	-	+	+

รูปที่ 33 ผลของโมโนโคโนอล แอนติบอดี M6-1E9 และ M6-1D4 ต่อการตายของเซลล์ (sub-G₁ peak) อัตราการตายของเซลล์ที่ระยะ sub-G₁ phase ของเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ที่สภาวะต่างๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr ที่เติมยา Adriamycin



รูปที่ 34 ผลของโมนิโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการทำงานของเซอร์ไววิน โดย cell cycle นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงร่วมโมนิโคโนอลแอนติบอดี MEM-M6/6 และย้อมกับ propidium iodide ตรวจวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยฟลูออริสเซนซ์เมตริ ร้อยละของเซลล์ที่ระยะ G₀/G₁, S, และ G₂/M ที่สภาวะต่างๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย # คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr; □ คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug resistant K562/Adr และ * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ drug-free K562/Adr + Adriamycin



รูปที่ 35 ผลของโมโนโคโนอล แอนติบอดี MEM-M6/6 ต่อการตายของเซลล์ (sub-G₁ peak) อัตราการตายของเซลล์ที่ระยะ sub-G₁ phase ของเซลล์ drug-free K562/Adr และ drug resistant K562/Adr ที่สภาวะต่างๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลองสามครั้งที่เวลาแตกต่างกัน โดย * คือค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr ที่เติมยา Adriamycin

บทวิจารณ์

เคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นการรักษาโรคมะเร็งโดยให้ยาเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งซึ่งอาจจะใช้ยาเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกันหลายชนิด ยาเคมีบำบัดจะออกฤทธิ์โดยฆ่าเซลล์มะเร็งที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) อย่างไรก็ตามการดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance, MDR) เป็นความสามารถของเซลล์มะเร็งในการมีชีวิตอยู่ได้ถึงแม้จะได้รับยาเคมีบำบัดเป็นกลไกที่สำคัญที่ทำให้การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่ประสบผลสำเร็จ กลไกการดื้อยาแบบหลายขนานเกิดจาก เซลล์มะเร็งลดการนำยาเคมีบำบัดเข้าสู่เซลล์ การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็ง การป้องกันไม่ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง และการลดความเข้มข้นของยาเคมีบำบัดโดยเซลล์มะเร็งปั๊มยาเคมีบำบัดออกนอกเซลล์ เป็นต้น (36, 81) ดังนั้นความรู้ความเข้าใจเรื่องการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งจึงมีความสำคัญในการหาวิธีช่วยเหลือผู้ป่วยโรคมะเร็ง โดยการลดหรือป้องกันการดื้อยาเคมีบำบัดของผู้ป่วย

การศึกษาครั้งนี้ นำเซลล์ K562/Adr ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่มีการดื้อต่อยา Adriamycin เป็น cell model ในการทดลอง โดยผู้วิจัยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562/Adr ในสภาวะที่มีการเติมยา Adriamycin เพื่อคงลักษณะ drug resistant เรียกว่า drug resistant K562/Adr และเพาะเลี้ยงเซลล์ K562/Adr ในสภาวะที่ไม่มีการเติมยา Adriamycin เป็นเวลา 5 เดือนเพื่อใช้เป็น drug-free K562/Adr ก่อนการทดลองได้ทำการทดสอบการดื้อยา Adriamycin ของเซลล์ทั้งสองชนิดโดยวิธี MTT assay ผลการทดลองยืนยันว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr มีลักษณะการดื้อยา (drug resistant phenotype) สามารถนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

จากหลายการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ากลไกที่สำคัญของการดื้อยาแบบหลายขนานคือ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) drug transporters ได้แก่ พี-ไกลโคโปรตีน (P-gp) (82-83) โดยพี-ไกลโคโปรตีนเป็นโปรตีนที่พบว่ามีแสดงออกบนเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด (84) และระดับของพี-ไกลโคโปรตีนยังพบที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (36, 82-83) จากรายงานยังพบอีกว่า ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myelogenous leukemia (AML) ที่มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดต่ำ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของพี-ไกลโคโปรตีนกับการดื้อยา (85) นอกจากโปรตีนที่เกี่ยวกับการขนส่ง (transporter proteins) แล้ว การยับยั้งอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยา โดยพบว่าโปรตีนเซอร์ไววิน (survivin) เป็นหนึ่งในสมาชิกของโปรตีนในกลุ่มโปรตีนยับยั้งอะพอพโทซิส (Inhibitor of apoptosis proteins; IAPs) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง (86-87) โดยปกติพบว่าโปรตีนเซอร์ไววินจะไม่มีแสดงออกบนเนื้อเยื่อปกติ แต่จะพบการแสดงออกที่มากของเซอร์ไววินในมะเร็งหลายชนิด (57) นอกจากนี้ พบว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งที่มีการตรวจพบการแสดงออกของ survivin mRNA สูงร่วมด้วยจะสัมพันธ์กับการดื้อต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (12, 87)

จากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน และเซอร์โววินในเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง drug resistant K562/Adr เปรียบเทียบกับ drug-free K562/Adr โดย flow cytometry และ Western blot analysis โดยวิธี flow cytometry พบว่ามีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์โววินในเซลล์ drug resistant K562/Adr สูงกว่าในเซลล์ drug-free K562/Adr แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวจากเซลล์ทั้งสองชนิดนั้นไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงทำการยืนยันการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดโดยวิธี Western blot analysis ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์โววินมีการแสดงออกในเซลล์ drug resistant K562/Adr สูงกว่าเซลล์ drug-free K562/Adr นอกจากนี้ยังมีการตรวจการแสดงออกของโมเลกุลทั้งสองชนิดในระดับ mRNA โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ MDR1 mRNA ซึ่งกำหนดการสร้างพี-ไกลโคโปรตีน และ BIRC5 mRNA ที่กำหนดการสร้างเซอร์โววินเพิ่มขึ้นในเซลล์ drug resistant K562/Adr เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr การแสดงออกในระดับ mRNA และโปรตีนของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์โววินที่เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่มีการดื้อยา drug-resistant K562/Adr แสดงให้เห็นว่า โปรตีนทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาแบบหลายขนานของมะเร็งเม็ดเลือดขาว จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นถึง การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนของ MDR1 และ BIRC5 ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงที่มีการดื้อยาชนิด ADR-resistant MCF-7 (MCF-7/ADR) (64)

การศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนกับการดื้อยาจึงทำการทดสอบโดย Rhodamin123 (Rho123) accumulation assay การศึกษาที่ใช้สาร Rho123 เป็น substrate ของพี-ไกลโคโปรตีน ผลการทดลองพบว่าการสะสมของสาร Rho123 ในเซลล์ drug resistant K562/Adr ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug-free K562/Adr แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของพี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์ดื้อยา drug resistant K562/Adr มีผลทำให้การสะสมของ Rho123 ลดลงเนื่องจากความสามารถของพี-ไกลโคโปรตีนในการขนส่ง Rho123 ออกนอกเซลล์ซึ่งเป็นกลไกหลักที่สำคัญในการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความสัมพันธ์ของหน้าที่ของเซอร์โววินกับการดื้อยา ทำการทดสอบโดยศึกษา cell cycle assay เมื่อนำเซลล์ drug resistant K562/Adr และ drug-free K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับยา Adriamycin และศึกษาวัฏจักรของเซลล์โดยย้อมดูปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ propidium iodide ผลการทดลองพบว่า เซลล์ drug-free K562/Adr จะมีการเกิด G2/M phase accumulation มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ drug resistant K562/Adr แสดงให้เห็นว่า การเกิด G2/M arrest ของเซลล์ทั้งสองชนิดเกิดจากยา Adriamycin และยืนยันได้ว่าเซลล์ drug-free K562/Adr เป็นเซลล์ที่ไวต่อยาเคมีบำบัด Adriamycin นอกจากนี้การวิเคราะห์หาเซลล์อะพอโทซิสที่ระยะ sub-G₁ พบว่าเซลล์ drug-free K562/Adr มีจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอโทซิส (ระยะ subG₁) มากกว่าเซลล์ drug resistant K562/Adr ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ drug resistant K562/Adr ซึ่งมีการแสดงออกของเซอร์โววินที่เพิ่มขึ้นลดการเกิดอะพอโทซิสของเซลล์ โดยเซอร์โววินทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอะพอโทซิสจากการ

เหนี่ยวนาโดยยาเคมีบำบัด Adriamycin

โมเลกุล CD147 เป็นไกลโคโปรตีนชนิด type I transmembrane glycoprotein จัดอยู่ใน immunoglobulin superfamily ได้มีการรายงานเกี่ยวกับ CD147 ว่าเป็นโมเลกุลที่มีหลากหลายหน้าที่ และยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งโดยพบว่า CD147 เกี่ยวข้องกับการลุกลาม การเจริญเติบโต การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง (1, 88-89) โมเลกุล CD147 มีการแสดงออกทั้งเซลล์เม็ดเลือดและไม่ใช้เซลล์เม็ดเลือด (90) และจะพบการแสดงออกที่สูงขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว (91) นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้าได้แสดงให้เห็นว่า ระดับการแสดงออกของ CD147 เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่มีการดื้อยา (92) การศึกษาของ Li และคณะพบว่า CD147 เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของพี-ไกลโคโปรตีนต่อความไวต่อยาเคมีบำบัดจากการทดลองโดยการนำยีนที่กำหนดการสร้าง CD147 เข้าไปในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 ผลการทดลองพบว่าเพิ่มการแสดงออกของ MDR1 ทั้งระดับยีนและโปรตีนเป็นผลให้ส่งเสริมการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ในทางตรงกันข้าม เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ CD147 โดยนำ CD147 silencing ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงที่ดื้อยา MCF7/Adr พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมลดการลุกลามและเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด paliacxel (2) นอกจากนี้การยับยั้งการแสดงออกของ CD147 โดย RNA silencing ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง oral squamous carcinoma cells (SCC) พบว่าสามารถลดการแสดงออกของ X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) ซึ่งเป็นสมาชิกในกลุ่มโปรตีนยับยั้งอะพอพโทซิสเช่นเดียวกับเซอร์ไววิน และเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด 5-fluorouracil (9) โดย Xiang และคณะวิจัยพบว่าการทำ CD147 silencing ในเซลล์ HeLa สามารถลดการแสดงออกของเซอร์ไววิน และทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส (93) จากข้อมูลข้างต้นกล่าวถึงความสัมพันธ์ของโมเลกุล CD147 กับการดื้อยาของเซลล์มะเร็งโดยควบคุมพี-ไกลโคโปรตีนและโปรตีนยับยั้งอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ยกเว้นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นจึงเป็นวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ว่าโมเลกุล CD147 ควบคุมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา คือ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินในมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือไม่ โดยเริ่มต้นผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ CD147 ทั้งระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดคือ drug resistant K562/Adr และ drug-free K562/Adr ผลการทดลองพบว่า CD147 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา ดังนั้นการแสดงออกของ CD147 ร่วมกับพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยาชนิด drug resistant K562/Adr แสดงถึงความสัมพันธ์ของโมเลกุล CD147 กับ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน ต่อการควบคุมการดื้อยาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงดื้อยาชนิด drug resistant K562/Adr จากข้อมูลดังกล่าวจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาความเกี่ยวข้องเชื่อมโยงของทั้งสามโมเลกุล

มีเทคโนโลยีหลายอย่างที่ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของโปรตีน การใช้ไมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนเป้าหมายก็เป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้สำหรับศึกษาโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำไมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD147 ได้แก่ M6-1D4, M6-1E9, MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 มาใช้สำหรับการศึกษาการควบคุมพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน โดยไมโนโคลนอล

แอนติบอดีดังกล่าวได้ทำการศึกษาคูณสมบัติและบริเวณที่จับบนโมเลกุล CD147 แล้ว (5, 94) โดยพบว่า M6-1D4 และ M6-1E9 จับได้กับ intact CD147 และบริเวณ distal domain ของโมเลกุล CD147 จากรายงานก่อนหน้าพบว่า M6-1E9 ยับยั้งการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ ขณะที่ M6-1D4 เห็นยวนำให้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง U937 เกิดการเกาะกลุ่มแบบ homotypic cell aggregation (5) นอกจากนี้พบว่า MEM-M6/1 จับอย่างจำเพาะบริเวณ membrane-distal domain และ MEM-M6/6 จับบริเวณ membrane-proximal domain ของโมเลกุล CD147 และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ ลิมโฟไซต์ได้ 80% (94)

การศึกษาโมเลกุล CD147 ต่อการควบคุมการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์โวอินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงคือยา drug resistant K562/Adr ทำโดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1E9, M6-1D4, MEM-M6/6, และ MEM-M6/1 และศึกษาการแสดงออกโดยวิธี Western blotting และ semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองพบว่า M6-1E9 และ M6-1D4 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์โวอินและ CD147 ทั้งระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน โมโนโคลนอล แอนติบอดี MEM-M6/1 ลดการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์โวอินและ CD147 ระดับโปรตีนเท่านั้น ส่วน MEM-M6/6 ลดการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน เซอร์โวอินและ CD147 ทั้งระดับโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอ ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า การควบคุมการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์โวอิน โดย CD147 สัมพันธ์กับการดื้อยาในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด drug resistant K562/Adr จากข้อมูลของ MEM-M6/6 ที่จับกับส่วนของ membrane-proximal domain ของโมเลกุล CD147 (94) สามารถตั้งข้อสันนิษฐานได้ว่าส่วนของ membrane-proximal domain ของโมเลกุล CD147 เป็นบริเวณที่ควบคุมการดื้อยา โดยจากข้อมูลเกี่ยวกับ CD147 จะเห็นได้ว่า โมเลกุล CD147 มีความหลากหลายของการทำหน้าที่และแต่ละหน้าที่ขึ้นอยู่กับตำแหน่งบนโมเลกุล CD147 (5) และการกระตุ้นบริเวณ bioactive domains โดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะหรือ ligand จะเห็นยวนำการตอบสนองที่หลากหลาย (5) การจับของ MEM-M6/6 กับ epitope ของโมเลกุล CD147 น่าจะก่อให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยได้ทดสอบการยับยั้งการส่งสัญญาณดังกล่าวโดยใช้ U0126 ซึ่งเป็น ERK inhibitor เนื่องจากมีผู้รายงานว่า การควบคุมการดื้อยาของโมเลกุล CD147 ส่งสัญญาณผ่าน MAPK/ERK pathway (2, 95) จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การกระตุ้นโมเลกุล CD147 โดยใช้แอนติบอดี MEM-M6/6 ควบคุมการลดลงของ พี-ไกลโคโปรตีนโดยไม่ผ่านการส่งสัญญาณภายในเซลล์ทาง MAPK/ERK pathway

การศึกษาความสัมพันธ์ของโมเลกุล CD147 ต่อการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์โวอิน โดย Rho123 efflux และ cell cycle assay หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ผลการทดลองพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการสะสมของสาร Rho123 ภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงคือยาชนิด drug resistant K562/Adr ในปัจจุบันวิธีการที่นำมาใช้ในการแก้ไขปัญหาการดื้อยาของเซลล์มะเร็งจะเกี่ยวข้องกับการใช้สารปรับเปลี่ยนการดื้อยา เรียกว่า drug efflux modulator ได้แก่ verapamil (96) อีกทางที่สามารถทำได้คือการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา เช่น ยีน *MDR1* สำหรับการศึกษาการทำงานของเซอร์โวอิน พบว่าโมโน

โคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระยะต่างๆในวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงดื้อยาชนิด drug resistant K562/Adr นอกจากนี้การเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยาก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมแอนติบอดี M6-1E9, M6-1D4 หรือ MEM-M6/6 จากการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ชนิด M6-1E9, M6-1D4 และ MEM-M6/6 ไม่มีผลรบกวนการทำหน้าที่ของพี-ไกลโคโปรตีน และเซอร์ไววิน

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า การจับโมเลกุล CD147 อย่างจำเพาะโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MEM-M6/6 มีผลทำให้ลดการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววินและ CD147 แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน วิธีการในการแก้ปัญหาภาวะการดื้อยาแบบหลายขนานสามารถทำได้โดยการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาแบบหลายขนาน เช่น ยีนเอ็มดีอาร์วัน (*MDR1* gene) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปผลการทดลองว่าโมเลกุล CD147 เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน และเซอร์ไววิน แต่อย่างไรก็ตามผลของโมเลกุล CD147 ต่อพี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงควรจะมีการยืนยันต่อไปโดยการลดการแสดงออกของโมเลกุล CD147 โดยเทคนิค siRNA ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะช่วยให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ของโมเลกุล CD147 กับโปรตีนบ่งชี้ทั้งสองชนิดคือ พี-ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน ในการควบคุมการดื้อยาแบบหลายขนานในมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Misra S, Ghatak S, Zoltan-Jones A, Toole BP. Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem* 2003;278:25285-8.
2. Li QQ, Wang WJ, Xu JD, Cao XX, Chen Q, Yang JM, et al. Involvement of CD147 in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs and in vitro invasion in breast cancer cells. *Cancer Sci* 2007;98:1064-9.
3. Zou W, Yang H, Hou X, Zhang W, Chen B, Xin X. Inhibition of CD 147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells. *Cancer Lett* 2007;248:211-8.
4. Kasinrer W, Fiebiger E, Stefanová I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* 1992; 149:847-54.
5. Chiampanichayakul S, Peng-in P, Khunkaewla P, Stockinger H, Kasinrer W. CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation. *Immunobiology* 2006;211:167-78.
6. Chiampanichayakul S, Anuchapreeda S, Chruewkamlow N, Mahasongkram K, Thanaratanakorn P, Kasinrer W. Production of monoclonal antibodies to P-glycoprotein: its application in detection of soluble and surface P-glycoprotein of leukemia patients. *Int J Hematol* 2010;92:326-33.
7. Intasai N, Mai S, Kasinrer W, Tayapiwatana C. Binding of multivalent CD147 phage induces apoptosis of U937 cells. *Int Immunol* 2006;18:1159–69.
8. Yang JM, O'Neill P, Jin W, Foty R, Medina DJ, Xu Z, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD 147) confers resistance of breast cancer cells to anoikis through inhibition of Bim. *J Biol Chem* 2006;281:9719-27.
9. Kuang YH, Chen X, Su J, Wu LS, Liao LQ, Li D. et al. RNA interference targeting the CD147 induces apoptosis of multi-drug resistant cancer cells related to XIAP depletion. *Cancer Lett* 2009;276:189–95.
10. Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E: Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002;75:161-65.

11. Zhang M, Latham DE, Delaney MA, Chakravarti A. Survivin mediates resistance to anti androgen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:2474-82.
12. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002;99:4349-4354.
13. Zhang X, Xiao W, Wang L, Tian Z, Zhang J. Deactivation of signal transducer and activator of transcription 3 reverses chemotherapeutics resistance of leukemia cells via down-regulating P-gp. *PLoS One*. 2011;6:e20965.
14. Mace ML, Dahl J, Jabbour EJ. Which tyrosine-kinase inhibitor to use first in chronic phase chronic myelogenous leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16:999-1007.
15. Ciesla B. *Hematology in Practice*. 2nd ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2012.
16. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;385:427-62.
17. Kehe K, Balszuweit F, Steinritz D, Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology* 2008;263:12–9.
18. Malhotra V, Perry MC. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S2–4.
19. Makin G, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res* 2000;301:143–52.
20. Paul D. Multiple Drug Resistance. In: Meszaros A, Balogh G, editors. *Multiple Drug Resistance*. Lancaster, UK: Gazelle book service Ltd; 2009. p. 65-98.
21. Lehnert M. Clinical Multidrug resistance in cancer: A multifactorial problem. *Eur J Cancer* 1996;32:912-20.
22. Twentyman PR. Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem Pharmacol* 1992;43:109-117.
23. Kronbach T, Fischer V, Meyer UA. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43:630-5.

24. Bartlett NL, Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, Ehsan MN, Halsey J, et al. Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1994;12:835-42.
25. Colombo T, Zucchetti M, D'Incalci M. Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:22-7.
26. Erlichman C, Moore M, Thiessen JJ, Kerr IG, Walker S, Goodman P, et al. Phase I pharmacokinetic study of cyclosporin A combined with doxorubicin. *Cancer Res* 1993;53:4837-42.
27. Chai S, To KK, Lin G. Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chin Med* 2010;5:26-34.
28. Pennock GD, Dalton WS, Roeske WR, Appleton CP, Mosley K, Plezia P, et al. Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:105-10.
29. Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 1991;9:17-24.
30. Kerr DJ, Graham J, Cummings J, Morrison JG, Thompson GG, Brodie MJ, et al. The effect of verapamil on the pharmacokinetics of adriamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;18:239-42.
31. Mross K, Hamm D, Hossfeld K. Effects of verapamil on the pharmacokinetics and metabolism of epirubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;31:369-75.
32. Woodcock BG, Schulz WS, Kober G, Rietbrock N, et al. Direct determination of hepatic extraction of verapamil in cardiac patients. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30:52-6.
33. Saltz L, Murphy B, Kemeny N, Bertino J, Tong W, Keefe D, et al. A phase I trial of intrahepatic verapamil and doxorubicin. Regional therapy to overcome multidrug resistance. *Cancer* 1994;74:2757-64.
34. Milroy R. A randomised clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland Lung Cancer Research Group, and the Aberdeen Oncology Group. *Br J Cancer* 1993;68:813-8.
35. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-4.

36. Gottesman MM. Mechanism of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002;53:615-27.
37. Cox AG. Pharmacogenomics and drug transport/efflux. In: Zdanowicz M M. *Concepts in Pharmacogenomics*. American Society of Health-System Pharmacists;2010.p.129-154
38. Alisa A, Cho WC, Locatelli F, Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *Int J Mol Sci* 2013;14:24706-25.
39. Oldham ML, Davidson AL, Chen J. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18:726-733.
40. Davidson AL, Maloney PC. ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol*. 2007;15:448-55.
41. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* 1976;455:152-62.
42. Dean M, Hamon Y, Chimini G: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42:1007-17.
43. Barrand MA, Robertson KJ, von Weikersthal SF. Comparisons of P-glycoprotein expression in isolated rat brain microvessels and in primary cultures of endothelial cells derived from microvasculature of rat brain, epididymal fat pad and from aorta. *FEBS Lett* 1995;374:189-73.
44. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995;96:1698-705.
45. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7735-8.
46. Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, et al. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol* 1989;9:1346-50.
47. Rabow AA, Shoemaker RH, Sausville EA, et al. Mining the National Cancer Institute's tumor screening database: identification of compounds with similar cellular activities. *J Med Chem* 2002;45:818-40.

48. Martin F, Fromm ME. The pharmacogenomics of human P-glycoprotein. In: Licinio J, Wong ML, eds. *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies*. Weinheim, Germany: Wiley VCH;2003:159-178.
49. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003;22:7468-85.
50. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, et al. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 2007;7:154-79.
51. Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* 1996;27:1283-91.
52. Tolis C, Ferreira CG, Pinedo HM, Giaccone G. Molecular pathways of drug resistance. In: Bronchud M, Foote M, Peters W, Robinson M, editors. *Principles of Molecular Oncology*: Humana Press 2000 pp. 323-356.
53. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:1997-2004.
54. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991;78:586-92.
55. Norgaard JM, Bukh A, Langkjer ST, Clausen N, Palshof T, Hokland P. MDR1 gene expression and drug resistance of AML cells. *Br J Haematol* 100;534-40.
56. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46-54.
57. Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 2003;9:43-7.
58. Endoh A, Asanuma K, Moriai R, Yamada M, Koyanagi Y, Sato T et al. Expression of survivin mRNA in CD34 positive cells. *Clin Chim Acta* 2001;306:149-51.
59. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6:529-34.

60. Song Z, Yao X, Wu M. Direct Interaction between Survivin and Smac/DIABLO Is Essential for the Anti-apoptotic Activity of Survivin during Taxol-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:23130-40.
61. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, Caspases and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-20.
62. Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1406-12.
63. Rödel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rödel F. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: Survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:1341-7.
64. Liu F, Liu S, He S, Xie Z, Zu X, Jiang Y. Survivin transcription is associated with P-glycoprotein/MDR1 overexpression in the multidrug resistance of MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep* 2010;23:1469-75.
65. Souza PS, Vasconcelos FC, De Souza Reis FR, Nestal De Moraes G, Maia RC. P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2011;39:925-33.
66. Miyauchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J Biochem* 1991;110:770-4.
67. Kirsch AH, Diaz LA Jr, Bonish B, Antony PA, Fox DA. The pattern of expression of CD/147 neurothelin during human T-cell ontogeny as defined by the monoclonal antibody 8D6. *Tissue Antigens* 1997;50:147-52.
68. Weldle UH, Scheuer W, Eggle D, Klostermann S, Stockinger H. Cancer-related Issues of CD147. *Cancer Genomics Proteomics* 2010;7:157-69.
69. Toole BP. Emprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr Top Dev Biol* 2003;54:371-89.

70. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 2000;19:3896-904.
71. Jiang JL, Zhou Q, Yu MK, Ho LS, Chen ZN, Chan HC. The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:46870-7.
72. Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B, et al. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:786-8.
73. Stockinger H, Ebel T, Hansmann C, Koch C, Majdic O, Prager E, et al. CD147 (neurothelin/basigin) workshop panel report. In Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors, *Leucocyte Typing VI*. Garland Publishing, New York; 1997. p. 760.
74. Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C. Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* 1989;49:3385-91.
75. Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C, Kono M. Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer* 1993;55:19-26.
76. Polette M, Gilles C, Marchand V, Lorenzato M, Toole B, Tournier JM, et al. Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *J Histochem Cytochem* 1997;45:703-9.
77. Bordador LC, Li X, Toole B, Chen B, Regezi J, Zardi L, et al. Expression of EMMPRIN by oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000;85:347-52.
78. Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, et al. Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int J Cancer* 2000;88:21-7.
79. Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J, et al. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol* 2001;158:1921-8.
80. Liu F, Xie ZH, Cai GP, Jiang YY. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells. *Biol Pharm Bull* 2007;30:2279-83.

81. La Porta CA. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 387–91.
82. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
83. Shabbits JA, Mayer LD. P-glycoprotein modulates ceramide mediated sensitivity of human breast cancer cells to tubulin binding anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 205-13.
84. Goldstien LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 116-24.
85. Broxterman HJ, Sonneveld P, van Putten WJ, Lankelma J, Eekman CA, Ossenkoppele GJ, et al. P-glycoprotein in primary acute myeloid leukemia and treatment outcome of idarubicin/cytosine arabinoside-based induction therapy. *Leukemia* 2000; 14: 1018–24.
86. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-59.
87. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Gene Dev* 1999; 13: 239-52.
88. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* 2007;83:283-95.
89. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 2002;99:520-8.
90. Simon-Chazottes D, Matsubara S, Miyauchi T, Muramatsu T, Guenet JL. Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: Midkine (Mdk) and basigin (Bsg). *Mamm Genome* 1992; 2: 269–71.
91. Qin Z, Dai L, Bratoeva M, Slomiany MG, Toole BP, Parsons C. Cooperative roles for emmprin and LYVE-1 in the regulation of chemoresistance for primary effusion lymphoma. *Leukemia* 2011; 25: 1598–609.

92. Yang JM, Xu Z, Wu H, Zhu H, Wu X, Hait WN. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 420–7.
93. Xiang X, Zhao D, Pi-jun G. Si-CD147 down-regulated the expression of survivin in HeLa. *Medical Journal of West China*. 2012-05
94. Koch C, Staffler G, Hüttinger R, Hilgert I, Prager E, Cerný J, et al. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int Immunol* 1999; 11:777-86.
95. Jia L, Xu H, Zhao Y, Jiang L, Yu J, Zhang J. Expression of CD147 mediates tumor cells invasion and multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Invest*. 2008;26:977-83.
96. Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith MM, Ambudkar SV, Limtrakul PN. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64:573-82.

ภาคผนวก

第73回日本癌学会学術総会
The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

PROGRAM

がんを知り、

JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION

Deeper insights into cancer biology
bringing cures for cancer patients

がんを制する

September 25 (Thu.) - 27 (Sat.), 2014
PACIFICO YOKOHAMA
Yokohama

President **Tetsuo Noda**
The Cancer Institute,
Japanese Foundation for Cancer Research
会長 **野田 哲生**
公益財団法人がん研究会 がん研究所 所長

<http://www2.convention.co.jp/jca2014>