จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับ โดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ทรงจันทร์ ภู่ทอง

มีนาคม ๒๕๔๗

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับ โดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

โดย

ทรงจันทร์ ภู่ทอง

มีนาคม พ.ศ.2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 7 ก.ย. 2548

I21667408

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้โดยได้รับทุนวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ธนภัทร ปาลกะ และ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิสที่ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สถานที่ทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจสำหรับการทำงานวิจัยมาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ ศท สค 15
เลขทะเบียน 012137
วัน, เดือน, ปี 10 ธ.ค. 2548

ชื่อโครงการวิจัย	ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับ โดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay
ชื่อผู้วิจัย	นางทรงจันทร์ ภู่ทอง
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	มีนาคม พ.ศ.2547

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับ S102 ในการทำลายและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจเซลล์ที่มีชีวิต โดยดูผลการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ succinate dehydrogenase จากไมโตคอนเดรีย จากการทดลองพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5 โคลน ได้แก่ หมายเลข 20, 27, 44, 88 และ 94 มีฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญของเซลล์ Hep-G2, R12 และ S102 แอนติบอดีที่มีฤทธิ์ทำลายและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ดีที่สุดคือ แอนติบอดีหมายเลข 88 โดยที่ความเข้มข้น 100 μg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 ได้ประมาณ 26% และยับยั้งการเจริญของเซลล์ R12 และ S102 ได้ 97 และ 72% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ CH-Liver ซึ่งเป็นเซลล์ที่เลี้ยงจากเซลล์ตับปกติ ดังนั้น จะเห็นได้ว่าแอนติบอดีต่อมะเร็งตับมีฤทธิ์ที่จะฆ่าหรือยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ แต่ความเข้มข้นที่ใช้ค่อนข้างสูง (100 – 500 μg/ml) นอกจากนี้ยังมีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆได้ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title	MTT Colorimetric Assay of Hepatocellular Carcinoma Cell Death by Monoclonal Antibodies
Name of the Investigators	Mrs. Songchan Puthong
Year	March 2004

Abstract

This research studied the effect of monoclonal antibody raised against liver cancer cell in order to kill and inhibit the growth of liver cancer and other cancer cells. The inhibition was quantified by conventional MTT Colorimetric Assay which detects succinate dehydrogenase activity in mitochondria of living cell. The assay showed that five monoclonal antibodies (no.20, 27, 44, 88 and 94) partially killed or inhibited cell growth of Hep-G2, R12 and S102. Among the antibodies obtained , no.88 was the best liver cancer cell growth inhibitor. At concentration of 100 μg/ml, it killed 26% of Hep-G2 cell and inhibited cell growth of R12 and S102 at 97% and 72%, respectively, but did not have any effect on normal CH-Liver cell. The results indicated that the antibodies raised against liver cancer inhibited not only liver cancer cell but also other cells. However high concentrations of antibodies (100 – 500 μg/ml) were required for inhibition.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vii
รายการภาพประกอบ	viii
รายการสัญลักษณ์และตัวย่อ	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 อุปกรณ์การทดลอง	4
2.2 สารเคมี	5
2.3 เซลล์พันธุ์	6
2.4 เซลล์ไฮบริโดมา	6
2.5 วิธีการทดลอง	
2.5.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา	6
2.5.2 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว	7
2.5.3 การเลี้ยงเซลล์พันธุ์	7
2.5.4 การทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยวิธี ELISA	7
2.5.5 การสกัดแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity Chromatography	8
2.5.6 การทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT Colorimetric Assay	8
2.5.7 ศึกษาการเจริญของเซลล์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบแอนติบอดี	8
2.5.8 การหาปริมาณความเข้มข้นของ Ab ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ S102 และเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ	9
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
3.1 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา	10
3.2 ทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ โดยวิธี ELISA	10
3.3 คัดเลือกแอนติบอดีที่มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ	10
3.4 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มปริมาตรแอนติบอดี	13
3.5 การสกัดแยกแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Affinity Chromatography	13
3.6 ศึกษาการเจริญของเซลล์ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบแอนติบอดี	13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	หน้า
3.7 ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102	20
3.8 ฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายและยับยั้งการเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ	21
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	25
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	31

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเซลล์พันธุ์ชนิดอื่นๆเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งตับ S102 โดยวิธี ELISA 11

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ S102 แสดงค่าการเจริญของเซลล์ (PG) เมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลา 1 ,3 ,6 และ 9 วัน โดยวิธี MTT Colorimetric Assay 12

ตารางที่ 3 ผลการสกัดแยกแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Affinity Chromatography 19

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของ Ab ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ S102 20

ตารางที่ 5 การเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้ 3 วัน 22

ตารางที่ 6 แสดงค่าการยับยั้งและฆ่าเซลล์พันธุ์ 8 ชนิด เมื่อเลี้ยงด้วยแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,88 ,94 และ α-IFN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงค่า optical density จากการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็ง S102 โดยวิธี ELISA 14

รูปที่ 2 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 20 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography และทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA 14

รูปที่ 3 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 94 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography 15

รูปที่ 4 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 44 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography 15

รูปที่ 5 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 77 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography 16

รูปที่ 6 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 88 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography 16

รูปที่ 7 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 27 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography 17

รูปที่ 8 แสดงค่า optical density ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography 17

รูปที่ 9 แสดงค่า optical density เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆกับเซลล์มะเร็ง S102 ทดสอบโดยวิธี ELISA 18

รูปที่ 10 แสดงค่า optical density เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ที่เลี้ยงไว้ 1 ,4 ,7 ,9 และ 11 วัน ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay 18

รูปที่ 11 แสดง % cell growth ของเซลล์ S102 เมื่อเติมแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,94 และ 88 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay 21

รูปที่ 12 แสดง % cell growth ของเซลล์ S102 เมื่อเติม IFN ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay 21

รูปที่ 13 แสดงผลการมีชีวิตรอดของเซลล์พันธุ์ 12 ชนิด เมื่อเลี้ยงโดยเติมแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,94 และ 88 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay 23

รายการสัญลักษณ์และตัวย่อ

α	=	แอลฟา
μg	=	ไมโครกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
IU	=	ยูนิต
mg	=	มิลลิกรัม
OD	=	ค่าการดูดกลืนแสง
γ	=	แกมมา
Kda	=	กิโลดาลตัน
IgG	=	อิมมิวโนกลอบบูลิน จี
%	=	เปอร์เซนต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของขวัญคณะ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

มะเร็งตับเป็นโรคที่พบมากที่สุดในผู้ชายไทย และยังคงมีอัตราการตายสูง ส่วนสาเหตุการเกิดมะเร็งตับนั้น เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง มีโอกาสเป็นมะเร็งได้สูง นอกจากนี้อาจเพราะได้รับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เช่น อัลฟลาท็อกซิน และสารกันบูด (nitrosamine) หรือได้รับสารกัมมันตภาพรังสี หรืออาจเกิดขึ้นเองโดยไม่ทราบสาเหตุ จากความก้าวหน้าทางภูมิคุ้มกันวิทยาและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดโรคมะเร็ง ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ oncogene และ anti-oncogene ที่ใช้ในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวโดย ไม่สามารถควบคุมได้ (1)

การรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการผ่าตัด ฉายรังสี และเคมีบำบัด ได้รับการพัฒนาขึ้นมาก แต่ก็ยังไม่สามารถรักษาโรคมะเร็งตับให้หายขาดได้ เกิดปัญหาการกลับเป็นใหม่ของโรค (recurrent) หลังการรักษา และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น (metastasis) โดยผ่านระบบเลือดและน้ำเหลืองได้ จากการศึกษากลไกของร่างกายในการกำจัดเซลล์มะเร็ง พบว่า ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันมะเร็ง โดยการใช้ระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) เช่น cytotoxic T lymphocyte (CTL) ,marcophage และ natural killer cell (NK cell) ซึ่งเซลล์เหล่านี้สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรง เช่น CTL สามารถหลั่งสารโปรตีนอาจเป็น tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งสามารถกระตุ้นเอ็นไซม์ของ target cell ที่มีฤทธิ์ทำให้ DNA ในนิวเคลียสแตกแล้วนำไปสู่การแตกของนิวเคลียส (apoptosis) สำหรับระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immunity) ได้แก่ interleukin, interferon และ แอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ โดย กลไกหลัก 2 วิธี คือ complement dependent cytotoxicity โดยการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ และโดยกลไก antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) สารน้ำเหล่านี้มีฤทธิ์ ทำให้เซลล์มะเร็งชะลอ หรือหยุดการแบ่งตัว หรืออาจช่วยทำให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายโดยกลไกของระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ได้ง่ายขึ้น (2)

ระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา กิ่งกาญจน์ เลาหทัย (3) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอล-แอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับ ซึ่งเตรียมจากมะเร็งตับคนไทย พร้อมทั้งศึกษาการทำลายเซลล์มะเร็งตับระดับเซลล์ ด้วยสาร anti-human hepatocellular carcinoma monoclonal antibody โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า โมโนโคลนอล 2 โคลน คือ anti-hep-27 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม anti-hepatoma ที่เลือกทำปฏิกิริยากับ oncodevelopment antigen (ODA) นอกจากจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของมะเร็งตับคนแล้ว ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบน fetal และ normal liver cell ทดสอบโดยวิธี ELISA และ anti-hep-43 จัดเป็น anti-hepatoma ชนิด Tumor associated antigen (TAA) เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตับปกติ แต่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากการทดสอบ anti-hep-27 และ 43 ซึ่งเป็นอิมมิวโนกลอบบูลินชนิด 2a ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ S102 (คนไทย) และ Hep-G_2(ATCC) พบว่า โมโนโคลนอล ทั้ง 2 ตัวนี้ มีประสิทธิภาพทำลายเซลล์มะเร็งตับได้ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องอาศัยระบบ ADCC และเมื่อติดตามด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า organelle ภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไป คือ จำนวนของ rough endophasmic reticulum (RER) มีจำนวนลดน้อยลง การจัดเรียงตัวของ ribosome ไม่เป็นระเบียบ และ RER membrane คอดเป็นช่องๆ microville หดสั้นลง และเกิด vacuole ขนาดใหญ่ (3) วิธีการดูประสิทธิภาพของโมโนโคลนอล ด้วยวิธีการติดตามด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง จึงเป็นปัญหาที่ต้องแก้ไข

เนื่องจากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาฯ มีเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอล อนติบอดีอยู่แล้ว จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปศึกษาด้าน cytotoxicity เพื่อดูผลการทำลายเซลล์มะเร็ง โดยวิธี MTT olorimetric assay เป็นการตรวจวัดเฉพาะเซลล์มีชีวิต ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ถูกต้อง ประหยัด และรวดเร็ว นอกจากนี้ งมีไฮบริโดมาอีกจำนวนหนึ่งที่ยังมิได้นำมาทดสอบ cyotoxicity ผลของงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน นำไปใช้ กษา immunotherapy และมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อมะเร็งตับที่ผลิตได้ในประเทศ เพื่อนำไปใช้ทั้งในด้านการ นิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งตับ

การทดสอบการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) มีวิธีการตรวจนับเซลล์มีชีวิตได้หลายวิธี เช่น การนับเซลล์ด้วย aemocytometer chamber, electronic particle counters, colony counting, radionuclide incorporation ssays และ colorimetric assay (4) colorimetric MTT assay ค้นพบโดย Mormonn ในปี ค.ศ. 1983 (5) เป็นวิธี ารตรวจสอบการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ โดยดูผลการใช้เอนไซม์ succinate-dehydrogenase ใน ytochrome b และ c จาก ไมโตคอนเดรียย่อยสลายสาร tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, diphenyl tetrazolium bromide] ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ ทำให้เกิดสาร formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีฟ้า (6) ารนี้ละลายใน organic solvent ตรวจวัดสีด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบอัตโนมัติ ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวก ถูก อง รวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อย และหลีกเลี่ยงการใช้สารรังสี

ในการศึกษาวิธีการทดสอบ cytotoxicity โดยใช้ MTT colorimetric assay ได้มี ผู้ศึกษาผลกระทบและปัจจัยต่อ ารตรวจวัด คือ ค.ศ. 1987 Twentyman และ Luscombe ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวัดปริมาณสาร ormazan พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ใช้เวลาในการบ่ม 4 ชั่วโมง สารละลาย ITT สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 6 สัปดาห์ และ DMSO เป็นตัวทำละลายสาร formazan ที่ดีที่สุด การใช้ opropanol เป็นตัว ทำละลาย จะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อาจหลงเหลืออยู่ ทำให้ ได background สูง (4) ค.ศ. 1989 Plumb และคณะ พบว่า นอกจากความเข้มข้นของ MTT จะมีผลต่อการเกิด ormazan แล้ว pH ยังมีผลต่อการดูดกลืนแสง ดังนั้นการเติม glycine buffer pH 10.5 ในการละลายสาร formazan วยลดผลกระทบจากความเข้มข้นของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลืออยู่ (7)

ปกติในร่างกายจะมีระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเซลล์มะเร็ง ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ เซลล์ macrophage ที่ได้รับ ารกระตุ้นจะสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ จากการศึกษาของ Ferrari และคณะ (1990) พบว่า macrophage จาก นูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย pyran copolymer MVE_2 มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์จากไตหนู (TU_5) ซึ่ง transformed ดย SV-40 และจากการเปรียบเทียบผลการทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay กับ radioisotopic assay ให้ ลการทดสอบใกล้เคียงกัน แต่วิธี MTT Colorimitric Assay เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด และรวดเร็วกว่า (8) นอกจาก เซลล์ lymphocyte ที่ได้รับการกระตุ้นให้เป็น LAK cell (Lymphokine-activated killer cell) ยังมีคุณสมบัติการฆ่า ซลล์มะเร็งได้ ในปี ค.ศ. 1990 Heo และคณะศึกษาการฆ่าเซลล์ squamous cell carcinoma (จากหัวและคอ) โดย AK cell ด้วยวิธี MTT colorimetric assay พบว่า อัตราส่วนระหว่าง LAK cell กับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 10 : 1 ามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ 70 - 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีนี้มีความไวกว่าการทดสอบด้วยวิธี ^{51}Cr release assay วัดค่าได้ 0 - 60 เปอร์เซ็นต์ (9) ในปี ค.ศ. 1994 Loosdrecht และคณะ ศึกษาการฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด .eukemia) ชนิดที่แยกได้จากผู้ป่วย และเซลล์พันธุ์ (leukemia cell line) ด้วยเซลล์ monocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย -interferon (γ-IFN) ทดสอบโดยวิธี MTT colorimetric assay พบว่ามีผลฆ่าเซลล์ U937, THP1, HL60 และ AML (M_2+M_4+M_{5B}) เท่ากับ 54, 44.5, 9.5 และ 36% ตามลำดับ (10)

1998 KUWATA และคณะ ทำการศึกษาการทำลายเซลล์มะเร็งตับ (hu-H_2), มะเร็งตับอ่อน (MIA) และมะเร็งลำไส้ (CW_3) ด้วยระบบ ADCC โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งรวมกับ peripheral blood mononuclear cell และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยการกระตุ้นหนูด้วย hu-H_2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 523 ทำปฏิกิริยากับ hu-H_2 และ tumor cell lines ตัวอื่น ส่วน โมโนโคลนอลแอนติบอดี 512 ทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ แอนติบอดีเหล่านี้จะจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ จากการทดสอบ cytotoxicity โดยวิธี ^{51}Cr-releasing assay พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 523 มีผลเพิ่มการทำลายเซลล์มะเร็งตับ จากการที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี 512 ไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์ เนื่องจากทำปฏิกิริยากับ epitope ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับขบวนการ ADCC ซึ่งข้อมูลเหล่านี้แสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งได้ ด้วยวิธี immunotherapy (11)

1999 KOST และคณะ ศึกษาการทำลายเซลล์มะเร็งมดลูก ด้วยกลไกภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ โดยใช้ IFN-γ กระตุ้น Tumor necrosis factor (TNF) receptor การตรวจสอบ TNF-α binding ใช้วิธี ^{125}I-labeled TNF-α monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อสารโมเลกุล 55-60 kDa (TR_{60}) และ 75-80 kDa (TR_{80}) พบว่า การเพิ่ม TNF receptor ได้ในเซลล์ A2780 และ Ca OV_3 แต่ไม่เพิ่มใน SK-OV-3 นอกจากนี้พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ Ca OV-3 และ OK-OV-3 ด้วย IFN-γ เป็นการเพิ่ม TNF-α mediated cytolysis การกระตุ้นเซลล์ด้วย IFN-γ มีผลต่อ TR_{60} receptor ในการเกิดการทำลายเซลล์ แต่การกระตุ้นที่ TR_{80} receptor ไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์ การปรากฏของ TNF receptor เมื่อกระตุ้นด้วย IFN-γ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละเซลล์พันธุ์ (12)

จากการทดลองช่วงแรกทำไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อมะเร็งตับคนไทย S102 จำนวน 64 โคลน เซลล์ 1 ใน 3 ยังคงสร้างแอนติบอดี (21 โคลน) เมื่อนำแอนติบอดีจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม, มะเร็งปอด, มะเร็งกระเพาะ, มะเร็งลำไส้, มะเร็งจากเนื้อเยื่อชนิด Sarcoma และมะเร็งชนิด Melanoma, เซลล์ตับปกติ และเซลล์ fibroblast เปรียบเทียบกับเซลล์ S102 โดยวิธี ELISA ได้ทำการคัดเลือกแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ปกติทิ้ง นำแอนติบอดีที่เหลือไปคัดเลือกโคลนที่มีแนวโน้มมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้มากกว่า 40% ทำการคัดเลือกแอนติบอดี 5 ตัว ได้แก่ หมายเลข 44, 88, 20, 94 และ 77 จากนั้นเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวนเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปสกัดแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ผ่านคอลัมน์ protein A sepharose ได้แอนติบอดีเข้มข้นสูง 0.37-2.59 mg/ml ความบริสุทธิ์ประมาณ 65% ทดสอบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็ง S102 โดยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เปรียบเทียบกับแอนติบอดีก่อนและหลังการสกัดให้บริสุทธิ์พบว่า หมายเลข 20, 94, 44 และ 24 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm หลังการสกัดแยกสูงกว่าแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วน หมายเลข 77, 88 ให้ค่าใกล้เคียงกัน

วัตถุประสงค์

คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับด้วยการทดสอบ cytotoxicity โดยวิธี MTT Colorimetic Assay

ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกและประเมินประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีอยู่

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1. อุปกรณ์การทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ (inverted microscope)
2. ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 (CO_2 incubator)
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Larmina flow)
4. เครื่องอ่าน ถาด ELISA (Mictoplate reader)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
6. ออโตปิเปตพร้อมทิป (autopipette and tip)
7. ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง
8. ตู้อบ (hot air oven)
9. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
10. ปิเปต 10 มล.
11. ปาสเจอร์ปิเปต
12. เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วต่ำ (centrifuge)
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH meter)
14. เครื่องชั่ง
15. เครื่องแก้ว
16. เครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์
17. ขวดเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask)
18. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well)
19. หลอดเก็บแช่แข็งเซลล์ (cryotube)
20. ถุงไดอะไลซิส (dialysis tube)
21. ตะเกียงแอลกอฮอลล์
22. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 10 ml
23. เข็มฉีดยา
24. เครื่องเขย่าถาดเลี้ยงเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640
2. ซีรั่มลูกวัว (fetal calf serum)
3. Dimethly sulfoxide LD-5879
4. L-glutamine
5. Pyruvic acid
6. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
7. glucose
8. Sodium chloride
9. di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
10. Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
11. Sulfuric acid (H_2SO_4)
12. O-Phenyllenediamine dihydrochloride (OPD)
13. Bovine Serum Albumine (BSA)
14. 30 % Hydrogen peroxide
15. formaldehyde
16. Sodium hydroxide (NaOH)
17. Hydrochloric acid (HCl)
18. Thimerosal
19. citric acid
20. Trypsin
21. Phenol red
22. Potassium chloride (KCl)
23. [3-c4,5-dimethylthiazal-2-yl)-2,5 dipheny tetrazolium bromide](MTT)
24. dimethylsulfoxide (DMSO)
25. glycine
26. anti mouse IgG perosidase
27. Protein A sepharose CL 4 B
28. Tris(hydroxymethyl)aminomethane

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 เซลล์พันธุ์ (cell line) ที่ใช้ในการทดลอง

	Name Organ	Type of Carcinoma	Source	ATCC No.
1. S102	Liver	Hepatoma	คนไทย	
2. R 12	Liver	Hepatoma	คนไทย	
3. Hep-G2	Liver	Hepatoblastoma	Human	HB 8065
4. BT 474	Breast	Ductal carcinoma	Human	HT B20
5. Chago	Lung	Undifferentialed	Human	
6. CH-Liver(chang Liver)	Liver	Human,hela Marker	Human	CCL13 (11)
7. Hs 27	Foreskin	Fibroblast	Human	CRL1634
8. Hs 766T	Pancreatic	Carcinoma,metastatic	Human	HTB 134
9. Kato -III	Gastric	Carcinoma	Human	HTB 103
10. SW 620	Lymph node metastasis	Colon adenocarcinoma	Human	CCL 227(125)
11. U-20S	Osteogenic sarcoma	Bone primary	Human	HTB 96(225)
12. A 375	Malignant	Melanoma	Human	CRL 1619

2.4 เซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมาได้จากการทำ fusion ระหว่างเซลล์ myeloma (NS-I) กับเซลล์ม้ามของหนูที่มี memory cell ซึ่งกระตุ้นด้วยเซลล์มะเร็งตับคนไทย (S102) เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จะนำไปคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ชนิดที่ผลิตอิมมิวโนโกลบิวลินชนิด IgG โดยวิธี ELISA ซึ่งทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ S102 และไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดง อัลบิวมินของคนและ HbsAg

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต Mab ต่อเซลล์มะเร็งตับ S102 ซึ่งแช่แข็งอยู่ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยง โดยแช่หลอดเซลล์ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ละลายจนเป็นน้ำแข็งก้อนเล็กๆ ดูดเซลล์ใส่หลอด ล้างเซลล์ด้วย RPMI1640 ปริ มาตร 10 ml ปั่นด้วยความเร็ว 1000rpm นาน 2 นาที ดูด supernate ทิ้ง นำเซลล์เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตรเติม 20% FCS RPMI1640 สำหรับเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ปริมาตร 10 ml เซลล์เริ่มต้นที่ 1 x 10^5 cell/ml เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 นาน 3 วัน การเปลี่ยนขวดเลี้ยงเซลล์ (subculture หรือ passage) หรือการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำโดยวิธีปั่นแยก นำอาหารเลี้ยงเซลล์ทดสอบแอนติบอดีโดยวิธี ELISA นำเซลล์แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเลี้ยงเพื่อเก็บเป็นเซลล์แม่พันธุ์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว อีกส่วนหนึ่งเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปสกัดแยก Ab จากอาหารเลี้ยงเซลล์

2.5.2 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว

เลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร เซลล์เริ่มต้น 1 x 10^5 cell/ml ปริมาตร 10ml เลี้ยงเซลล์ 2-3 วัน อาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการเก็บเซลล์แช่แข็ง 1 วัน โดยนำ cell suspension ไปปั่นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ เติม 5%FCS RPMI 1640 ปริมาตร 10ml ลงในเซลล์เลี้ยงในขวดไว้ 1 วัน จากนั้นปั่นแยกเซลล์ เติมอาหารสำหรับเก็บแช่แข็งเซลล์ปริมาตร 1.5 ml ที่เย็น ดูดใส่ใน cryotube ขนาด 2 ml เก็บในกล่องโฟมแช่ไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส 1 วัน จึงนำไปเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว

2.5.3 การเลี้ยงเซลล์พันธุ์ (cell line)

การนำเซลล์มะเร็งที่เป็นเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ ออกมาเลี้ยงจากไนโตรเจนเหลว ทำเช่นเดียวกับการนำเซลล์ไฮบริโดมาออกมาเลี้ยง อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์พันธุ์ใช้ 20% RPMI1640 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน เมื่อเซลล์เจริญหนาแน่นในขวด ทำการ subculture หรือ passage ด้วยวิธี trypsinization โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดออก เติม 0.25% Trypsin + 0.1 %EDTA/PBS ปริมาตร 2 ml แล้วดูดทิ้ง เติม trypsin ลงไปใหม่อีก 2 ml สังเกตเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ เมื่อเซลล์เริ่มหดตัว ดูด trypsin ทิ้ง ใช้เวลาประมาณ 1-2 นาที (เซลล์แต่ละชนิดอาจใช้เวลาในการใส่ trypsin ต่างกัน) จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม ลงในขวดปริมาตร 10 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ และระเซลล์ให้หลุดออกจากขวด นำไปปั่นแยกเซลล์ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติม 5% FCS + RPMI 1640 ใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นลงเบาๆ ดูดเซลล์ใส่ขวดใหม่ เพิ่มจำนวนขวดหรือนำไปใช้ทดสอบ หรือนำกลับไปเก็บแช่แข็งเป็น stock cell ในไนโตรเจนเหลว ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่จะใช้เซลล์ต่อไป วิธีการเก็บแช่แข็งเซลล์พันธุ์มีวิธีการเช่นเดียวกับการเก็บแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา

2.5.4 การทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยวิธี ELISA

การเตรียมเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบ โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งลงใน tissue culture plate 96 หลุม ความเข้มข้น 1 x 10^4 เซลล์ / หลุม ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 300 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 2-3 วัน จนเซลล์โตเต็มหลุมเก็บแช่เซลล์ใน 2% formalin นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS เติม 0.5% BSA / PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างออก เติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม 2^O Ab (anti mouse IgG- peroxidase) เจือจาง 1: 2000 ใน 0.5% BSA /PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม substrate OPD ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ในที่มืดนาน 10 นาที เติม 2.5 N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

2.5.5 การสกัดแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity Chromatography

การสกัดแยกแอนติบอดีออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ผ่านคอลัมน์ Protein A sepharose ปริมาตร 15 ml (กระบอกฉีดยาขนาด 20 ml) ปรับคอลัมน์โดยผ่าน 0.1 M PBS pH 8.0 ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำมาแยกแอนติบอดีด้วย 1.0 M tris-HCl buffer pH 9.0 ให้ได้ pH 8.0 นำอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านลงในคอลัมน์ จากนั้นชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วย 0.1 M PBS pH 8.0 แล้วชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ด้วย 0.1 M citrate buffer pH 4.5 และ 3.5 ตามลำดับ ปรับคอลัมน์ด้วย 0.1 M PBS pH 8.0 เก็บโปรตีนเป็นส่วนๆ และปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 1.0 M Tris- HCL buffer pH 8.5 นำแต่ละส่วนไปวัดโปรตีนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและตรวจวัดแอนติบอดีโดยวิธี ELISA เก็บโปรตีนส่วนที่ชะด้วย pH 4.5 ซึ่งเป็นส่วนของแอนติบอดี ปรับให้อยู่ใน NSS โดยวิธี ไดอะไลซีส

2.5.6 การทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT Colorimetric Assay

เตรียมเซลล์ที่ต้องการทดสอบลงใน tissue culture plate 96 หลุม หลุมละ 5 x 10^3 cell เลี้ยงเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง เติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบจากอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือแอนติบอดีที่สกัดบริสุทธิ์ แปรความเข้มข้นของแอนติบอดี แปรเวลาที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นเติม MTT เข้มข้น 5 mg / ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ 4 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติม DMSO ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร เขย่า plate นาน 5 นาที เติม 0.1 M glycine pH 10.5 ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่า plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การคำนวณ % cell growth (PG)

ถ้า OD test - OD tzero มากกว่าหรือเท่ากับศูนย์, $PG = \frac{(OD\ test - OD\ tzero) \times 100}{(OD\ control - OD\ tzero)}$

ถ้า OD test - OD tzero น้อยกว่าศูนย์, $PG = \frac{(OD\ test - OD\ tzero) \times 100}{OD\ tzero}$

การคำนวณ % cell survival (PS) $= \frac{OD\ test \times 100}{OD\ control}$

OD test = ค่า OD หลุมที่ใส่สารทดลอง

OD tzero = ค่า OD หลังเลี้ยงเซลล์ไว้ 1 วัน (ก่อนใส่สาร)

OD control = ค่า OD หลังเลี้ยงเซลล์ไว้ 4 วัน

2.5.7 ศึกษาการเจริญของเซลล์ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบแอนติบอดี

ทำการเลี้ยงเซลล์ A375, BT474, Chago, Hs766T, Sw620, KATO-III, U-20S, CH-Liver, S102, R12, Hs27 และ Hep-G2 ลงใน TC plate 96 หลุม จำนวนเซลล์ 5 x 10^3 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 200 µl เลี้ยงเซลล์ไว้ที่ 37 °C มี 5% CO_2 เป็นเวลา 1, 4, 7, 9 และ 11 วัน ทดสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTT Colorimetric Assay ตามหัวข้อ 2.5.6

2.5.8 การหาปริมาณความเข้มข้นของ Ab ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ S102 และเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ

เตรียมเซลล์พันธุ์ที่ความเข้มข้น 2.5 x 10^3 เซลล์/ml เลี้ยงเซลล์ลงใน TC plate 96 หลุม ปริมาตร 200 µl / หลุม หลังจากเลี้ยงเซลล์ไว้ 1 วัน เตรียม Ab หมายเลข 20, 27, 43, 44, 77, 88 และ 94 ซึ่งเจือจางใน RPMI ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า และนำไปเติมในหลุมที่เลี้ยงเซลล์ไว้ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Ab เท่ากับ 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 µg/ml และปริมาตรในหลุมเท่ากับ 200 µl ตัวควบคุมที่ใช้คือ สาร IFN ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10,000 , 1,000 , 100 , 10 , 1 และ 0.1 IU/ml และไม่ใส่สารใด จากนั้นเลี้ยงเซลล์ไว้ 3 วัน ทดสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTT Colorimetric Assay ตามหัวข้อ 2.5.6 คำนวณค่า PS และ PG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับคนไทย (S102) ที่เก็บแช่แข็งอยู่ในไนโตรเจนเหลว จำนวน 64 โคลน สามารถเจริญได้จำนวน 40 โคลน (62.5 %) และเมื่อทดสอบการสร้างแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมาโดยเก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์ S 102 ด้วยวิธี ELISA พบว่าเซลล์ยังคงสร้างแอนติบอดีอยู่จำนวน 21 โคลน มี 3 โคลน ที่ทดสอบได้ค่า OD ต่ำ (0.5 - 0.8) ส่วนใหญ่ ให้ค่า OD สูงกว่า 1.0

3.2 ทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ โดยวิธี ELISA

นำแอนติบอดีในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ทั้ง 21 โคลน ไปทดสอบการทำปฏิกิริยาเซลล์มะเร็งตับ (R 12 , Hep- G2) มะเร็งเต้านม (BT 474) มะเร็งปอด (Chago) มะเร็งตับอ่อน (HS 766 T) มะเร็งกระเพาะ (Kato-III) มะเร็งลำไส้ (Sw 620) มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่อชนิด sarcoma (U-20 S) มะเร็งชนิด Melanoma (A 375) และเซลล์ปกติ ได้แก่ เซลล์ตับ (CH - Liver) และเซลล์ fibroblast (HS 27) เปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยากับเซลล์ S102 โดยวิธี ELISA ได้ผลดังตารางที่ 1 จากผลการทดลองสามารถแบ่งแอนติบอดีออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกทำปฏิกิริยากับเซลล์ปกติ (Hs 27 และ CH – Liver) ได้แก่ หมายเลข 54 ,72 , 78 และ G1 กลุ่มที่ 2 ไม่ทำปฏิกิริยากับเฉพาะกับเซลล์ปกติ แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะเซลล์มะเร็งตับ S102 ได้แก่ หมายเลข 36 ,40 , 43 , 44 , 88 , 90 , 93 , 100 , 101 ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ S102 กับมะเร็งเต้านม ได้แก่ หมายเลข 1 , 15 , 20 , 27 , 58 และ 94 ทำปฏิกิริยากับมะเร็งตับ S102 , R12 และมะเร็ง sarcoma (U - 20 S) ได้แก่ หมายเลข 64 ทำปฏิกิริยากับมะเร็งตับ S102 (ต่ำ) ทำปฏิกิริยากับมะเร็งลำไส้ (Sw620) และ U - 20S ได้แก่ หมายเลข 77

3.3 คัดเลือกแอนติบอดีที่มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

ในการทดสอบฤทธิ์ของแอนติบอดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับนั้น ได้ทำการคัดเลือกเฉพาะแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ปกติ ที่มีทั้งหมด 15 โคลน ซึ่งเป็นจำนวนที่มาก และต้องใช้เวลานานในการเพิ่มปริมาตรและสกัดแยกแอนติบอดี ดังนั้นจึงได้ทดสอบฤทธิ์ของแอนติบอดีทั้ง 15 โคลนจากในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยตรง โดยวิธี MTT Colorimetric Assay หลังจากเลี้ยงเซลล์ S102 ลงใน tissue culture plate 96 หลุม หลุมละ 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม นาน 24 ชั่วโมง เติมอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา หลุมละ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงไว้เป็นเวลา 1, 3 , 6 และ 9 วัน โดยจะทำการเปลี่ยนอาหารในวันที่ 3 เพื่อเติม MTT และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และคำนวณหา PG ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่าแอนติบอดีมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ในวันที่ 1 และ 3 แต่ไม่มีผลในการยับยั้งในวันที่ 6 และ 9

คัดเลือกแอนติบอดีที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ 40 % ขึ้นไป (PG ต่ำกว่า 60%) แอนติบอดีที่มีผลยับยั้งเซลล์ในวันที่ 1 แต่ไม่มีผลยับยั้งในวันที่ 3 ได้แก่ # 90 , 93 , 64 แอนติบอดีที่มีผลยับยั้งในวันที่ 1 และ 3 ได้แก่ หมายเลข 44 , 88 , 101 , 1 , 15 , 20, 58 , 94 , 77 จากการจัดแอนติบอดีในข้อ 2 จึงคัดเลือกแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มได้แก่ หมายเลข 44 , 88 , 20 , 94 และ 77

ตารางที่ 1 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเซลล์พันธุ์ชนิดอื่นๆเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งตับ S102 โดยวิธี ELISA

แอนติบอดี	เซลล์พันธุ์											
	A375	BT474	Chago	CH-liver	Hep-G_2	Hs27	Hs766T	Kato-III	R 12	S102	Sw620	U20S
1	±	4*	–	±	±	–	–	1*	±	4*	±	±
15	1*	3*	–	1*	±	±	±	1*	1*	3*	±	1*
20	1*	3*	–	1*	±	±	±	1*	1*	3*	±	1*
27	1*	2*	–	1*	±	±	±	1*	1*	2*	±	1*
36	±	±	–	±	±	±	–	±	±	3*	±	±
40	±	±	–	±	±	±	±	±	±	3*	±	±
43	±	–	–	±	±	±	–	±	±	3*	±	±
44	1*	±	–	1*	±	±	±	±	±	3*	±	±
54	3*	1*	–	4*	1*	2*	±	3*	2*	2*	4*	3*
58	1*	3*	–	1*	±	±	±	1*	1*	3*	±	1*
72	3*	1*	2*	2*	±	2*	1*	1*	2*	3*	2*	3*
77	1*	–	–	–	±	–	–	±	±	1*	2*	3*
78	1*	–	–	3*	±	–	–	-	±	1*	1*	3*
88	±	±	–	±	±	–	–	±	±	3*	–	±
90	±	±	–	±	±	–	–	±	±	3*	±	±
93	±	±	–	±	±	±	–	±	±	3*	±	±
94	1*	3*	±	1*	±	±	±	±	1*	3*	±	1*
100	±	±	–	±	±	–	–	±	±	3*	±	±
101	±	1*	–	±	±	±	–	±	±	3*	±	±
G1	3*	2*	–	4*	3*	3*	3*	1*	3*	4*	3*	3*
64	±	–	–	1*	±	±	1*	–	3*	4*	1*	2*
ซีรัมหนูกระต่ายต้านด้วย S102 (1:1000)	4*	4*	4*	4*	4*	4*	4*	4*	4*	4*	4*	4*
ซีรัมหนูปกติ (1:1000)	±	1*	–	±	–	–	–	±	±	±	±	±
RPMI	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

ผลการทดสอบ ELISA ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm

< 0.25	=	–
0.26 - 0.50	=	±
0.51 - 0.75	=	1*
0.76 - 1.00	=	2*
1.01 - 1.50	=	3*
> 1.51	=	4*

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ S102 แสดงค่าการเจริญของเซลล์ (PG) เมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลา 1 ,3 ,6 และ 9 วัน โดยวิธี MTT Colorimetric Assay

แอนติบอดี	% cell growth (PG)			
	ระยะเวลาที่เลี้ยงเซลล์			
	1 วัน	3 วัน	6 วัน	9 วัน
36	90	100	106	91
40	55	69	119	104
44*	22	58	212	86
88*	11	51	109	82
90	-6	85	111	94
93	32	96	101	75
100	55	68	89	87
101	14	55	125	94
1	41	33	102	97
15	35	24	99	99
20*	20	52	107	94
58	18	55	108	105
94*	18	55	103	95
64	-8	67	96	98
77*	71	64	109	99

* แอนติบอดีที่คัดเลือกเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณและใช้ในการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มปริมาตรแอนติบอดี

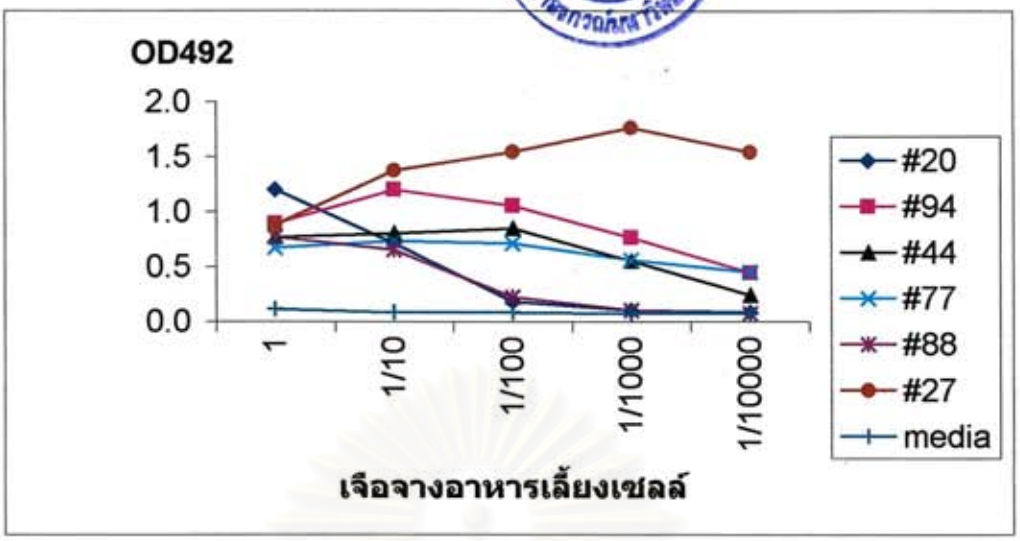
หลังจากคัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้แก่ หมายเลข 44 , 88 , 20 , 94 และ 77 ทำการเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงใน tissue culture flask ขนาดพื้นที่ 80 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงเซลล์ 1 x 10^5 เซลล์ ปริมาตร 100 ml เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 - 4 วัน (อาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง) ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 ลิตร ต่อเซลล์ไฮบริโดมา 1 โคลน จากนั้นทดสอบ activity ของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี ELISA ก่อนที่จะทำการสกัดแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ สำหรับไฮบริโดมาหมายเลข 27 ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์จากการเพิ่มปริมาตรเซลล์โดยเลี้ยงใน hollow fiber bioreactor ซึ่งได้ปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงกว่าเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ จากการทดสอบ activity ของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ได้ผลดังกราฟรูปที่ 1 ไฮบริโดมาหมายเลข 88 , 20 ให้ค่า activity สูงสุดโดยไม่เจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ , หมายเลข 44 เจือจางที่ 1: 100 , หมายเลข 94 , 77 เจือจางที่ 1: 10 , หมายเลข 27 เจือจางที่ 1: 1000

3.5 การสกัดแยกแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity Chromatography

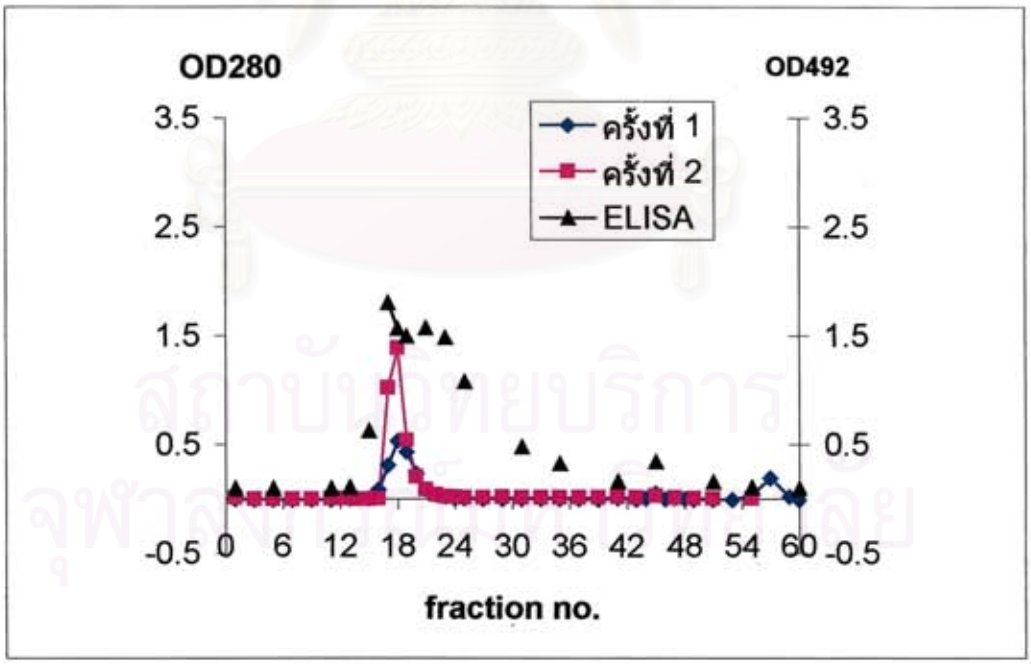
จากการสกัดแยกแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ลิตร ผ่านคอลัมน์ protein - A sepharose ชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ด้วย citrate buffer pH 4.5 และ 3.5 เก็บโปรตีนที่ชะได้ หลอดละ 2 ml ตรวจวัดโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ถูกชะที่ pH 4.5 และตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ได้ผลดังกราฟรูปที่ 2 - 8 พบว่าแอนติบอดีหมายเลข 88 ได้ปริมาณโปรตีนต่ำ ใกล้เคียงกับโปรตีนที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5% FCS ทำการรวมโปรตีนหลอดที่มีค่า OD สูง (กลาง peak) แยกกับหลอดที่มีค่า OD ต่ำ (ปลาย peak) ปรับโปรตีนให้ละลายอยู่ใน NSS โดยวิธี ไดอะไลซีส ตรวจวัดปริมาตรโปรตีนและอิมมูโนกลอบบูลิน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 260 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 3 แอนติบอดีส่วนที่มีความเข้มข้นสูงมีความบริสุทธิ์ประมาณ 60% และทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ได้ผลดังกราฟรูปที่ 9 แอนติบอดีทุกตัวยังคงมี activity สูง ได้แก่ หมายเลข 20 , 27 , 44 , 94 แอนติบอดีตัวที่มี activity ค่อนข้างต่ำได้แก่ หมายเลข 88 และ 77

3.6 ศึกษาการเจริญของเซลล์ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบแอนติบอดี

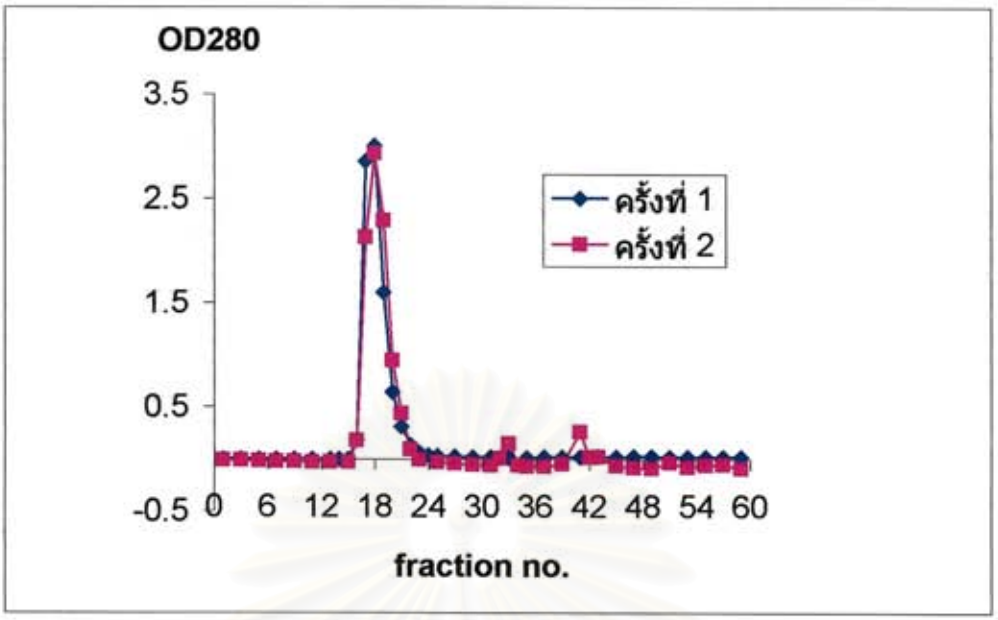
จากการทดสอบการเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ พบว่า Chago, SW620, A375 และ Hep-G2 มีการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงไว้ 4 วัน S102 ,BT474 และ U-20S มีการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงไว้ 11 วัน Hs766T และ Hs27 มีการเจริญช้ามาก ดังกราฟรูปที่ 10 ดังนั้น ระยะเวลาที่จะใช้ในการศึกษาจะใช้ที่ 4 วัน โดยจะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 5 x 10^3 เซลล์/หลุม/200 µl ไว้ 1 วัน แล้วจึงเติม Ab แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 3 วัน จึงจะทำการใส่ MTT เนื่องจากถ้าเลือกใช้เวลาที่เร็วกว่า 4 วัน เซลล์ที่มีการเจริญช้า ก็จะเห็นการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ซึ่งจะทำให้การแปรผลผิดพลาดได้ง่าย ประกอบกับผลการทดลองในตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ S102 โดยวิธี MTT Colorimetric Assay เป็นเวลา 1, 3, 6 และ 9 วัน แนวโน้มที่เห็นฤทธิ์ของ Ab ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ คือที่ 1 และ 3 วัน ดังนั้น ระยะเวลาที่ดีที่ใช้ในการทดสอบคือ ใส่ Ab แล้วเลี้ยงเซลล์ไว้ 3 วัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้ 6 วัน แอนติบอดีไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ เซลล์มีการเจริญมากกว่า 100 เปอร์เซนต์ (PG) และที่ 9 วัน เซลล์มีการเจริญลดลงเนื่องจากเซลล์เจริญเต็มที่แต่พื้นที่การเจริญจำกัด เซลล์จึงมีการตายเนื่องจากภาวะเซลล์ overgrowth



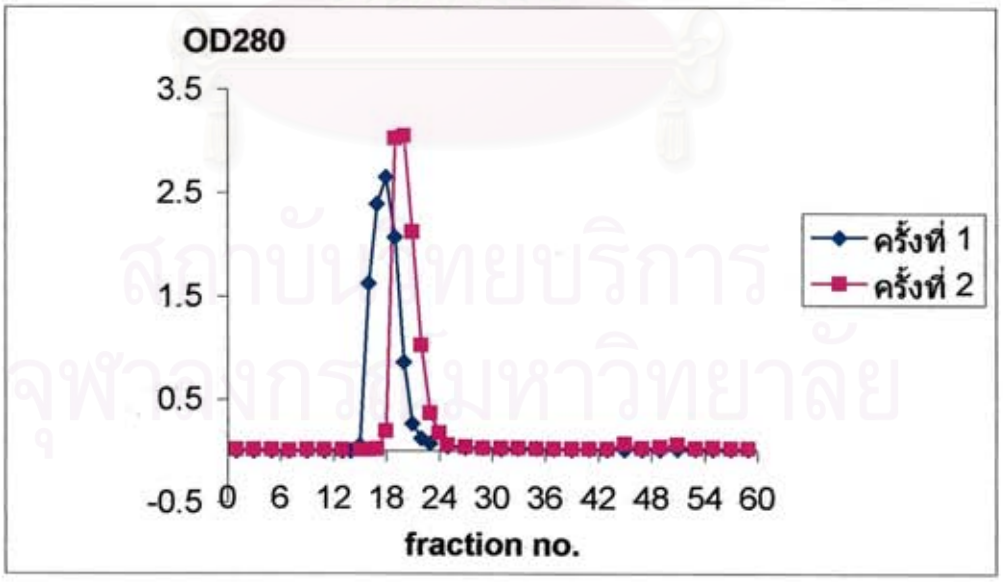
รูปที่ 1 แสดงค่า optical density จากการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็ง S102 โดยวิธี ELISA



รูปที่ 2 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 20 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography และทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

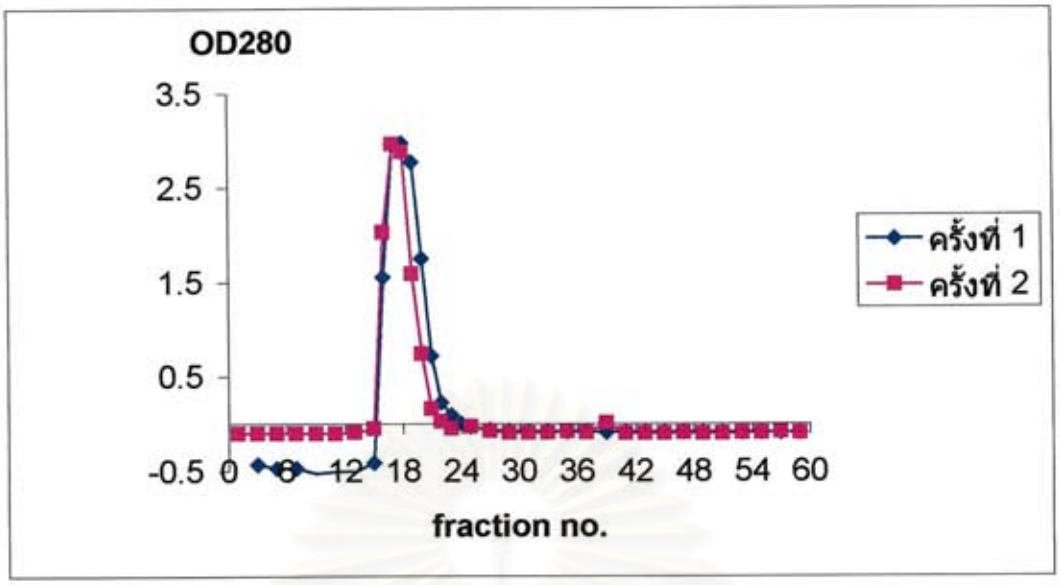


รูปที่ 3 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 94 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography

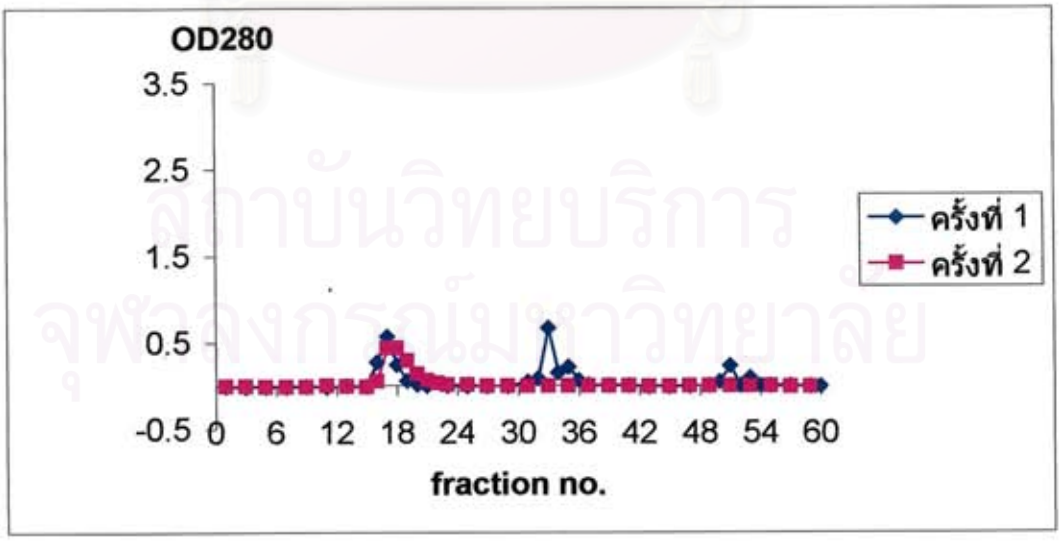


รูปที่ 4 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 44 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

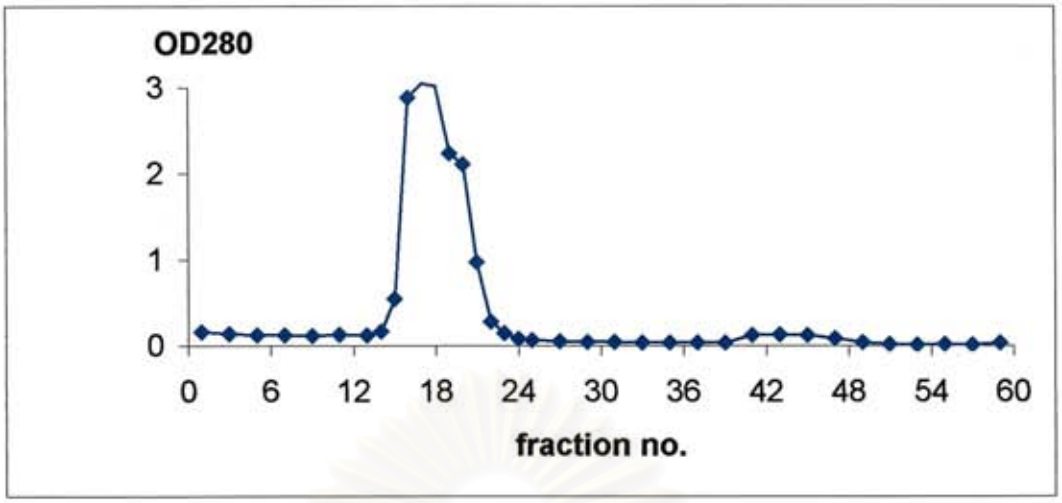


รูปที่ 5 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 77 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography

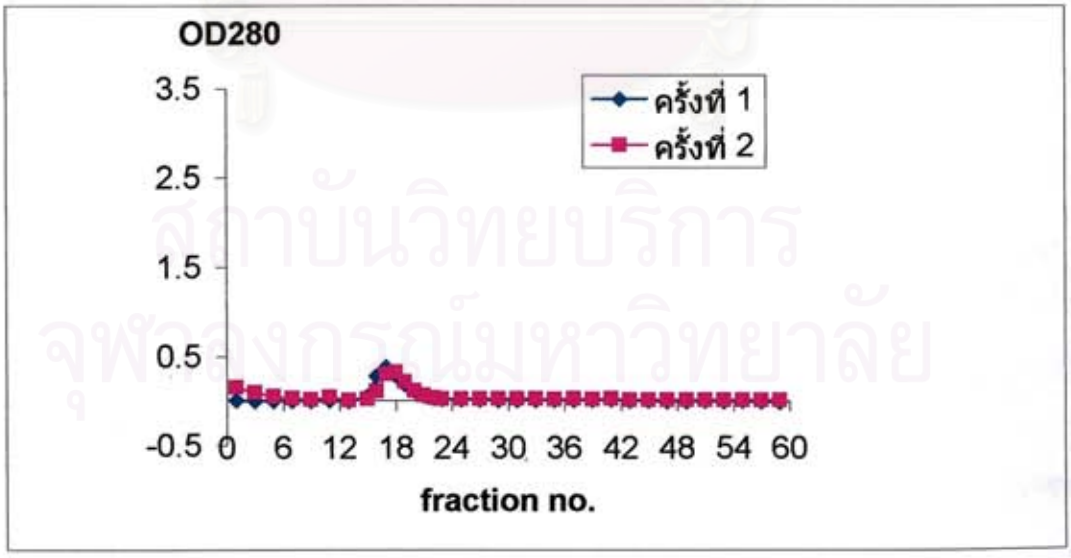


รูปที่ 6 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 88 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

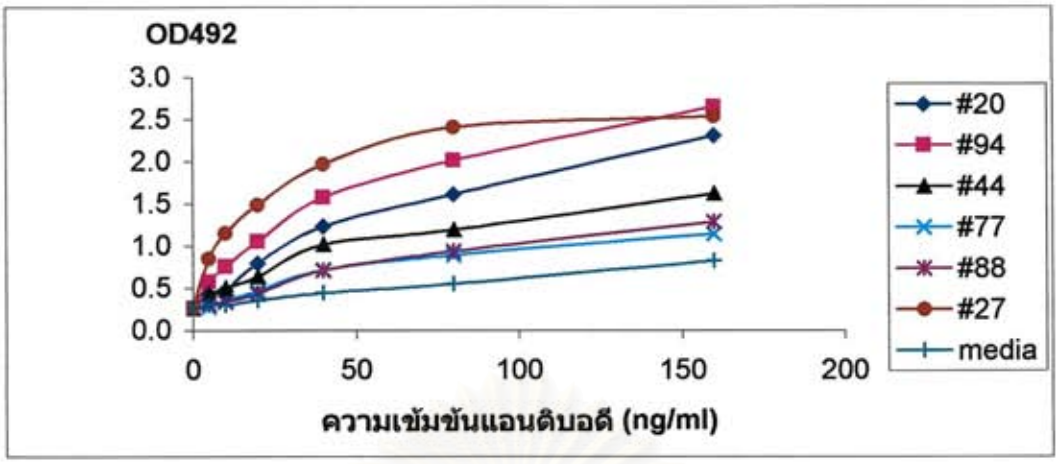


รูปที่ 7 แสดงค่า optical density ของแอนติบอดีหมายเลข 27 ที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography

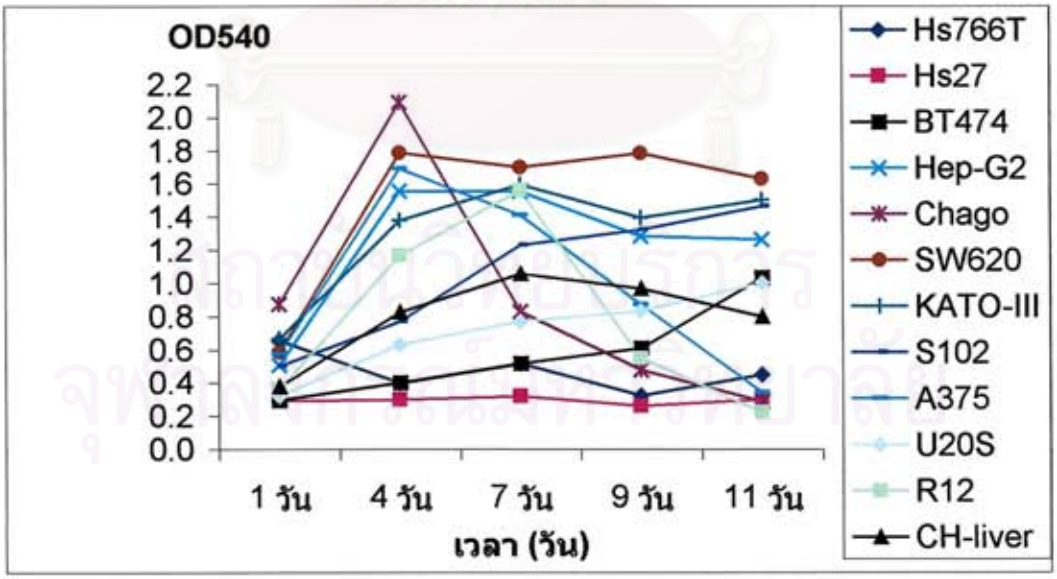


รูปที่ 8 แสดงค่า optical density ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Affinity Chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 แสดงค่า optical density เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเซลล์มะเร็ง S102 ทดสอบโดยวิธี ELISA



รูปที่ 10 แสดงค่า optical density เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ที่เลี้ยงไว้ 1 ,4 ,7 ,9 และ 11 วัน ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay

ตารางที่ 3 ผลการสกัดแยกแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Affinity Chromatography

แอนติบอดี	ส่วนที่เก็บ	ปริมาตร (ml)	โปรตีนเข้มข้น (mg/ml)	IgG (mg/ml)	ความบริสุทธิ์ (%)
20	OD สูง	17	0.57	0.37	65
	OD ต่ำ	18	0.05	0.04	80
94	OD สูง	14	2.39	1.52	64
	OD ต่ำ	13.5	0.18	0.13	73
44	OD สูง	21	1.60	1.03	64
	OD ต่ำ	17	0.09	0.07	78
77	OD สูง	21	2.94	1.87	64
	OD ต่ำ	17	0.24	0.17	71
88	OD สูง	17	0.27	0.18	67
	OD ต่ำ	9.5	0.06	0.05	83
27	OD สูง	13	4.05	2.59	64
	OD ต่ำ	7	0.41	0.28	68
อาหารเลี้ยงเซลล์	OD สูง	15	0.24	0.16	67
RPMI + 5%FCS	OD ต่ำ	9	0.11	0.09	82

การคำนวณ

โปรตีน = (1.55 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm) – (0.77 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm)(mg/ml)

$$\text{IgG} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm}}{1.36} \quad \text{(mg/ml)}$$

Extinction coefficient at 280 nm of IgG = 1.36 (Immunochemistry in practice : 1987 หน้า 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ Ab ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300 และ 500 μg / ml ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ S102 พบว่า Ab หมายเลข 77 และ 43 ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 Ab หมายเลข 27 และ 94 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้บ้างแต่ไม่ขัดเจน

Ab ที่เห็นผลการยับยั้งการเจริญได้ชัดเจน ได้แก่ Ab หมายเลข 20, 44 และ 88 ดังกราฟรูปที่ 11 จากการคำนวณหา PG ที่ได้ พบว่า Ab หมายเลข 20, 27, 44, 94 และ 88 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50% ที่ความเข้มข้น 100, 500, 300, 200 และ 100 μg / ml ตามลำดับ Ab หมายเลข 20 ที่ความเข้มข้นสูงสุด 300 μg / ml สามารถฆ่าเซลล์ S102 ได้ประมาณ 10 – 20% ส่วน Ab หมายเลข 44, 94 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ประมาณ 80% สำหรับ IFN สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ 50% ที่ความเข้มข้น 1000 IU/ml และสามารถฆ่าเซลล์ได้ประมาณ 20% ที่ความเข้มข้น 10000 IU/ml ดังกราฟรูปที่ 12

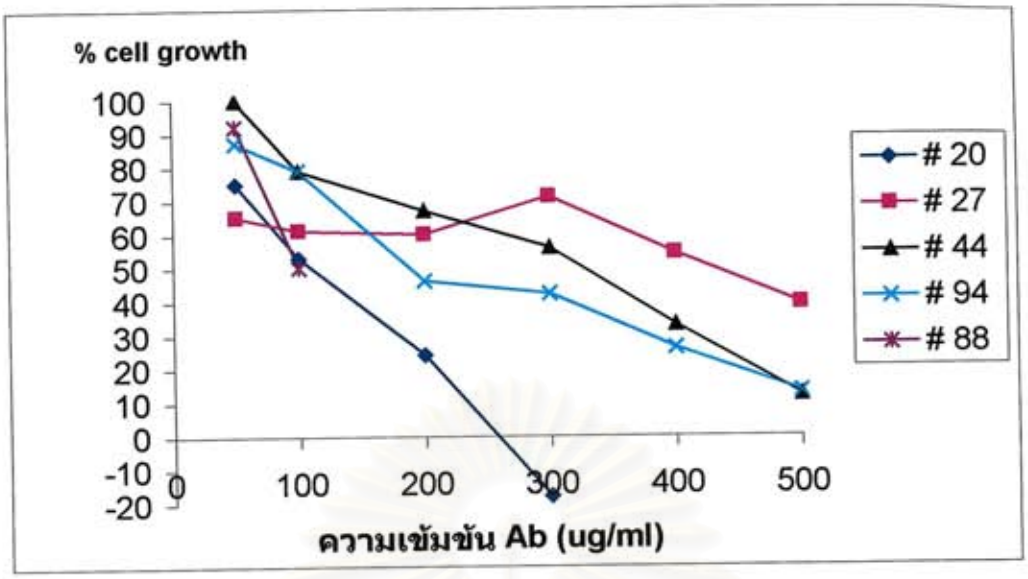
ดังนั้น นำค่าความเข้มข้นของ Ab ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% และที่ยับยั้งเซลล์ได้สูงสุด (ดังตารางที่ 4) ไปทดสอบฤทธิ์ของ Ab ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของ Ab ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ S102

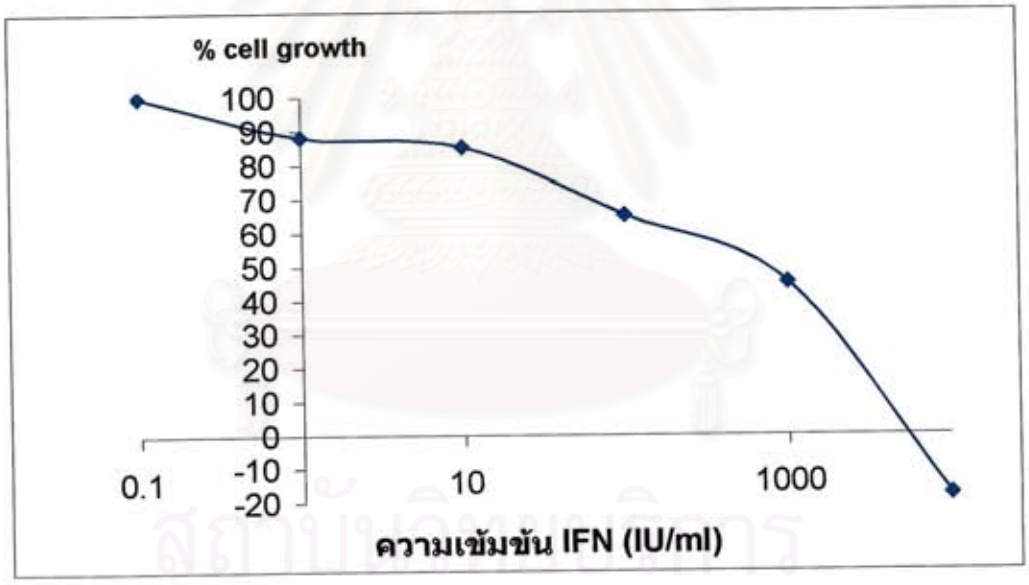
Ab หมายเลข	ความเข้มข้นของ Ab ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50% (μg / ml)	ความเข้มข้นของ Ab สูงสุด (μg / ml)
20	100	300 ฆ่าเซลล์ได้ประมาณ 10 – 20%
27	500	500 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50%
88	100	100 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50%
44	300	500 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 80%
94	200	500 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 80%
α-IFN	1000 (IU)	10000(IU) ฆ่าเซลล์ได้ประมาณ 20%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดง % cell growth ของเซลล์ S102 เมื่อเติมแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,94 และ 88 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay



รูปที่ 12 แสดง % cell growth ของเซลล์ S102 เมื่อเติม IFN ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay

3.8 ฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการยับยั้งการเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ

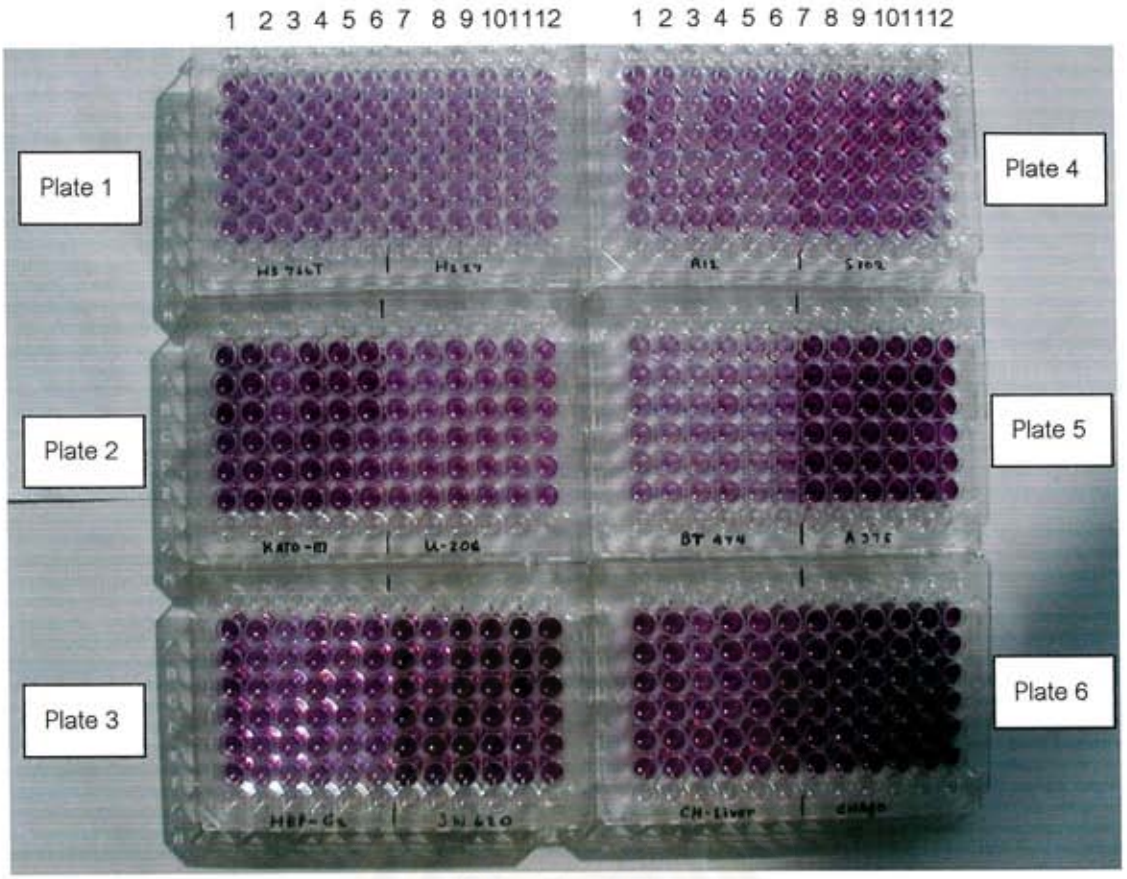
เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้50% และที่สูงสุด คือ แอนติบอดีหมายเลข 20 ทดสอบที่ความเข้มข้น 100 และ 300 μg/ml ,แอนติบอดีหมายเลข 27 ทดสอบที่ความเข้มข้น 500 ,แอนติบอดีหมายเลข 44 ทดสอบที่ความเข้มข้น 300 และ 500 μg/ml ,แอนติบอดีหมายเลข 94 ทดสอบที่

ความเข้มข้น 200 และ 500 µg/ml ,แอนติบอดีหมายเลข 88 ทดสอบที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เติมลงในเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ และเลี้ยงไว้ 3 วัน แล้วทดสอบโดยวิธี MTT colorimetric assay ได้ผลดังรูปที่ 13จากนั้นคำนวณค่า PS และ PG จากการคำนวณ PS พบว่า หลังจากเลี้ยงเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆไว้ 3 วัน เซลล์แต่ละชนิดมีการเจริญที่แตกต่างกัน เซลล์ BT474 ,Hs27 ,Hs766T และ U-20S มีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียง 10 – 20% คือมีการเจริญช้า ส่วน Hep-G2 ,R12 และ S102 ,มีการเจริญเพิ่มขึ้น 30 – 40% และเซลล์ A375 ,Chago ,CH-Liver ,KATO-III และ Sw620 มีการเจริญค่อนข้างเร็วคือ 60 – 70% ดังตารางที่ 5 ดังนั้นเซลล์พันธุ์ที่มีการเจริญช้าจึงไม่ใช้ในการทดลองต่อไปเพราะจะทำให้การคำนวณค่า PG ผิดพลาดได้ง่าย

ตารางที่ 5 การเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้ 3 วัน

การเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น (%)	เซลล์พันธุ์					
	A375	BT474	Chago	CH-Liver	Hep-G2	Hs27
	74	10	62	63	30	13
การเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น (%)	เซลล์พันธุ์					
	Hs766T	KATO-III	R12	S102	Sw620	U-20S
	6	64	37	42	75	21

จากค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยคำนวณเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติโดยไม่ใส่แอนติบอดีเซลล์จะมีการเจริญเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมแอนติบอดีหมายเลขต่างๆเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าในสภาวะปกติ ได้ผลดังตารางที่ 6 พบว่า แอนติบอดีหมายเลข 20 ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Hep-G2 ,R12 ,S102 และ Sw620 ได้ 100 ,30 ,33 และ 34% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 300 µg/ml จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ Hep-G2 ,R12 ,S102 ได้ 33 ,23 และ 7% ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ A375 ,Chago ,CH-Liver และ Sw620 เพิ่มเป็น 59 ,40 ,93 และ 89% ตามลำดับ แอนติบอดีหมายเลข 27 ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ Hep-G2 ,R12 ,S102 และ Sw620 ได้ 86 ,29 ,31 และ 34% ตามลำดับ แอนติบอดีหมายเลข 44 ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml ฆ่าเซลล์ Hep-G2 ได้ 7% และยับยั้งการเจริญของเซลล์ Chago ,CH-Liver ,R12 ,S102 และ Sw620 ได้ 33 ,36 ,99 ,51 และ 38% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 µg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 และ R12 ได้ 28 และ 5% ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญของเซลล์ Chago ,CH-Liver ,S102 และ Sw620 ได้ 60 ,56 ,87 และ 60% ตามลำดับ แอนติบอดีหมายเลข 88 ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 ไ ด้ 26% และยับยั้งการเจริญของเซลล์ A375 ,Chago ,KATO-III ,R12 ,S102 และ Sw620 ได้ 44 ,26 ,60 ,97 ,72 และ 59% ตามลำดับ แอนติบอดีหมายเลข 94 ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 ได้ 5% และยับยั้งการเจริญของเซลล์ CH-Liver ,R12 และ S102 ได้ 45 ,73 และ 51% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 µg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 และ R12 ได้ 28 และ 19% ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญของเซลล์ CH-Liver ,S102 และ Sw620 ได้ 52 ,81 และ 50% ตามลำดับ



รูปที่ 13 แสดงผลการมีชีวิตรอดของเซลล์พันธุ์ 12 ชนิด เมื่อเลี้ยงโดยเติมแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,94 และ 88 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay

หลุม	2B,2C,2D,7B,7C,7D	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 20	เข้มข้น	100	μg/ml
หลุม	3B,3C,3D,8B,8C,8D	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 20	เข้มข้น	300	μg/ml
หลุม	5B,5C,5D,10B,10C,10D	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 27	เข้มข้น	500	μg/ml
หลุม	2E,2F,2G,7E,7F,7G	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 44	เข้มข้น	300	μg/ml
หลุม	3E,3F,3G,8E,8F,8G	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 44	เข้มข้น	500	μg/ml
หลุม	4E,4F,4G,9E,9F,9G	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 94	เข้มข้น	200	μg/ml
หลุม	5E,5F,5G,10E,10F,10G	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 94	เข้มข้น	500	μg/ml
หลุม	6E,6F,6G,10E,11F,11G	ของ plate ที่ 1 – 6 เติมแอนติบอดีหมายเลข 88	เข้มข้น	100	μg/ml
หลุม	1E,1F,1G,12E,12F,12G	ของ plate ที่ 1 – 6 เติม α-IFN	เข้มข้น	10,000	IU/ml
หลุม	6B,6C,6D,11B,11C,11D	ของ plate ที่ 1 – 6 ไม่เติมแอนติบอดี (C+)			

สีม่วงเข้มแสดงว่าเซลล์มีปริมาณมาก

สีม่วงจางแสดงว่าเซลล์มีปริมาณน้อย

ตารางที่ 6 แสดงค่าการยับยั้งและฆ่าเซลล์พันธุ์ 8 ชนิด เมื่อเลี้ยงด้วยแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,88 ,94 และ α-IFN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay

# Ab	ความเข้มข้น (μg/ml)	การยับยั้งการเจริญของเซลล์ (%)							
		A375	Chago	CH-Liver	Hep-G2	KATO-III	R12	S102	Sw620
20	100	15	15	16	100	15	30	33	34
	300	59	40	93	-33 *	92	-23 *	-7 *	89
27	500	11	4	61	86	15	29	31	34
44	300	15	33	36	-7 *	6	99	51	38
	500	23	60	56	-28 *	24	-5 *	87	60
88	100	44	26	0	-26 *	60	97	72	59
94	200	1	16	45	-5 *	0	73	51	26
	500	19	24	52	-28 *	24	-19 *	81	50
α-IFN	10000 (IU/ml)	33	0	38	38	33	77	-19 *	0

(ค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ = 100 - % cell growth

* ค่าติดลบแสดงถึงฤทธิ์ของแอนติบอดีในการฆ่าเซลล์ (เซลล์ลดลงจากเซลล์เริ่มต้น)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแอนติบอดีทุกตัวจะมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ Hep-G2 ,R12 และ S102 ได้ แต่จะมีประสิทธิภาพมากน้อยขึ้นอยู่กับแอนติบอดีแต่ละตัว และแอนติบอดีบางตัวอาจมีฤทธิ์ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆด้วย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการนำไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเซลล์ S102 ออกมาเลี้ยงก็สามารถเลี้ยงเจริญได้ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่เลี้ยงไม่เจริญอาจเนื่องมาจากปัญหาในขั้นตอนการเก็บเซลล์แช่แข็ง เซลล์ไม่แข็งแรงพอหรือจำนวนเซลล์ที่เก็บน้อยเกินไป หลังจากทดสอบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา พบว่าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีอยู่จำนวน 21 โคลน จากนั้นนำแอนติบอดีจากอาหารที่ไว้เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการทำปฏิกิริยาโดยวิธี ELISA กับเซลล์มะเร็งอื่นๆ ได้แก่ R12, Hep-G2, BT474, Chago, Hs766T, KATO-III, SW620, U-20S, A375 และเซลล์ปกติ ได้แก่ CH-liver และ Hs27 คัดเลือกแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ปกติและจัดกลุ่มแอนติบอดีตามการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็ง ได้แก่ กลุ่ม1 ทำปฏิกิริยาเฉพาะเซลล์ S102 ได้แก่ หมายเลข 36, 40, 43, 44, 88, 90, 93, 100 และ 101 กลุ่มที่2 ทำปฏิกิริยากับ S102 และ BT474 ได้แก่ 1, 15, 20, 27, 58 และ 94 กลุ่มที่3 ทำปฏิกิริยากับ S102, R12 และ U-20S ได้แก่ หมายเลข 77 การที่จะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 17 โคลน เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและสกัดแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ต้องใช้เวลานานมาก จึงนำทั้ง 17 โคลนนี้ไปคัดเลือกตัวที่มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ โดยใช้แอนติบอดีในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay เลี้ยงเซลล์ S102 ที่ใส่แอนติบอดีไว้ 1, 3, 6 และ 9 วัน พบว่าแอนติบอดีมีแนวโน้มยับยั้งเซลล์ S102 ได้ วันที่ 1 และ 3 การเลี้ยงเซลล์ไว้ช่วง 6 – 9 วัน เซลล์มีการเจริญเร็วจนแอนติบอดีไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ทัน จึงคัดเลือกตัวที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้มากกว่า 40% กลุ่ม1 เลือก หมายเลข 44 และ 88 กลุ่ม2 เลือก หมายเลข 20 และ 94 กลุ่ม3 หมายเลข 64 หลังจากเลี้ยงต่อมาพบว่าไฮบริโดมาไม่สร้างแอนติบอดีจึงตัดทิ้งไป ส่วน หมายเลข 77 ยับยั้งการเจริญ S102 ได้ประมาณ 30% แต่เนื่องจากเซลล์กลุ่มที่ 4 มีเพียงตัวเดียวจึงคัดเลือกไว้ การเลือกเซลล์จากหลายๆกลุ่มเนื่องจากแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ S102 อย่างเดียวอาจจับกับ epitope ที่มีผลต่อการทำลายเซลล์หรือไม่ก็ได้และแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นอาจทำปฏิกิริยากับ epitope ที่มีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็งและเป็น epitope ที่มีอยู่ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ซึ่งก็สามารถนำไปใช้ได้กับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ไม่เฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ ก็จะทำให้การนำแอนติบอดีไปใช้ได้กว้างยิ่งขึ้น จากนั้นจึงเลี้ยงเซลล์ หมายเลข 44, 88, 20, 94 และ 77 เพิ่มจำนวนแอนติบอดี โดยเก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์นำไปสกัดแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ผ่านคอลัมน์ protein-A sepharose แอนติบอดีถูกชะออกที่ pH 4.5 ทดสอบแอนติบอดีโดยวิธี ELISA และติดตามเก็บแอนติบอดีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แยกเก็บแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูง (กลาง peak) และส่วนที่มีแอนติบอดีต่ำ (ปลาย peak) ตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนและอิมมิวโนกลอบบูลินโดยวิธี UV absorption ส่วนของแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงมีความบริสุทธิ์ประมาณ 70 – 80% เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ก่อนสกัดให้บริสุทธิ์) แอนติบอดีหมายเลข 88 หลังจากการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ตรวจวัดปริมาณโปรตีนและอิมมิวโนกลอบบูลินใกล้เคียงกับสารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI + FCS 5% เนื่องจาก protein-A จะจับกับส่วนของ Fe ได้ทั้งของม้า, สุนัข, แมว, หนู, กระต่าย, แพะ, แกะ และวัว ดังนั้นในการสกัดอาหารเลี้ยงเซลล์จึงมีอิมมิวโนกลอบบูลินของวัวออกมาได้แต่เมื่อนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับ S102 โดยวิธี ELISA ค่าที่ได้จะต่ำกว่าหมายเลข 88 ในการสกัดแอนติบอดีหมายเลข 27 จะได้ปริมาณอิมมิวโนกลอบบูลินสูงเนื่องจากสกัดจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงโดยวิธี hollow fibers bioreactor ซึ่งจะได้ปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงกว่าแอนติบอดีที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงในขวด

แอนติบอดีหมายเลข 27 ได้จากการสกัดแยกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงโดยวิธี hollow fibers bioreactor เนื่องจากได้ทำการทดลองเลี้ยงเซลล์โดยวิธีนี้ ซึ่งไม่ได้กำหนดในงานวิจัยนี้

การทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay เป็นการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งใช้เป็นวิธีหลักในการทดสอบโดยดูผลของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งจะเปลี่ยนสาร MTT เป็น Formazan มีผลึกสีฟ้า จากนั้นละลายด้วยตัวทำละลายคือ DMSO และวัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งถ้าเซลล์มีจำนวนน้อยก็จะวัดค่า O.D. ได้ค่าต่ำ ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก ค่า O.D. ที่วัดได้ก็จะมีค่าสูง วิธีการทดสอบนี้ใช้เป็นหลักในการวิจัยเพื่อดูการเจริญของเซลล์ (ใช้คำนวณหาค่า PS และ PG) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ

จากการศึกษาการเจริญของเซลล์แต่ละชนิดเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบแอนติบอดี โดยเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลา 1 ,4 ,7 ,9 และ 11 วัน พบว่าเซลล์แต่ละชนิดมีการเจริญที่แตกต่างกัน ถึงแม้จะใช้เซลล์เริ่มต้นจำนวนเท่ากัน คือ 5 x 10^3 เซลล์ต่อหลุม เซลล์ที่มีการเจริญเร็ว ได้แก่ เซลล์ Chago ,SW 620 ,A375 และ Hep-G2 วัดปริมาณเซลล์ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงไว้ 4 วัน จากนั้นในวันที่ 7 จะวัดปริมาณเซลล์ได้ลดลง เนื่องจากเซลล์เริ่มมีการตาย ขณะที่เซลล์ SW620 วัดค่า O.D. ได้ค่าใกล้เคียงกับค่าสูงสุด แสดงว่าเซลล์หยุดการเพิ่มจำนวน ขณะที่เซลล์ CH-Liver ,KATO-III และ R12 มีการเพิ่มจำนวนสูงสุดเมื่อเลี้ยงไว้ 7 วัน เซลล์ BT474 ,U-20S และ S102 มีการเพิ่มจำนวนสูงสุดเมื่อเลี้ยงไว้ 11 วัน สำหรับเซลล์ Hs 766T และ Hs 27 พบว่าปริมาณเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แทบจะไม่เพิ่มจำนวน ซึ่งถ้าจะใช้เซลล์นี้ในการทดลองควรต้องเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นให้มากขึ้น

จากการทดลองหาความเข้มข้นของแอนติบอดีในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 โดยเลี้ยงเซลล์ที่เติมแอนติบอดีหมายเลข 20 ,27 ,44 ,88 และ 94 ไว้ 3 วัน และแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 50 ,100 ,200 ,300 ,400 และ 500 μg/ml เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay และนำค่า O.D. ที่ได้ไปคำนวณค่า PG ยกเว้นแอนติบอดีหมายเลข 88 และ 20 แปรความเข้มข้นสูงสุดได้ 100 และ 300 μg/ml ตามลำดับ เนื่องจากแอนติบอดีที่สกัดได้มีความเจือจางมากคือ หมายเลข 20 และ 88 มีโปรตีนเข้มข้น 0.57 และ 0.27 mg/ml ตามลำดับ พบว่า แอนติบอดีหมายเลข 77 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ,แอนติบอดีหมายเลข 20 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50% ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml และที่ความเข้มข้นสูงสุด 300 μg/ml ฆ่าเซลล์ได้ประมาณ 18% ,แอนติบอดีหมายเลข 27 ที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 μg/ml ยับยั้งเซลล์ได้ประมาณ 50% ,แอนติบอดีหมายเลข 44 ที่ความเข้มข้น 300 μg/ml ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50% และที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 μg/ml ยับยั้งการเจริญได้ประมาณ 80% ,แอนติบอดีหมายเลข 94 ที่ความเข้มข้น 200 μg/ml ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ประมาณ 50% และที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 μg/ml ยับยั้งได้ประมาณ 80% , แอนติบอดีหมายเลข 88 ที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 μg/ml ยับยั้งได้ประมาณ 50% และ α-IFN ที่ความเข้มข้น 10000 IU/ml สามารถฆ่าเซลล์ S102 ได้ประมาณ 20%

แอนติบอดีแต่ละหมายเลขมีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำแอนติบอดีไปทดสอบกับเซลล์พันธุ์โดยใช้ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ S102 ได้ประมาณ 50% และที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอนติบอดีแต่ละหมายเลข จากการคำนวณ PS พบว่า เซลล์ BT474 ,Hs27 ,Hs766T และ U-20S เมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้ 3 วัน เซลล์มีการเจริญช้าคือ เจริญเพิ่มขึ้น 10 ,13 ,6 และ 21% ตามลำดับ จึงไม่นำมารายงานผลการหา PG เนื่องจากจะทำให้ค่าผิดพลาดได้ง่าย

จากการทดลองทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อมะเร็งตับ S102 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์พันธุ์ชนิดต่างๆ พบว่าแอนติบอดีทุกหมายเลขมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ S102 ,R12 และ Hep-G2 และแอนติบอดีบางตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆได้ด้วย แอนติบอดีหมายเลข 20 ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml ยับยั้งเซลล์ Hep-G2 ,R12 ,S102 ซึ่งเป็นมะเร็งตับ และ Sw620 ซึ่งเป็นมะเร็งลำไส้ได้ดี 100 ,30 ,33 และ 34% ตามลำดับ แต่ยับยั้งเซลล์ A375 (Melanoma) ,Chago (มะเร็งปอด) ,CH-Liver (เซลล์ตับปกติ) และ KATO-III (มะเร็งกระเพาะ) ได้ประมาณ 15% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 300 μg/ml สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งตับ Hep-G2 ,R12 และ S102 ได้ 33 ,23 และ 7% ตามลำดับ แต่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นและเซลล์ตับปกติได้มากขึ้น (40 – 90%) สำหรับแอนติบอดหมายเลข 27 ที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 μg/ml สามารถยับยั้งเซลล์ Hep-G2 ,R12 ,S102 ,Sw620 และ CH-Liver ได้ 86 ,29 ,31 ,34 และ 61% ตามลำดับ แอนติบอดีหมายเลข 44 ที่ความเข้มข้น 300 μg/ml มีฤทธิ์ฆ่า Hep-G2 ได้ 7% และยับยั้งเซลล์ R12 ,S102 ,Sw620 ,Chago และ CH-Liver ได้ 99 ,51 ,38 ,33 และ 36% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงสุดเป็น 500 μg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 และ R12 ได้ 28 และ 5% ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ,Sw620 ,Chago และ CH-Liver ได้ 87 ,60 ,60 และ 56% ตามลำดับ ส่วนแอนติบอดีหมายเลข 88 ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 ได้ 26% และยับยั้ง R12 ,S102 ,Sw620 ,A375 และ Chago ได้ 97 ,72 ,59 ,44 และ 26% ตามลำดับ โดยไม่มีผลต่อ CH-Liver ซึ่งเป็นเซลล์พันธุ์ที่เลี้ยงมาจากตับปกติ สำหรับแอนติบอดีหมายเลข 94 ที่ความเข้มข้น 200 μg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 ได้ 5% และยับยั้งการเจริญของเซลล์ R12 ,S102 ,CH-Liver และ Sw620 ได้ 73 ,51 ,45 และ 26% ตามลำดับ แต่จะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ A375 และ KATO-III เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 μg/ml สามารถฆ่าเซลล์ Hep-G2 และ R12 ได้ 28 และ 19% ตามลำดับ ยับยั้งการเจริญของเซลล์ S102 ,CH-Liver ,Sw620 ,Chago ,KATO-III และ A375 ได้ 81 ,52 ,50 ,24 ,24 และ 19% ตามลำดับ ในขณะที่ α-IFN ที่ความเข้มข้น 10000 IU/ml มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ S102 ได้ 19% และยับยั้งเซลล์ R12 ,Hep-G2 ,CH-Liver ,A375 และ KATO-III ได้ 77 ,38 ,38 ,33 และ 33% ตามลำดับ แต่จะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ Chago และ Sw620 แอนติบอดีหมายเลข 27 สามารถที่จะฆ่าเซลล์มะเร็ง S102 ที่เพาะบนผิวหนังของหนู Nude mice ทำให้ก้อนมะเร็งหายไปได้ และในการทดลองนี้ แอนติบอดีหมายเลข 27 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ไม่ค่อยดีนัก เนื่องจากการที่ฉีดแอนติบอดีเข้าไปในตัวหนูแอนติบอดีมีการทำงานร่วมกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าการทดลองที่เลี้ยงเซลล์มะเร็งผสมแอนติบอดีเพียงอย่างเดียวในหลอดทดลอง ดังนั้น การทดลองในหลอดทดลองถ้าใส่แอนติบอดีร่วมกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์ Lymphocyte จะทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น

สรุปได้ว่า แอนติบอดีมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ Hep-G2 ,S102 และ R12 ได้ดี แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งแตกต่างกัน คือจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีแต่ละหมายเลข แอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด คือ แอนติบอดีหมายเลข 88 เพราะแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 100 μg/ml สามารถฆ่าและยับยั้งการเจริญของเซลล์ Hep-G2 ,R12 และ S102 ได้ดี ขณะที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ CH-Liver ซึ่งเป็นเซลล์พันธุ์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ตับปกติ

ข้อเสนอแนะ

1. การทดลองที่ใช้เซลล์ที่มีการเจริญช้า เช่น เซลล์ BT474 ,Hs27 ,Hs766T และ U-20S ทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay อาจต้องใช้เซลล์เริ่มต้นในปริมาณที่สูงกว่า 5 x 10^3 เซลล์ต่อหลุม เพราะการเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นจะทำให้เซลล์มีการเจริญได้ดีขึ้น ส่วนเซลล์ที่มีการเจริญเร็ว เช่น เซลล์ A375 ,Chago ,CH-Liver ,Kato-III และ Sw620 ก็ต้องลดจำนวนเซลล์เริ่มต้นให้น้อยกว่า 5 x 10^3 เซลล์ต่อหลุม เพื่อให้เซลล์เจริญช้าลง ซึ่งต้องหาความเข้มข้นของเซลล์แต่ละชนิดที่เหมาะสมเพื่อให้มีการเจริญใกล้เคียงกัน

2. แอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับอาจมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอื่นได้ อาจเป็นเพราะเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิด Tumor associated antigen ซึ่งนอกจากแอนติบอดีจะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับแล้วยังยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นได้ด้วย

3. ในการทดสอบฤทธิ์ของสารในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง นอกจากจะทดสอบโดยวิธี MTT Colorimetric Assay แล้ว ยังมีการทดสอบการปลดปล่อยเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ,การแสดงออกของ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ,ศึกษาการตายของเซลล์แบบ apoptosis และการตรวจดูการเสียหายของ DNA (DNA damage) เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ บรรณาธิการ 2541 อิมมูโนวิทยา กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ บริษัท พริ้นต์โพร จำกัด
2. กิ่งกาญจน์ เลาหทัย 2535 การรักษามะเร็งด้วยกลไกและสารในระบบภูมิคุ้มกันมะเร็ง วารสารจุฬาลงกรณ์เวชสาร 36 : 757-758
3. กิ่งกาญจน์ เลาหทัย 2540 การศึกษาการทำลายเซลล์มะเร็งตับระดับเซลด้วยสาร anti-human hepatocellular carcinoma monoclonal antibodies โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. Twentyman, P.R. and Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity Br J. Cancer 56 : 279-285.
5. Mossmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays J. Immunol. Methods 65 : 55-63.
6. De Robertis, E.D.P., Saez, F.A. and De Robertis, E.M.F. 1975. Cell Biology. London : W.B. Saunders company.
7. Plumb, J.A. Milroy, R. and Kaye, S.B. 1989. Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosemsitivity Determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Research 49 : 4435-4440.
8. Ferrari, M., Fornasiero, M.C. and Isetta, A.M. 1990. MTT colorimetric assay for Testing macrophage cytotoxic activity in vitro. J. Immunol. Methods. 131 : 165-172.
9. Heo, D.S., Park, J.G., Hata, K., Day, R., Herbernan, R.B. and Whiteside, T.L. 1990. Evaluation of Tetrazolium-based Semiautomatic Colorimetric Assay for Measurement of Human Antitumor Cytotoxicity. Cancer Research. 50 : 3681-3690.
10. Loosdrecht, A.A., Beelen, R.H.J., Ossenkoppele, G.J., Brockhoven, M.G. and Langenhuijsen, M.M.A.C. 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against Leukemic cells from cell lines and patients with acute mycloid leukemia. J. Immunol. Methods 174 : 311-320.
11. Kuwata, T., Haruta, I., Hasegawa, K., Yamauchi, K. and Hayashi, N. 1998. Hepatocellular carcinoma Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity using Hepatocellular carcinoma reactive monoclonal antibody. J. Gastroenterol. Hepatol.13 : 137-144.
12. Rost, E.R., Mutch, D.G. and Herzog, T.J. 1999. Interferon-γ and Tumor Necrosis Factor-α Iduce Synergistic Cytolytic Effects in Ovarian Cancer cell lines-Roles of the TR60 and TR80 Tumor Necrosis Factor Receptors. Gynecologic Oncology 72 : 392-401.
13. Johnstone, A., and Thorpe, R. 1987. Immunochemistry in Practice , Blackwell Scientific Publication , London 306 p.

14. Hudson, L. and Hay, F.C.1980. Practical Immunology , Blackwell Scientific Publication , London 359 p.

15. Jane , C. and Chia , C. 2004. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. World Journal of Gastroenterology 10(1) : 37-41.

16. Mark , J. ,Watson , D.G. ,Grant , M.H. and Skellern , G.G. 2003. The toxicity of opiates and their metabolites in HepG2 cells. Chemico-Biological Interactions 146 : 121-129.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

. อาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH7.0 ด้วย 1N HCL กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่ ขวดละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

:. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
L-glutamine	0.1	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
Glucose	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 ด้วย 1N HCL กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่ ขวดละ 100 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บแช่แข็งเซลล์ใน ไนโตรเจนเหลว (freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI	65	มิลลิลิตร
DMSO	10	มิลลิลิตร
Fetal calf serum	25	มิลลิลิตร

ผสมสารกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเป็นขวดเล็กๆ เก็บไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส

4. 0.01% EDTA phosphate buffer saline (PBS) (ไม่มีแคลเซียมและแมกนีเซียม)

สำหรับเตรียมสารละลาย trypsin

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
EDTA	0.1	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 N NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. 0.025 % Trypsin

ชั่ง Trypsin 0.025 กรัม ละลายใน 0.01% EDTA /PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเป็นขวดเล็กๆ ไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. 0.15 M Phosphate citrate buffer pH 5.0

Citric acid (MW 192.13)	28.82	กรัม ละลายน้ำปริมาตร 1 ลิตร
Na_2HPO_4	21.30	กรัม ละลายน้ำปริมาตร 1 ลิตร

นำด่างเติมลงในกรด ปรับ pH ให้ได้ 5.0

7. สารละลาย substrate OPD

ชั่ง OPD 0.04 กรัม ละลายใน 0.15 M phosphate citrate buffer pH 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม 30% H_2O_2 ปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร เตรียมก่อนใช้

8. 0.1M phosphate buffer pH 8.0

NaH_2PO_4	14.20	กรัม ละลายน้ำปริมาตร 1 ลิตร
Na_2HPO_4	17.80	กรัม ละลายน้ำปริมาตร 1 ลิตร

เติมกรดลงในด่างปรับ pH 8.0

9. 0.1M citrate buffer pH 3.5- 6.0

Citric acid ($C_6H_8O_7$)	19.21	กรัม ละลายน้ำปริมาตร 1 ลิตร
Na_2HPO_4	14.20	กรัม ละลายน้ำปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมสารละลาย pH ต่ำกว่า 5 ปรับ citric acid ด้วย phosphate

เตรียมสารละลาย pH สูงกว่า 5 ปรับ phosphate ด้วย citric acid

10. 0.1 M Tris - hydrochloric acid buffer pH 8.5 , 9.0

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1 M (121 g / l)
Hydrochloric acid	1 M

เติม HCl ลงใน tris ปรับ pH ให้ได้ตามที่ต้องการ pH 8.5 ผสม 1M Tris ปริมาตร 25 มิลลิลิตร กับ 1M HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย