

## การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง การแสดงออกของยีน และโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูก หลังจากได้รับอะฟลาท็อกซิน B1

สุธาสินี อาษายุทธ<sup>1</sup>  
เสาวคนธ์ ศุภกรโยธิน<sup>1</sup>  
จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย<sup>2</sup>

दनัย ทิวาเวช<sup>1</sup>  
สิทธิรักษ์ รอยตระกูล<sup>2</sup>  
สมชาย ธนะสิทธิชัย<sup>1</sup>

**บทคัดย่อ** ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของทุกประเทศทั่วโลก เนื่องจากการตรวจวินิจฉัย การรักษาและการหาสาเหตุของโรคมะเร็งระยะแรกยังมีข้อจำกัดอยู่ ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหากลไกการเกิดโรคมะเร็ง จึงมีความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อควบคุมโรคมะเร็งในอนาคต การใช้เซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์มาเป็น ตัวแทนเพื่อค้นหาสารก่อมะเร็งในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นแนวคิดที่น่าสนใจ และในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาวิจัยเรื่อง ดังกล่าวมาก่อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง การแสดงออกของยีน และ โปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดภายหลังได้รับสารก่อมะเร็งอะฟลาท็อกซิน B1 (Aflatoxin B1: AFB1) โดยทดลองนำ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกของมนุษย์ (human mesenchymal stem cells derived from bone marrow) มาเป็นแบบจำลองในการศึกษาการเกิดโรคมะเร็งด้วยการใช้ AFB1 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  เมื่อเวลาผ่านไป 8, 16 และ 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและจำนวนของเซลล์ การแสดงออกของยีน Bmi-1 เปรียบเทียบกับยีน GAPDH ด้วยวิธี real-time PCR และการเปลี่ยนแปลงของ โปรตีนด้วยการตรวจหาแบบแผนโปรตีน (proteome pattern) ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF mass spectrometer จากการศึกษาพบว่า มีการแสดงออกของยีน Bmi-1 ซึ่งเป็น oncogene ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า จากเซลล์ปกติ ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}=2.07$ ) หลังจากได้รับ สารก่อมะเร็ง AFB1 ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดกำลังเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ไปเป็นเซลล์มะเร็ง แต่ยังไม่กลายเป็นเซลล์มะเร็ง จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและจำนวนของเซลล์ ส่วนการ เปลี่ยนแปลงของโปรตีนพบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 2423.79 และ 3174.93 ดาลตัน มีการเพิ่มและลดปริมาณลง แปรผันกับสภาวะของเซลล์ที่กำลังจะกลายเป็นเซลล์มะเร็งตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นแนวโน้มที่จะ สามารถใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกของมนุษย์เป็นแบบจำลองในการศึกษาการเกิดโรคมะเร็ง ทดแทนการใช้สัตว์ทดลองได้ และอาจช่วยให้ค้นพบตัวบ่งชี้ ทางพันธุกรรมและโปรตีนวิทยาในการวินิจฉัยโรคและ พยากรณ์โรค เพื่อติดตามและค้นหาผู้มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกในอนาคต (วารสารโรคมะเร็ง 2561; 38:165-176)

คำสำคัญ: การกลายพันธุ์ระดับยีน ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพระดับโมเลกุล ไขกระดูก เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล แบบแผนโปรตีน

<sup>1</sup> กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข <sup>2</sup> ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

## Detection of Morphology, Gene Expression and Protein Alterations in Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow after Exposure to Aflatoxin B1

by Sutasinee Asayut<sup>1</sup>, Danai Tiwawech<sup>1</sup>, Saowakon Sukarayodhin<sup>1</sup>, Sittiruk Roytrakul<sup>2</sup>, Janthima Jaresitthikunchai<sup>2</sup>, Somchai Thanasitthichai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Division, National Cancer Institute, Bangkok, <sup>2</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani

**Abstract** Cancer is a major public-health problem worldwide. The treatments and diagnostic techniques for early-stage cancer remain limited. Understanding the mechanisms of carcinogenesis can assist cancer control. The use of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow as a model to study environmental carcinogenesis is of interest and has never been undertaken in Thailand. Therefore, this study aimed to detect morphology, gene expression, and protein alterations, in mesenchymal stem cells from bone marrow after exposure to carcinogenic aflatoxin B1 (AFB1). In this study, concentrations of AFB1 at 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, and 100  $\mu$ M, were applied to stem cells. At 8, 16, and 24 hours post-exposure, we observed changes in morphology, number of cells, Bmi-1 gene expression relative to GAPDH by real-time PCR, and detected proteome pattern by MALDI-TOF/TOF mass spectrometer. The findings showed that the expression of the Bmi-1 oncogene, which controls cell division, increased 2-fold compared with normal cells ( $2^{-\Delta\Delta CT} = 2.07$ ) after exposure to AFB1 at 50  $\mu$ M AFB1 within 24 hours, indicating that the mesenchymal stem cells from bone marrow after exposure to carcinogenic AFB1 for 24 hours were being gradually changed into cancer cells, but not yet completely converted to cancer cells. Therefore, alterations in morphology and number of stem cells were not detected. Proteome pattern detection showed that the protein with a molecular weight of 2423.79 daltons was upregulated such that the cells were going to become cancerous, and the protein with a molecular weight of 3174.93 daltons was downregulated, such that the cells were going to become cancerous. This study demonstrated that we can use human mesenchymal stem cells from bone marrow as a model to study the mechanisms of carcinogenesis instead of laboratory animals. In addition, diagnostic and prognostic genetic and protein biomarkers may be discovered, leading to the early detection of cancers in the future. (*Thai Cancer J* 2018;38:165-176)

**Keywords:** gene mutation, molecular biomarkers, bone marrow, mesenchymal stem cell, proteome pattern

## บทนำ

การประยุกต์ใช้เซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์เป็นตัวแทนในการค้นหาสารก่อมะเร็งในสิ่งแวดล้อมเป็นแนวคิดใช้แบบจำลองที่ยังไม่มีการพัฒนามาก่อนในประเทศไทย แต่เดิมมีการใช้แบคทีเรียและสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบหาสารก่อมะเร็งเบื้องต้น ซึ่งบางครั้งไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ได้อย่างสมบูรณ์ ต่อมามีการพัฒนาสร้างแบบจำลองในหลอด

ทดลองโดยใช้เซลล์ primary hepatocytes<sup>1-3</sup> แต่เซลล์มีความแปรปรวนตามสิ่งมีชีวิตและการทำงานของเซลล์ต่ำลดลงเนื่องจากเซลล์แก่มากขึ้น และมีความยากในการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด ซึ่งมีความแตกต่างของหน้าที่และกระบวนการเมแทบอลิซึม และไม่มีคุณสมบัติของสารพันธุกรรมเป็นต้น<sup>4</sup> ดังนั้นการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากมนุษย์มาเป็นแบบจำลองในการศึกษากลไกการเกิดโรคมะเร็งจึง

น่าจะเป็นวิธีการหาคำตอบของการเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริง และน่าเชื่อถือมากที่สุด

เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษในการแบ่งตัว สามารถสร้างตัวเองขึ้นมาใหม่ได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์หรือเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ในร่างกายได้โดยมีความคล้ายคลึงกับกระบวนการ หรือกลไกในการพัฒนาตัวอ่อนและอวัยวะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต<sup>5-7</sup> เซลล์ต้นกำเนิดแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell) จากเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิส<sup>5</sup> เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย (adult stem cell) จากเลือด ไช้กระดูก ฟันน้ำนม และ ผิวหนัง เป็นต้น<sup>8-12</sup> และเซลล์ต้นกำเนิดไอพีเอสหรืออินดิวิจิวส์พลูริโพเทนท์ [induced pluripotent stem (iPS) cells] เป็นเซลล์โตเต็มวัยที่ถูกเปลี่ยนกลับ (reprogramming) ให้มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน<sup>13</sup>

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลมักถูกใช้เป็นตัวนำพาหรือสารเคมีเข้าสู่เซลล์ หรืออวัยวะเพื่อการรักษา ฟันพุ หรือบรรเทาอาการเจ็บป่วย ในหนูที่ถูกใช้แบบจำลองของโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในผู้ป่วยเอดส์พบว่า เมื่อฉีดเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่สกัดได้จากไขกระดูกของมนุษย์เข้าสู่ก้อนมะเร็ง สามารถทำให้ก้อนมะเร็งมีขนาดและจำนวนลดลง<sup>14</sup> มีรายงานว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่สกัดได้จากสายสะดือของหนูสามารถทำให้หนูหายจากการเป็นมะเร็งเต้านม และไม่มีการแพร่กระจายของมะเร็ง<sup>15</sup> โดยให้ผลเช่นเดียวกับการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่สกัดได้จากสายสะดือของมนุษย์เข้าในหนูที่เป็น

มะเร็งเต้านม<sup>16</sup> นอกจากนี้สารสกัดเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลซึ่งถูกสกัดจาก Wharton's jelly จากสายสะดือของมนุษย์สามารถทำให้เซลล์มะเร็งชนิด carcinoma ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งรังไข่ และเซลล์มะเร็งปอด มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หยุดการเจริญเติบโต และลดการแพร่กระจายของมะเร็งในหลอดทดลองได้<sup>17</sup> และในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดดังกล่าวมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย (pro-apoptotic) และการหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (tumor suppressor) ในระดับที่สูง<sup>18</sup>

ในการศึกษาการเกิดมะเร็งตับโดยใช้สารก่อมะเร็ง diethylnitrosamine (DEN, 200 mg./kg.) ในหนูแรท พบว่าหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง 24 ชม. ตรวจพบสารบ่งชี้การเกิดมะเร็งระยะเริ่มแรกที่มีชื่อว่า glutathione s-transferase placenta form (GST-P) ในเซลล์ตับเพียงหนึ่งเซลล์กระจายอยู่ระหว่างเซลล์ตับปกติอื่นๆ ซึ่งแสดงว่าสารดังกล่าวน่าจะมีฤทธิ์ในการก่อมะเร็งตับจากเซลล์ต้นกำเนิดของตับได้<sup>19</sup> ซึ่งกลายมาเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยที่นำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้เป็นต้นแบบจำลองทดแทนการใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบสารก่อมะเร็ง

อะฟลาท็อกซินเป็นสารพิษของเชื้อราในตระกูล *Aspergillus spp.* เป็นสารพิษที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุล หรือเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของเชื้อรา มีคุณสมบัติทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อคน สัตว์ และพืช<sup>20</sup> องค์การอนามัยโลกจัดให้อะฟลาท็อกซินเป็นสารก่อมะเร็งที่ร้ายแรงมากที่สุดชนิดหนึ่ง ปริมาณของอะฟลาท็อกซิน 1 µg สามารถ

ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย และทำให้เกิด มะเร็งในสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับอย่างต่อเนื่อง โรคใน มนุษย์ที่เกิดจากสารอะฟลาท็อกซิน ได้แก่ มะเร็งตับ ตับอักเสบ ตับแข็ง และสมองอักเสบ

อะฟลาท็อกซิน B1 (AFB1) จัดเป็นอะฟลาท็อกซิน ชนิดหนึ่งใน 4 ชนิด ได้แก่ B1, B2, G1 และ G2 เมื่อ AFB1 เข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนในไซโตซอลเป็น aflatoxicol ส่วนในไมโทคอนไดรียจะถูกเปลี่ยนเป็นชนิด M1, P1, Q1 และ epoxide มีรายงานว่า AFB1 exo-8, 9-epoxide มีความไวมาก และมีคุณสมบัติเป็น electrophiles สามารถรวมตัวกับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น DNA, RNA และโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว โดยจับกับ บริเวณ nucleophilic sites ในโครงสร้างเกิด DNA adducts และ albumin adducts ตามลำดับ โดย กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เมื่อรวมตัวกันแล้ว ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอผิดปกติ โดยถูกเร่งหรือ ควบคุมโดย cytochrome P450 และ cytochrome B5 ของกระบวนการ mixed function monooxygenase ในไมโทคอนไดรีย ทำให้หน้าที่ทางชีวภาพของดีเอ็นเอมีการ เปลี่ยนแปลง และทำให้เอนไซม์ nucleic acid polymerase ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ส่งผลให้การสังเคราะห์ โปรตีนต่าง ๆ หยุดชะงักลง<sup>21</sup>

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกเป็น แบบจำลองในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่าง จำนวน ยีน และโปรตีนที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับสาร ก่อมะเร็ง AFB1 ซึ่งน่าจะเป็นการสร้างความรู้ใหม่ ที่จะนำไปสู่การค้นพบสาเหตุ และกลไกของการเกิดโรค มะเร็ง ตลอดจนการค้นหาวิธีป้องกันและรักษาโรค

มะเร็งที่มีประสิทธิภาพต่อไปได้

## วัสดุและวิธีการ

### กลุ่มตัวอย่าง

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก hMSC-BM-c (Promocell, Germany)เพาะเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเซลล์ mesenchymal stem cell growth medium 2 (Promocell, Germany) และ 1% penicillin 10,000 Units/ml - streptomycin 10,000 µg/ml (Gibco, USA) ที่ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub> แบ่งเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มที่ไม่ได้รับสารก่อมะเร็ง AFB1 (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มที่ได้รับ AFB1 (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 0.03125 mg/ml (25 µM), 0.0625 mg/ml (50 µM) และ 0.125 mg/ml (100 µM) ตามลำดับ

### การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและ จำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด

วิธีการเริ่มด้วยการเลี้ยงเซลล์ในขวดขนาด 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Denmark) 200,000 เซลล์ต่อขวด ในอาหารปริมาณ 7 ml เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึงเริ่ม ทดสอบด้วยสาร AFB1 (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 µM เป็นเวลา 8, 16 และ 24 ชม. ตามลำดับ สังเกตเซลล์ภายใต้กล้อง EVOS<sup>®</sup> XL Core Imaging System (Life Technology, USA) ทำการ จดบันทึก ถ่ายรูป และนับจำนวนเซลล์แต่ละกลุ่ม โดยทำการเก็บเซลล์ด้วยการเติม StemPro<sup>®</sup> Accutase<sup>®</sup> Cell Dissociation Reagent (Gibco, USA) 5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 2100 g นาน 10 นาที และ

ย้อมเซลล์ด้วย 0.4% trypan blue stain (Gibco, USA) โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ C-Chip (INCYTO, Korea) ในการนับเซลล์ แล้วเก็บเซลล์ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปสกัด RNA ต่อไป

### การสกัด RNA จากเซลล์ต้นกำเนิด

ผู้วิจัยนำเซลล์ต้นกำเนิดมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด QuickGene RNA cultured cell HC kit S (RC-S2, KURABO, Japan) โดยนำตะกอนเซลล์หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ 100  $\mu\text{l}$  ผสมกับ LRP-01 600  $\mu\text{l}$  และ 2-ME (BDH) 6  $\mu\text{l}$  แล้วเติม SRP-01 100  $\mu\text{l}$  และ absolute ethanol 300  $\mu\text{l}$  ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน cartridges (CA-01) ของเครื่อง nucleic acid isolation system quickgene-810 (Fujifilm, Japan) เลือกโหมด RNA CELL (without DNase treatment)

### การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA

ผู้วิจัยนำ RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) ดูด RNA 5  $\mu\text{l}$  ใส่ในส่วนผสมของ 50 ng/ $\mu\text{l}$  random hexamers 1  $\mu\text{l}$ , 10 mM dNTP mix 1  $\mu\text{l}$  และ DEPC-treated water 3  $\mu\text{l}$  บ่ม  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาที และ  $-20^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที หลังจากนั้นเติม cDNA Synthesis Mix 10  $\mu\text{l}$  (10x RT buffer 2  $\mu\text{l}$ , 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu\text{l}$  และ 0.1 M DTT 2  $\mu\text{l}$ , 40 U/ $\mu\text{l}$  RNaseOUT<sup>™</sup> 1  $\mu\text{l}$  และ 200 U/ $\mu\text{l}$  SuperScript<sup>®</sup> III RT 1  $\mu\text{l}$ ) บ่มที่  $25^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที  $50^{\circ}\text{C}$  นาน 50 นาที  $85^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาที และ  $0^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที แล้วเติม 2 U/ $\mu\text{l}$  *E. coli* RNase H 1  $\mu\text{l}$  บ่ม  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 20 นาที นำไปเก็บ

ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปใช้

### การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Bmi-1 ด้วยวิธี Real-Time PCR

การตรวจสอบเริ่มโดยใช้ cDNA ที่ได้มาเป็น DNA ต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ยีนมะเร็ง Bmi-1 และ GAPDH เป็นตัวควบคุม โดยยีน Bmi-1 มีค่า T<sub>m</sub> ที่  $83^{\circ}\text{C}$  และยีน GAPDH มีค่า T<sub>m</sub> ที่  $88^{\circ}\text{C}$  ก่อนทำการเริ่มปฏิกิริยาต้องปรับความเข้มข้นของ cDNA ในแต่ละตัวอย่างให้มีความใกล้เคียงกัน โดยคำนวณจากความเข้มข้นของ RNA เริ่มต้น ใช้ไพรเมอร์ดังนี้ forward Bmi-1: 5' TGGAGAAGGAATGGTCCA CTTC-3', reverse Bmi-1: 5' GTGAGGAACTG TGGATGAGGA-3', forward GAPDH: 5'-ACCACA GTCCATGCCATCAC-3' และ reverse GAPDH: 5'-ACACGGAAGGCCATGCCAGTG-3' เริ่มปฏิกิริยาด้วย SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) 10  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{M}$  forward และ reverse primers ชนิดละ 0.4  $\mu\text{l}$ , cDNA template 2  $\mu\text{l}$  และ double distilled water 7.2  $\mu\text{l}$  เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) โดยใช้โปรแกรมดังนี้  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที 40 รอบของ  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 15 วินาที  $58^{\circ}\text{C}$  นาน 15 วินาที  $70^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 15 วินาที และ  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 15 วินาที  $60^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที และ  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 15 วินาที แล้วนำค่า CT ที่ได้จากเครื่องมาวิเคราะห์คำนวณหาระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (fold change;  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) โดยใช้สูตร  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Bmi-1}_{\text{กลุ่มทดสอบ}} - \text{GAPDH}_{\text{กลุ่มทดสอบ}}) - \Delta C_T$

(Bmi-1<sub>กลุ่มควบคุม</sub> - GAPDH<sub>กลุ่มควบคุม</sub>)

### การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนโดย การตรวจหา proteome pattern

วิธีการตรวจเริ่มต้นด้วยการเลี้ยงเซลล์ 700,000 เซลล์ต่อขวดในอาหาร 7 ml ทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1 ตามความเข้มข้น ระยะเวลา และทำการเก็บเซลล์เหมือนการทดลองข้างต้น นำเซลล์ออกจากตู้ - 80°ซ วางให้ละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที นำเซลล์หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้หลังการทดสอบ 150  $\mu$ l ผสมกับ sterilized deionized water 300  $\mu$ l ปิเปตลงใน sample reservoir (Nanosep Centrifuge Device 10K, PALL, USA) ปั่น 10,000 g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธี speed vac ที่อุณหภูมิห้อง จนเหลือปริมาตร 30  $\mu$ l แล้ววัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry assay และปรับให้มีความเข้มข้น 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l ด้วย 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, Sigma, USA) นำไปผสมกับสาร CHCA matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma, USA) 10 mg และ 0.1% trifluoroacetic acid/100% acetonitrile (J.T. Baker, USA) 1 ml ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปหยดลงบนแผ่นโลหะ MALDI target plate รอให้ระเหยเป็นผลึกที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที นำ MALDI target plate ใส่ในเครื่อง Ultraflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; MALDI, FlexControl version 3.0, Bruker GmbH, Germany) และตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry ด้วย mass analyzer ชนิด

Time-of-Flight (TOF) ในช่วงระหว่าง 1-10 kDa (Linear mode, Mass suppression 900 Da) ทำการสอบเทียบและจัดรายการมวลสารด้วยโปรแกรม FlexAnalysis version 3.0 (Bruker GmbH, Germany) โดยใช้ peptide and protein calibration kit (MSCAL1, Sigma, USA) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ClinProTools version 2.2 (build 78) (Bruker GmbH, Germany) โดยแสดงผลเป็นกราฟที่ plot ระหว่างค่ามวลต่อประจุ (m/z:mass-to-charge ratio) ซึ่งก็คือมวลโมเลกุลของโปรตีนกับค่า intensity (Arbitrary Unit) แสดงถึงปริมาณของโปรตีนที่ตรวจพบ

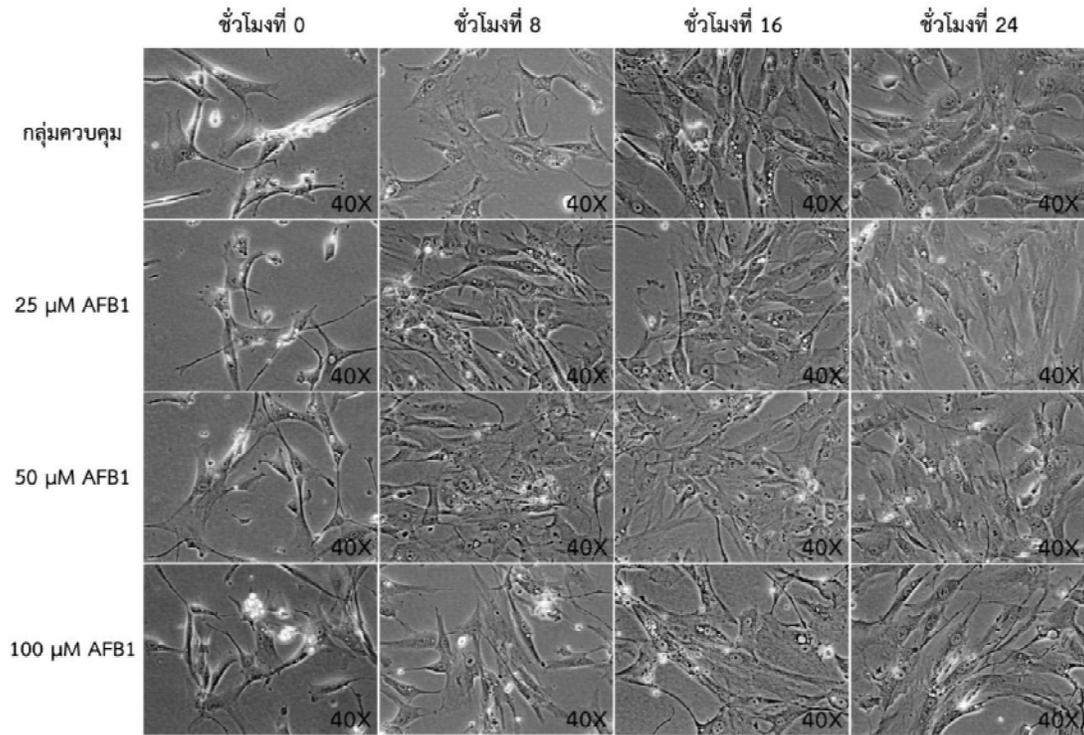
### การวิเคราะห์ข้อมูล

การแสดงผลของยีน Bmi-1 และ pattern ของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง วิเคราะห์ทางสถิติด้วยการแสดงเป็นกราฟเพื่อเปรียบเทียบ

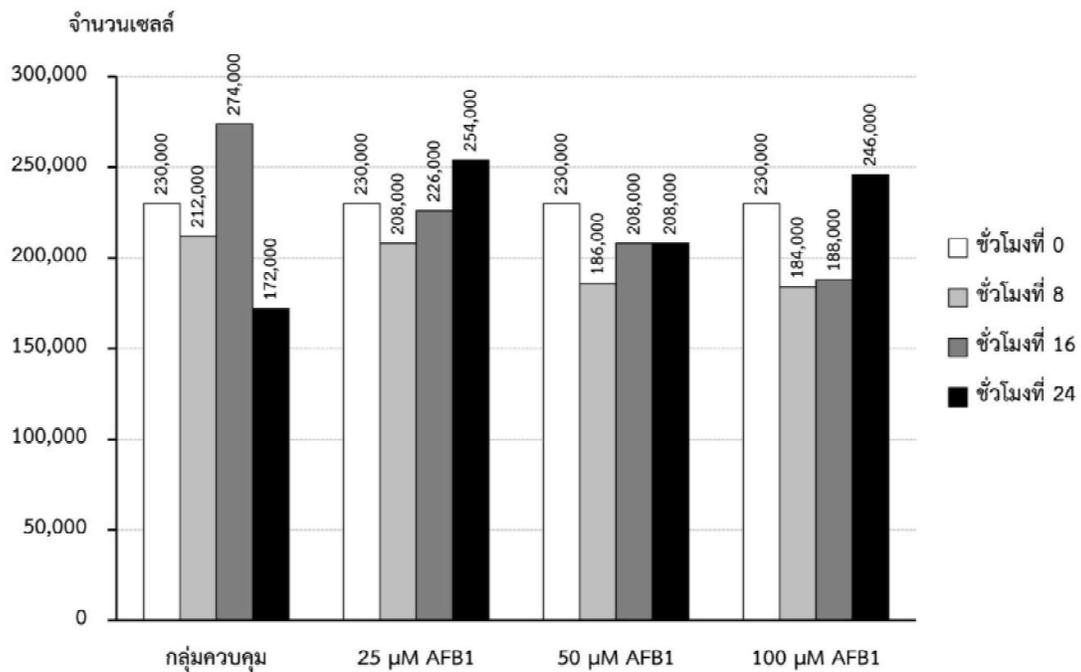
### ผลการศึกษา

จากการศึกษารูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ออกจากไขกระดูก 200,000 เซลล์ หลังจากได้รับสารก่อมะเร็ง AFB1 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100  $\mu$ M และกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร AFB1) เมื่อเวลาผ่านไป 8, 16 และ 24 ชม. พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ดังรูปที่ 1 ส่วนจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อได้รับสารก่อมะเร็ง AFB1 ทำให้เซลล์ตายจำนวนหนึ่ง หลังจากนั้นมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มดังรูปที่ 2

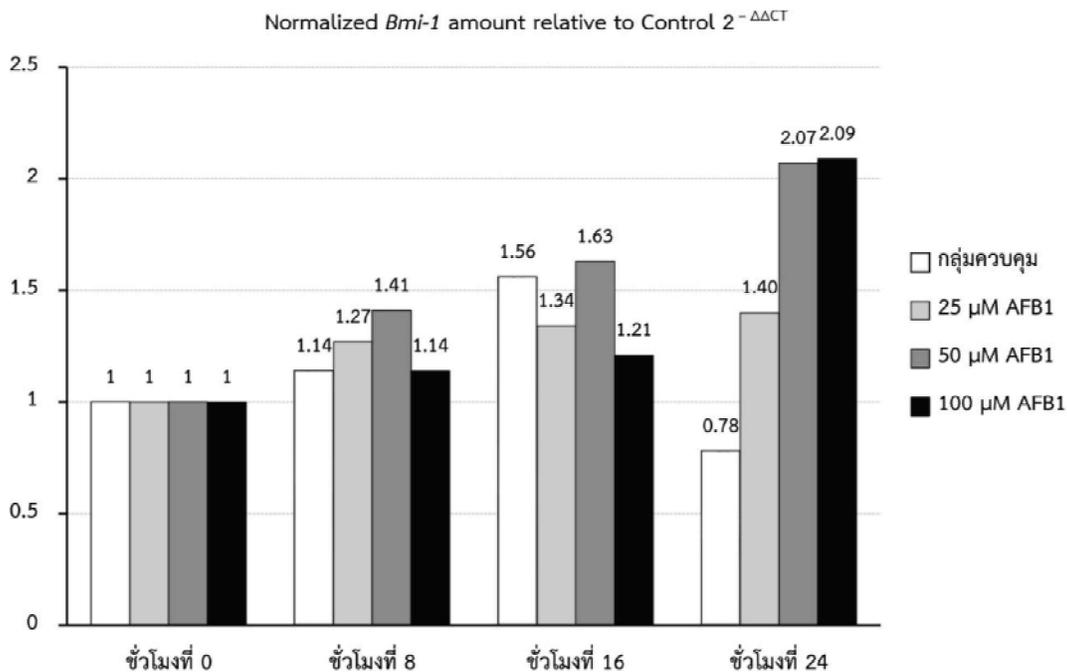
ผลการศึกษาการแสดงผลของยีน Bmi-1 ซึ่งเป็นยีนแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าหลังจาก



รูปที่ 1 เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกภายหลังทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1 (กำลังขยาย 40X)



รูปที่ 2 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกภายหลังทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1



รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *Bmi-1* ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกหลังทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  เทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาต่าง ๆ

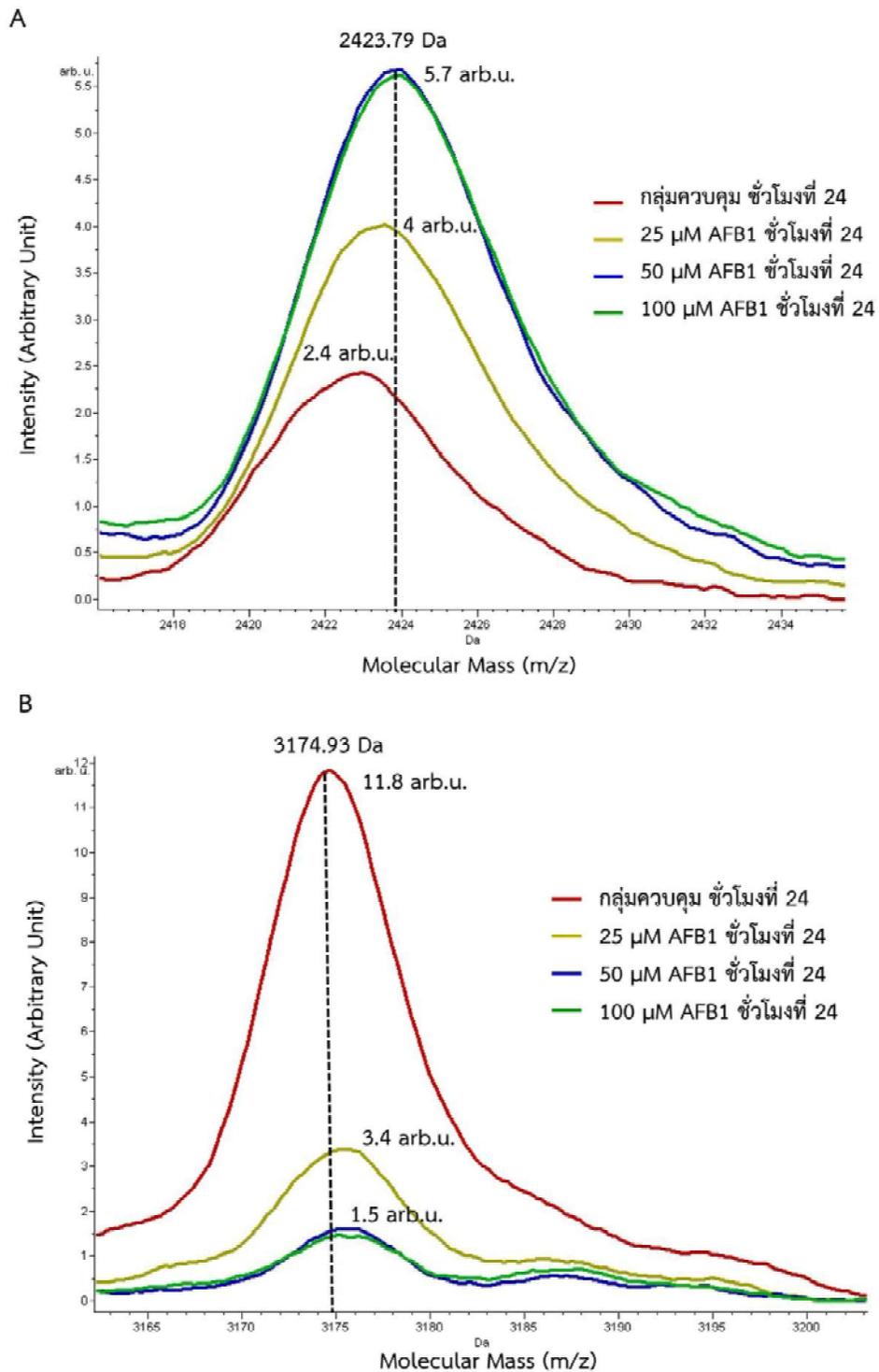
ทดสอบเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1 ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมีการแสดงออกของยีน *Bmi-1* เพิ่มขึ้นจากเซลล์ปกติหรือกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร AFB1) จนมีค่าการแสดงออกของยีน *Bmi-1* เป็น 2 เท่าของเซลล์ปกติที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  AFB1 และ 100  $\mu\text{M}$  AFB1 ในชั่วโมงที่ 24 ดังรูปที่ 3

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกหลังทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1 ที่ชั่วโมงที่ 24 พบโปรตีน 2 ชนิดที่มีมวลโมเลกุล 2423.79 ดาลตัน และ 3174.93 ดาลตันมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร AFB1) โดยโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 2423.79 ดาลตันมีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ AFB1 ที่มากขึ้น โดยที่ 25  $\mu\text{M}$  AFB1

มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 1.67 เท่า และที่ 50  $\mu\text{M}$  AFB1 กับ 100  $\mu\text{M}$  AFB1 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 2.37 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร AFB1) ดังรูปที่ 4A ส่วนโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 3174.93 ดาลตันมีการลดปริมาณลงเมื่อความเข้มข้นของ AFB1 สูงขึ้น โดยที่ 25  $\mu\text{M}$  AFB1 มีปริมาณโปรตีนลดลง 3.47 เท่า และที่ 50  $\mu\text{M}$  AFB1 กับ 100  $\mu\text{M}$  AFB1 มีปริมาณโปรตีนลดลง 7.87 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร AFB1) ดังรูปที่ 4B

## วิจารณ์และสรุป

การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างการแสดงออกของยีน และโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดภายหลังได้รับสารก่อมะเร็ง AFB1 เมื่อเวลาผ่านไป 8,



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 2423.79 ดาลตัน (A) และ 3174.93 ดาลตัน (B) ในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ออกจากไขกระดูกหลังทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง AFB1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ ชั่วโมงที่ 24

16 และ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  AFB1 พบว่ามีการแสดงออกของยีน Bmi-1 ซึ่งเป็น oncogene ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ที่สูงขึ้นเป็น 2 เท่าจากเซลล์ปกติ โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบเซลล์ คือ อย่างน้อย 24 ชั่วโมงขึ้นไป จึงจะสามารถเห็นแนวโน้มความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน Bmi-1 กับความเข้มข้นของสารก่อมะเร็ง AFB1 ได้อย่างชัดเจน และความเข้มข้น ของสารก่อมะเร็งที่เหมาะสมในการทดสอบเซลล์คือ 50  $\mu\text{M}$  AFB1 เนื่องจากให้ค่าการแสดงออกของยีน Bmi-1 เพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับขั้น

ทั้งนี้เซลล์ต้นกำเนิดภายหลังได้รับสารก่อมะเร็ง AFB1 กำลังเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยเริ่มมีแสดงออกของยีนมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 เท่าจากเซลล์ปกติ แต่ยังไม่เป็นเซลล์มะเร็ง จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ ดังนั้นควรเพิ่มเวลาที่ใช้ในการทดสอบให้มากกว่า 24 ชั่วโมง เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เมื่อเซลล์ได้กลายพันธุ์ไปเป็นเซลล์มะเร็งแล้ว

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูก พบโปรตีนในเซลล์ที่มีมวลโมเลกุล 2423.79 ดาลตันมีการเพิ่มปริมาณแปรผันตรงกับระยะของเซลล์ที่กำลังจะกลายเป็นมะเร็ง ส่วนโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 3174.93 ดาลตันมีการลดปริมาณลงแปรผกผันกับระยะของเซลล์ที่กำลังจะกลายเป็นเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำโปรตีนทั้งสองไปวิเคราะห์ต่อในเครื่อง liquid chromatography-mass spectrometer (LC/MS) เพื่อหาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนทั้งสองต่อไป

ซึ่งอาจใช้โปรตีนทั้งสองชนิดดังกล่าวในการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งจากการสืบค้นข้อมูลในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง การแสดงออกของยีน และโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดหลังได้รับสารก่อมะเร็ง AFB1 มาก่อน แต่พบว่าส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากเลือดที่มาจากสายรกเด็ก (human umbilical cord blood: UCB) มาทดสอบด้วย AFB1 เพื่อศึกษาปริมาณและระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบที่ส่งผลต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability)<sup>23</sup> และความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damages)<sup>24</sup>

โดยสรุปผลจากการศึกษานี้พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะสามารถใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกของมนุษย์เป็นแบบจำลองในการศึกษากลไกการเกิดโรคมะเร็งทดแทนการใช้สัตว์ทดลองได้ และอาจช่วยให้นักค้นพบตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมและโปรตีนวิทยาในการวินิจฉัยโรคและพยากรณ์โรค เพื่อติดตามและค้นหาผู้มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี พ.ศ. 2559 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.สุวีพร นวลแก้ว มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษาในขั้นตอนการทดสอบเซลล์ต้นกำเนิดและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Bmi-1 บริษัทไอชายนนท์เทคโนโลยี จำกัดที่เอื้อเฟื้อเครื่อง MaestroNano Spectropho-

meter ในการวัดความเข้มข้นของ RNA และดร.สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ให้คำแนะนำในการเขียนบทความนี้

### เอกสารอ้างอิง

- Guillouzo A, Morel F, Fardel O, Meunier B. Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 1993;82:209-19.
- Kafert-Kasting S, Alexandrova K, Barthold M, Laube B, Friedrich G, Arseniev L, et al. Enzyme induction in cryopreserved human hepatocyte cultures. *Toxicology* 2006;220:117-25.
- Ratanasavanh D, Baffet G, Latinier MF, Rissel M, Guillouzo A. Use of hepatocyte co-cultures in the assessment of drug toxicity from chronic exposure. *Xenobiotica* 1988;18:765-71.
- Kang SJ, Jeong SH, Kim EJ, Cho JH, Park YI, Park SW, et al. Evaluation of hepatotoxicity of chemicals using hepatic progenitor and hepatocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells : Effect of chemicals on ESC-derived hepatocyte differentiation. *Cell Biol Toxicol* 2013;29:1-11.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- Mitalipov S, Kuo HC, Byrne J, Clepper L, Meisner L, Johnson J, et al. Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2006;24:2177-86.
- Sritanadomchai H, Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, Kupradinun P, Mitalipov S, Kusamran T. Characterization and multilineage differentiation of embryonic stem cells derived from a buffalo parthenogenetic embryo. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1295-302.
- Fliedner TM, Calvo W, Körbling M, Nothdurft W, Pflieger H, Ross W. Collection, storage and transfusion of blood stem cells for the treatment of hemopoietic failure. *Blood Cells* 1979;5:313-28.
- Harrison DE. Long-term erythropoietic repopulating ability of old, young, and fetal stem cells. *J Exp Med* 1983;157:1496-504.
- Huang S, Lu G, Wu Y, Jirigala E, Xu Y, Ma K, et al. Mesenchymal stem cells delivered in a microsphere-based engineered skin contribute to cutaneous wound healing and sweat gland repair. *J Dermatol Sci* 2012;66:29-36.
- Lee SY, Huang GW, Shiung JN, Huang YH, Jeng JH, Kuo TF, et al. Magnetic Cryopreservation for Dental Pulp Stem Cells. *Cells Tissues Organs* 2012;196:23-33.
- Singh A, Park H, Kangsamaksin T, Singh A, Readio N, Morris RJ. Keratinocyte Stem Cells and the Targets for Nonmelanoma Skin Cancer. *Photochem Photobiol* 2012;88:1099-110.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
- Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006;203:1235-47.
- Ganta C, Chiyo D, Ayuzawa R, Rachakatla R, Pyle M, Andrews G, et al. Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. *Cancer Res* 2009;69:1815-20.
- Ayuzawa R, Doi C, Rachakatla RS, Pyle MM, Maurya DK, Troyer D, et al. Naïve human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2009;280:31-7.
- Gauthaman K, Yee FC, Cheyyatraivendran S, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth in vitro. *J Cell Biochem* 2012;113:2027-39.
- Fong CY, Subramanian A, Biswas A, Gauthaman K, Srikanth P, Hande MP, et al. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online* 2010;21:391-401.
- Hasegawa R, Tiwawech D, Hirose M, Takaba K, Hoshiya T, Shirai T, et al. Suppression of diethylnitrosamine-initiated preneoplastic foci development in the rat liver by combined administration of four antioxidants at low doses. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83:431-7.
- บดินทร์ บุตรอินทร์. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน (Mycotoxin Aflatoxin). *วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่* 2555;45:1-8.

21. Martins ML and Martins HM. Aflatoxin M (1) in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol* 2004; 91:315-7.
22. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001;25:402-8.
23. Ghaderia M, Allamehb A, Soleimanib M, Forouzan-dehb M. Assessing the cytotoxic effects of Aflatoxin B1 in mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Clin Biochem* 2011; 44:S358.
24. Ghaderi M, Allameh A, Soleimani M, Rastegar H, Ahmadi-Ashtiani HR. A comparison of DNA damage induced by aflatoxin B1 in hepatocyte-like cells, their progenitor mesenchymal stem cells and CD34(+) cells isolated from umbilical cord blood. *Mutat Res* 2011;719:14-20.