

การผลิต

โมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ

ต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิดเฮพาโต เซลลูลาร์ คาร์ซิโนมา

Production of **monoclonal antibody** specific to surface antigen on hepatocellular carcinoma cell lines

ปวเรศ อ่อนทอง¹

Pawaraid On-Tong¹

ปริยานาท วงศ์จันทร์¹

Preeyanat Vongchan¹

¹ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

มะเร็งตับถูกจัดให้เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับ 5 ของโลก และมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนขึ้นทุกปี มะเร็งตับชนิดเฮพาโตเซลลูลาร์ คาร์ซิโนมา (HCC) เป็นมะเร็งที่รุนแรงที่สุด เมื่อใดที่มีอาการแสดงออกหมายถึงการพยากรณ์ของโรคที่เลวลง ผู้ป่วยมักเสียชีวิตภายในไม่กี่เดือนหลังตรวจพบก้อน โดยทั่วไปสามารถใช้การตรวจคัดกรองด้วยระดับ AFP ที่สูงขึ้น แต่พบว่ามี ความจำเพาะต่ำ ดังนั้นการตรวจวัดระดับ AFP อย่างเดียวจึงไม่เพียงพอและอาจต้องอาศัยการสร้างภาพทางรังสีวิทยาช่วยร่วมด้วย สำหรับการวินิจฉัย ยังคงต้องอาศัยการดูชิ้นเนื้อ งานวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ มะเร็งตับชนิด HCC เพื่อให้เป็นทางเลือกเพิ่มเติมสำหรับโมเลกุลจำเพาะสำหรับช่วยวินิจฉัย HCC โดยฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ด้วยเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 ที่ทำให้หมดสภาพแล้ว ตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีในซีรัมของสัตว์ทดลองด้วยวิธี indirect immunofluorescence แล้วผลิตเซลล์ลูกผสมด้วยวิธีมาตรฐานและตรวจสอบแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ลูกผสมด้วยวิธีเดียวกับการตรวจกรองแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลอง จากการทดลองพบว่า ได้เซลล์ลูกผสมที่เป็นผลจากการเชื่อมเซลล์ มัยอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 กับเซลล์ม้ามของหนูทดลอง 110 โคลน คิดเป็นร้อยละ 22.9 และมีเซลล์ลูกผสมที่สร้าง แอนติบอดีที่ต้องการ (anti-HepG2) จำนวน 38 โคลนคิดเป็นร้อยละ 7.9 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Indirect immunofluorescent กับ HepG2 ในสองสถานะคือ สถานะที่เซลล์กระจายตัวอิสระในตัวกลางและสถานะที่เกาะติดบนพื้นผิว จากการศึกษาพบว่าเซลล์ ลูกผสมทุกโคลนสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HepG2 ทั้งในสถานะหรือเกาะติดพื้นผิว ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าสามารถ ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด HCC ได้ตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะได้มี การพัฒนาต่อเพื่อใช้สำหรับการทดสอบเพื่อระบุชนิดของเซลล์มะเร็งตับชนิด HCC ด้วยวิธี immunohistochemistry ต่อไป

คำรหัส: เฮพาโตเซลลูลาร์ คาร์ซิโนมา มะเร็งตับ สารบ่งชี้มะเร็ง โมโนโคลนอล แอนติบอดี

Abstract

Liver cancer ranks fifth in frequency in the world and this disease tends to increase every year. HCC is a type of liver cancer which is the most severe. When there are signs and symptoms, it means poor prognosis. Patients always die within a few months after detecting the nodules. In general, HCC is diagnosed as high level of AFP. However, because of its low specificity, expensive radiologic imaging is included as confirmatory test. Diagnosis of HCC still relies on liver biopsy. The objective of this study was to produce monoclonal antibody specific to surface molecule on HCC cells in order to apply as another tumor specific marker for diagnosis of HCC. BALB/c mouse was immunized i.p. weekly with cold inactivated HepG2 cells. The rising of antibody was determined by indirect immunofluorescent technique using HepG2 cells as source of antigens. Immunized mouse's spleen cells were fused with myeloma cells (X63Ag8.653) by standard hybridoma technology and limiting dilution. Cell culture supernatant from hybrid clones were investigated for anti-HepG2 cells antibody by indirect immunofluorescent technique and analyzed by flow cytometry. One hundred and ten hybrid cells (22.9%) were obtained with 38 clones (7.9%) produced anti-HepG2 antibodies as investigated by indirect immunofluorescent technique. All tested clones could react with HepG2 both in suspension and adherent condition suggesting that they could be applied to use in immunohistochemistry technique as objected. The obtained monoclonal antibodies will be further on investigated for their specificity to tumor antigen or tumor associated antigen.

Keywords : Hepatocellular carcinoma, liver cancer, tumor marker, monoclonal antibody

บทนำ

มะเร็งตับถูกจัดให้เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับที่ 5 ของโลก มีรายงานผู้ป่วยใหม่จำนวน 437,000 ราย ในปี 2553 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ประเทศกำลังพัฒนามีอุบัติการณ์สูงกว่าประเทศในกลุ่มซีกโลกตะวันตก โดยเฉพาะประชากรในแถบเอเชียตะวันออก มีความสัมพันธ์กับอายุและเพศ โดยมีค่า Age-adjusted incidence rates (AAIRs) สำหรับคนไทย 27.6-36.6 ต่อประชากรชายหนึ่งแสนคนในประเทศแถบอัฟริกา กลางและอัฟริกาตะวันตกมีค่า AAIRs 20.8-38.1 และ 30.0-48.0 ตามลำดับ พบน้อยในตอนเหนือของยุโรป ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ รวมถึงอเมริกาเหนือและลาตินอเมริกา (5.0 ต่อประชากรชายหนึ่งแสนคน) ผู้ชายเป็นมากกว่าผู้หญิงในอัตราส่วน 1.5-3.0:1¹⁻⁴ ความแตกต่างของอุบัติการณ์ในแต่ละพื้นที่ภูมิศาสตร์แสดงให้เห็นว่าสิ่งแวดล้อม คือปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ เช่น ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การสัมผัสเชื้อหรือได้รับสารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหาร การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์และการใช้ยาคุมกำเนิดชนิดรับประทาน มีการประมาณการณ์ว่านับตั้งแต่ พ.ศ. 2543 มะเร็งตับจะยังคงเป็นอันดับที่ 5 ของชนิดมะเร็งที่พบมากที่สุดในประเทศชายและอันดับที่ 8 ในเพศหญิง โดยคิดเป็นผู้ป่วยใหม่เพศชายจำนวน 564,000 รายต่อปี และเพศหญิง 166,000 รายที่น่าสนใจคือ พบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 20 ปีมากขึ้นในประชากร ของประเทศกลุ่มเสี่ยง

และในผู้ที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี สำหรับประเทศพัฒนา โดยยังคงพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 2-4 เท่า โดยมีสาเหตุหลักจากปัจจัยเสี่ยงที่ทราบกันแล้ว เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ได้รับสารอะฟลาทอกซิน การดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ เป็นต้น⁵⁻⁸

ทั่วโลกมีอัตราการตายจาก Hepatocellular carcinoma (HCC) ประมาณ 1 ล้านคนต่อปี ในขณะที่ชาวเอเชียมีอุบัติการณ์สูงที่สุดคือมากกว่า 30 ในหนึ่งแสนคนต่อปี 8 ในประเทศไทยพบสถิติการป่วยเป็นมะเร็งตับของคนไทยเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วมาก ในแต่ละชั่วโมงมีผู้ชายไทยป่วยเป็นมะเร็งตับ 1 คน และทุกๆ 3 ชั่วโมงมีผู้หญิงไทยป่วยเป็นมะเร็งตับ 1 คน หรือเฉลี่ยในแต่ละวันจะมีคนไทยป่วยเป็นมะเร็งตับมากกว่า 30 คน⁹ มะเร็งตับจึงเป็นโรคที่ทำให้ผู้ชายไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศต่างๆ พบว่าคนไทยมีอัตราการเป็นมะเร็งตับในอันดับต้นๆ ของโลก สาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มักพบหรือแสดงอาการในระยะท้ายของโรค จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการรณรงค์ให้มีการตรวจกรองเบื้องต้นเพื่อให้ตรวจพบได้เร็วและช่วยยืดอายุของผู้ป่วย ปัญหาหลักสองประการในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC คือ พยาธิสภาพจากมะเร็งเองและพยาธิสภาพจากโรคของตับที่แทรกซ้อนเพิ่มเติม การขยายตัวของก้อนมะเร็งและการทำงานของ

ตับที่ผิดปกติทำให้เกิดข้อจำกัดของทางเลือกในการให้การ รักษาของแพทย์การผ่าตัดจึงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดอย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีตำแหน่งและขนาดของก้อนมะเร็งที่ทำให้ไม่สามารถผ่าตัด ได้การรักษาวิธีอื่นร่วมด้วย เช่น Trans-arterial chemoembolization, percutaneous ethanol injection และ radiofrequency ablation เป็นต้น สำหรับผู้ป่วยที่มีก้อนมะเร็ง ขนาดเล็กกว่า 5 ซม. และการทำงานของตับไม่ดี การรักษาโดย ปลุกถ่ายตับเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับแพทย์¹⁰⁻¹¹

มะเร็งตับแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะของเนื้อเยื่อ ได้แก่ Hepatocellular carcinoma (HCC) ซึ่งเป็นมะเร็งของ เซลล์ตับ โดยตรงและ Cholangiocarcinoma ซึ่งเป็นมะเร็งของ ท่อน้ำดี ชนิดแรกมีปัจจัยเสี่ยงจากไวรัสตับอักเสบบี สารอะฟลา- ทอกซิน การสูบบุหรี่และการดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนชนิดหลังพบ น้อยในคนตะวันตก แต่พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทย กว่า 60% พบในแถบอีสานและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เกิดจากการติดพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis* ซึ่งพบชุกชุมในพื้นที่ดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นเสริม เช่น พันธุกรรม ปัจจัยร่วมจาก สิ่งแวดล้อม พฤติกรรมการใช้ชีวิตของคนชนบท เป็นต้น

มะเร็งตับเป็นโรคที่พบบ่อยและทำให้เสียชีวิต เมื่อใดที่มี อาการแสดงออก หมายถึงการพยากรณ์ของโรคที่เลวลง ผู้ป่วย มักเสียชีวิต ภายในไม่กี่เดือนหลังตรวจพบก้อน โดยทั่วไปการ ตรวจวินิจฉัยอาศัยระดับ α -fetoprotein (AFP) ที่สูงขึ้น อย่างไร ก็ตามประมาณ 40-60% ของผู้ป่วยเท่านั้นที่พบว่าเป็นมะเร็ง ตับและมีระดับ AFP สูงขึ้น ดังนั้น การตรวจวัดระดับ AFP เพียง อย่างเดียวจึงไม่เพียงพอ นอกจากการวัด AFP แล้วยังมีวิธี ตรวจอื่นร่วมด้วยเช่น ultrasound, CT scan, Angiography และ Laparoscopy ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และช่วยยืนยันได้ในสภาวะที่ ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ ซึ่งหมายถึงระยะสุดท้ายของโรคและ อาจไม่สามารถช่วยผู้ป่วยได้ทัน¹² การตรวจวินิจฉัยมะเร็งตับ นอกจากตรวจวัดระดับสารบ่งชี้มะเร็งที่นิยมใช้ได้แก่ AFP และ Fucosylated AFP หรืออีกชื่อหนึ่งคือ AFPL3 ในกระแสเลือด แล้วยังมีการศึกษาและค้นคว้าโมเลกุลชนิดใหม่ๆ ที่มีจำเพาะ ต่อมะเร็งตับมากขึ้น เช่น GP73 และ des-gamma-carboxy- prothrombin (DCP) DCP มีความจำเพาะมากกว่า AFP และ สามารถพยากรณ์มะเร็งตับได้ถูกต้องถึง 90% อย่างไรก็ตาม สารบ่งชี้มะเร็งหลายชนิดที่ตรวจพบในมะเร็งตับมีการเปลี่ยนแปลงและไม่แน่นอน กล่าวคือ โมเลกุลชนิดเดียวกันอาจสูงขึ้น ในผู้ป่วยบางราย แต่เป็นปกติ หรือต่ำลงในผู้ป่วยโรคเดียวกัน รายอื่น ในขณะที่ DCP สูงขึ้นอย่างชัดเจนในผู้ป่วยทุกราย จึงมี ผู้พยายามพัฒนาชุดตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็งตับที่ประกอบด้วย แอนติบอดีจำเพาะต่อหลายโมเลกุล เพื่อใช้ร่วมกันตรวจ

วิเคราะห์ โดยมี DCP เป็นองค์ประกอบหลักในชุดตรวจ ด้วย¹³⁻¹⁴ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค solid-phase micro- extraction (SPME) ร่วมกับ gas chromatography/mass spectrophotometry (GCMS) เพื่อตรวจหาสารบ่งชี้มะเร็งระดับ ชนิดใหม่เรียกชื่อว่า hexanal, 1-octen-3-ol และ octane¹⁵ อย่างไรก็ตามสารบ่งชี้มะเร็งดังกล่าวมักไม่จำเพาะต่อมะเร็งตับ เพียงอย่างเดียว ดังนั้น การตัดชิ้นเนื้อและย้อมเซลล์ด้วยสาร บ่งชี้ที่จำเพาะต่อมะเร็งตับ จึงยังคงเป็นวิธีช่วยระบุการเป็น มะเร็งตับที่ชัดเจนและได้คำตอบสำหรับการวินิจฉัยที่ดีที่สุด แม้ว่าจะเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดความเจ็บปวดหรืออาจเกิดความ ล่าช้าในการวินิจฉัย เพราะแพทย์มักต้องตรวจหรือคลำเจอ ก้อนมะเร็งเสีย ก่อนจึงจะพิจารณาตรวจชิ้นเนื้อ แต่หากใช้การ ตรวจชิ้นเนื้อร่วมกับการคัดกรองสารบ่งชี้มะเร็งในกระแสเลือด จึงน่าจะเป็นวิธีการและรูปแบบของการช่วยวินิจฉัยที่จำเพาะ ที่สุดสำหรับผู้ป่วย

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การตรวจชิ้นเนื้อยังคงเป็นวิธี ที่ใช้วินิจฉัยในปัจจุบัน ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการผลิตและ พัฒนา โมโนโคลนอล แอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAb) ที่จำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์มะเร็งตับชนิด HCC โดยอาศัย เซลล์มะเร็ง เพาะเลี้ยง HepG2 ซึ่งมีกำเนิดจากมะเร็งตับชนิด เดียวกัน เป็นแหล่งของแอนติเจนโดยหวังว่าจะสามารถคัดเลือก โคลนที่มีความ จำเพาะต่อโมเลกุลจำเพาะ (HCC specific antigen) หรือโมเลกุลที่พบร่วม (HCC associated antigen) กับ มะเร็งตับชนิด HCC เพื่อจะสามารถ นำไปประยุกต์ใช้เป็นทาง เลือกในการช่วยตรวจวินิจฉัยมะเร็งตับด้วยการย้อมชิ้นเนื้อใน อนาคต

วัตถุประสงค์

ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี จำเพาะต่อมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma โดยเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เป็นแหล่งของแอนติเจน

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การเตรียมแอนติเจนและการฉีดกระตุ้นสัตว์

ทดลอง

เลี้ยงเซลล์มะเร็ง HepG2 cell lines (Human hepa- tocellular carcinoma, HCC) ใน DMEM high glucose ที่มี 10% fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้นสุดท้าย 1×10^5 cells/ mL ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 95% และมี CO₂ 5% เป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้เซลล์อยู่ในระยะ log phase จากนั้นเก็บ เซลล์ บั่นล้างด้วย sterile PBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งที่มีความเร็ว รอบ 800g นาน 10 นาที กระจายเซลล์ใน sterile PBS pH 7.2

ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 cells/mL และเก็บเซลล์ไว้ในตู้เย็นข้ามคืนเพื่อให้เซลล์ตาย

สัตว์ทดลองที่ใช้คือหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c อายุ 8 สัปดาห์ (สำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยก่อนการฉีดกระตุ้น เจาะเลือดจากหาง (tail bleed) บั่นแยกเก็บซีรัมเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (pre-immunized serum) จากนั้นฉีดกระตุ้นหนูด้วย HepG2 cell suspension ความเข้มข้น 1×10^6 cells/mL ปริมาตร 100 μ L/dose เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ฉีดกระตุ้นทุกสัปดาห์เป็นเวลา 2 เดือน โดยเจาะเลือดเก็บซีรัมก่อนการฉีดกระตุ้นทุกครั้ง ตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองด้วยวิธี indirect immunofluorescence โดยใช้ HepG2 cells เป็นแหล่งของแอนติเจน

2. การตรวจประเมินแอนติบอดีในซีรัมหรือน้ำเลี้ยงเซลล์ลูกผสม

เลี้ยงเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 3 วันให้เซลล์เจริญอยู่ในระยะ log phase เก็บเซลล์ บั่นล้างด้วย PBS pH 7.2 นับและปรับให้มีความเข้มข้น 5×10^6 cells/mL ด้วย PBS pH 7.2 จากนั้น block non-specific binding sites บนผิวเซลล์ด้วย heat inactivated human AB serum โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที ครบเวลาแบ่งเป็นชุดๆ ละ 50 μ L ต่อการทดสอบ เดิมซีรัมหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย HepG2 ในสัปดาห์ต่างๆ โดยมีชุดควบคุมคือ negative control เดิมซีรัมก่อนการฉีดกระตุ้น (Pre-immunized serum) Conjugate control เดิม cold 1%BSA PBS pH 7.2 ที่มี 0.02% NaN_3 (PBS azide) PBS pH 7.2 ในปริมาตรเท่ากันคือ 50 μ L ผสมให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที ครบเวลาล้าง 3 ครั้งด้วย cold PBS azide เพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกิน จากนั้นเติม FITC conjugated rabbit anti-mouse Igs (DAKO Cytomation, เจือจาง 1:50 ด้วย cold PBS azide) ปริมาตร 50 μ L ในทุกหลอดทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที ครบเวลาล้าง 4 ครั้งด้วย cold PBS azide สุดท้ายเติม Sheath fluid (Isoton III, Beckman Coulter) ปริมาตร 300 μ L ผสมให้เซลล์กระจายตัวดีและวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

3. การผลิตเซลล์ลูกผสมและการทดสอบแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ลูกผสม¹⁶

เตรียมเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด X63Ag8.653 ซึ่งเป็นเซลล์ mouse myeloma โดยเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะ log phase เก็บเซลล์ บั่นล้างด้วย DMEM จำนวน 3 ครั้ง นับและปรับความเข้มข้นเป็น 1×10^6 cells/mL ใน DMEM จากนั้น

ฆ่าหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วย HepG2 cells แล้วเป็นเวลา 2 เดือนและตรวจพบการสร้างแอนติบอดีแล้วด้วยวิธี indirect immunofluorescence การฆ่าหนูใช้วิธีการทำให้สลบสมบูรณ์ด้วย Diethyl ether จากนั้นฆ่าและแยกเก็บม้ามบดให้ได้เซลล์เดียว ทำลายเม็ดเลือดแดงที่ปะปนอยู่ด้วยบัลลังเซลล์ด้วย hypotonic solution บั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วย DMEM นับและคำนวณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วย 0.2% trypan blue, PBS pH 7.2 และกระจายเซลล์ทั้งหมดใน DMEM ปริมาตร 5 mL

ผสมเซลล์ทั้งสองชนิดในอัตราส่วน myeloma : spleen = 1:5 (cell/cell) บั่นเบาให้เซลล์ทั้งสองชนิดตกอยู่ก้นหลอดทดลองดูดของเหลวทิ้ง อุณหภูมิหลอดที่ 37°C โดยแกว่งเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวเป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นหยด 50% PEG-DMEM ปริมาตร 1 mL ในเวลา 1 นาที ตามด้วย DMEM ปริมาตร 1 mL ภายในเวลา 1 นาที สุดท้ายเติม DMEM ปริมาตร 20 mL ภายในเวลา 4 นาที ครบขั้นตอนแล้ว บั่นเบาอีกครั้ง (1000 rpm) นาน 7 นาที ดูดของเหลวทิ้งให้หมด และกระจายเซลล์ด้วย 10% Fetal calf serum/DMEM ที่มีโมเลกุลจำเป็นประกอบด้วย Oxaloacetate, Pyruvate และ insulin (OPI, Sigma) ให้มีความเข้มข้น 2×10^6 cell/mL สุดท้ายเติมเซลล์ลงใน 96-well culture plate หลุมละ 100 μ L เลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 37°C , 5% CO_2 และความชื้นสัมพัทธ์ 95% ข้ามคืน รุ่งเช้าเติม 2X HAT medium หลุมละ 100 μ L เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นระยะเวลา 5 วัน สังเกตกลุ่มเซลล์ลูกผสมในแต่ละหลุม จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยดูดอาหารเดิมทิ้งและเติม 1X HT แทนในปริมาตรเท่ากัน ปล่อยให้เซลล์ลูกผสมเจริญเติบโตเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ทดสอบด้วยวิธี indirect immunofluorescence ดังแสดงในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FCS-DMEM) เป็น negative control แทนเซลล์ลูกผสมที่ให้ผลบวกในการย้อมเซลล์ HepG2 จะถูกดำเนินการต่อไปให้เป็น monoclonal ด้วยเทคนิค limiting dilution มาตรฐานและทดสอบแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์อีกครั้งด้วยวิธีเดียวกัน

4. การตรวจสอบความจำเพาะของน้ำเพาะเลี้ยงกับ adherent HepG2 cell lines¹⁷⁻¹⁸

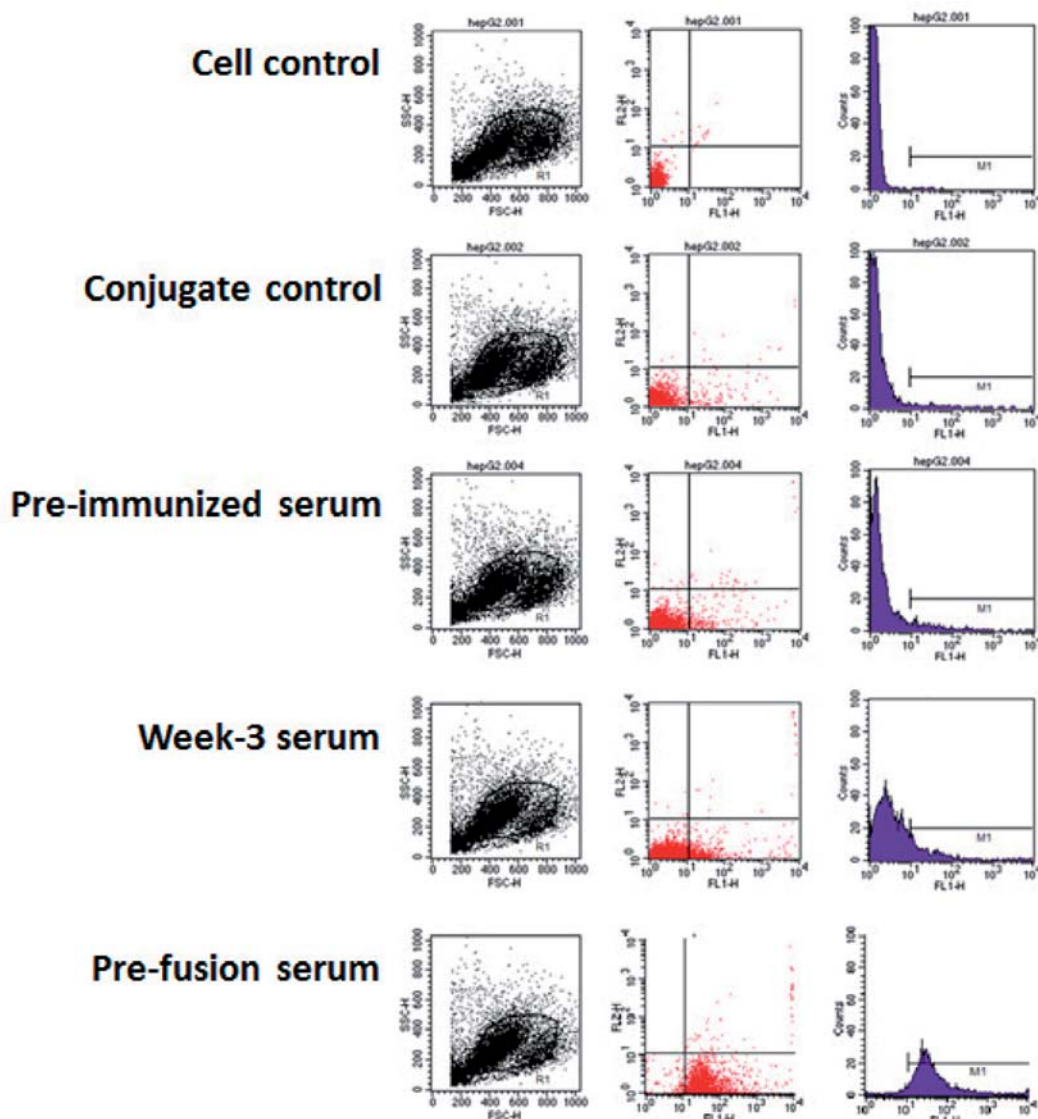
เลี้ยงเซลล์ HepG2 ในระยะ log phase นับและปรับความเข้มข้นเป็น 5×10^6 cell/mL จากนั้นหยดลงบนแผ่น cover slip ปริมาตร 500 μ L เกลี่ยให้กระจายทิ้งไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 37°C , 5% CO_2 และความชื้นสัมพัทธ์ 95% ข้ามคืน จากนั้นล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกด้วย PBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง เติม 0.5% H_2O_2 -cold methanol ให้ท่วมบริเวณที่เซลล์กระจายตัวอยู่เพื่อกำจัด endogenous peroxidase ทิ้งไว้นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องและล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์

ในชุดทดสอบและเติม 10% FCS-DMEM หรือ PBS pH 7.2 ในชุด negative control และ conjugate control ตามลำดับ โดยใช้ anti-HIVp24 เป็น isotype control ซึ่งให้ทำปฏิกิริยาในตู้เย็น 37 °C นาน 30 นาที ครบเวลาล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.2 จากนั้นเติม HRP-conjugated rabbit anti-mouse (DAKO Cytomation, 1:150 เจือจางใน 10%AB human serum) ปริมาตร 10 µL ทำปฏิกิริยาต่อในตู้เย็น 37 °C นาน 30 นาที แล้วล้างออกสุดท้ายเติม DAB/H₂O₂-Tris buffer saline นาน 2 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาล้าง 5 นาที ตรวจสอบด้วย

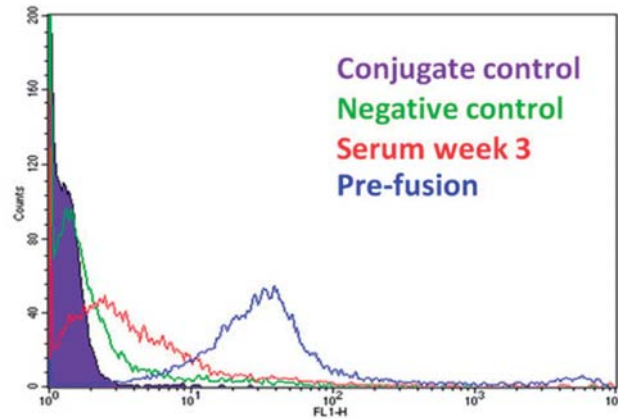
ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีในสัตว์ทดลองด้วยวิธี Indirect immunofluorescence

ในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีในสัตว์ทดลองโดยมีชุดควบคุมประกอบด้วย Cell control, Conjugate control และ Negative control (Pre-immunize serum) ด้วยเทคนิค indirect immunofluorescence พบว่าหนูที่ได้รับการฉีดด้วย HepG2 สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์และสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ของการฉีดกระตุ้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจยืนยันอีกครั้งใน pre-fusion serum ก่อนการเชื่อมเซลล์ซึ่งเป็นการฉีดกระตุ้นในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีความแรงของการเรืองแสงเมื่อย้อมเซลล์มากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1 และรูปที่ 2



รูปที่ 1 การทดสอบระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อ HepG2 ในซีรัมหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นสัปดาห์ที่ 3 และซีรัมก่อนการเชื่อมเซลล์

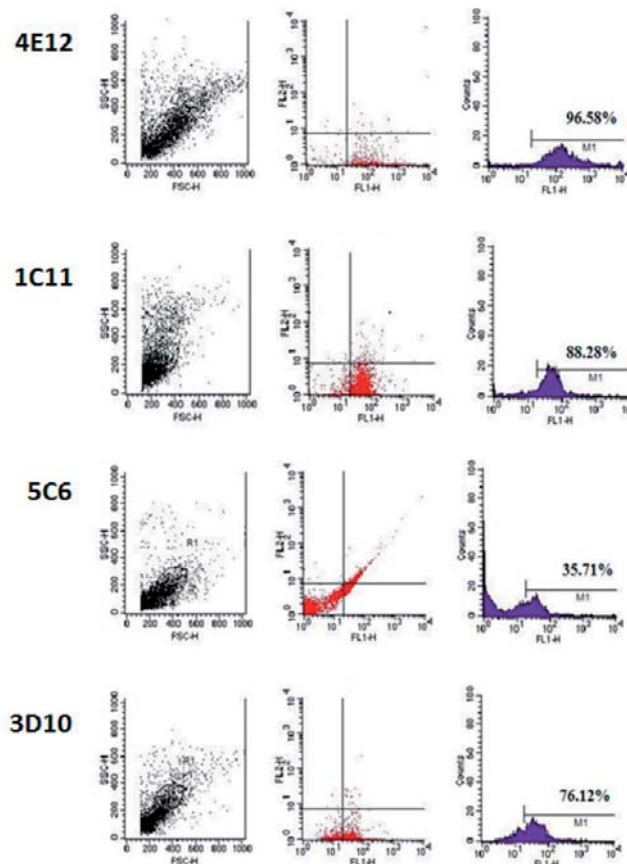


รูปที่ 2 ระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดได้ในซีรัมสัปดาห์ที่ 3 และก่อนการเชื่อมเซลล์

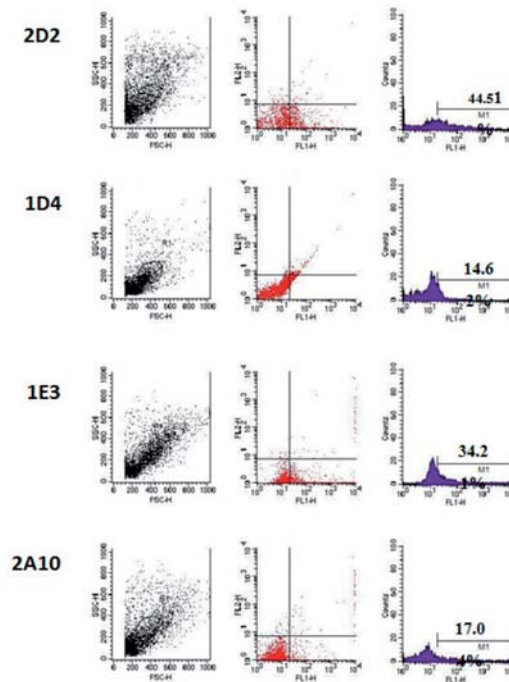
2. ผลการเชื่อมเซลล์และผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อเซลล์ HepG2

การผลิตโมโนโคลนอล ด้วยวิธี Hybridoma technique ในจำนวน 480 หลุม ได้เซลล์ลูกผสมที่เจริญสมบูรณ์จำนวน 110 หลุม คิดเป็น 22.9% และมีเซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ HepG2 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Indirect immunofluorescent จำนวน 38 หลุม คิดเป็น 7.9% โดยมีการนำเซลล์บางโคลนมาศึกษาเบื้องต้น ได้แก่ โคลน 4E12, 1C11, 5C6, 3D10, 2D2, 1D4, 1E3, 2D2 และ 2A10 โดยการ

เตรียมเป็น monoclonal ด้วยวิธีมาตรฐาน limiting dilution และศึกษาความจำเพาะ ของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด monoclonal เพื่อยืนยันอีกครั้ง โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ลูกผสมโคลน 1E4-1C2 ซึ่งเป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) และสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลบนผิวเซลล์ HepG2 ได้เป็นชุด ควบคุม พบว่าทุกโคลนสามารถทำปฏิกิริยากับ HepG2 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4



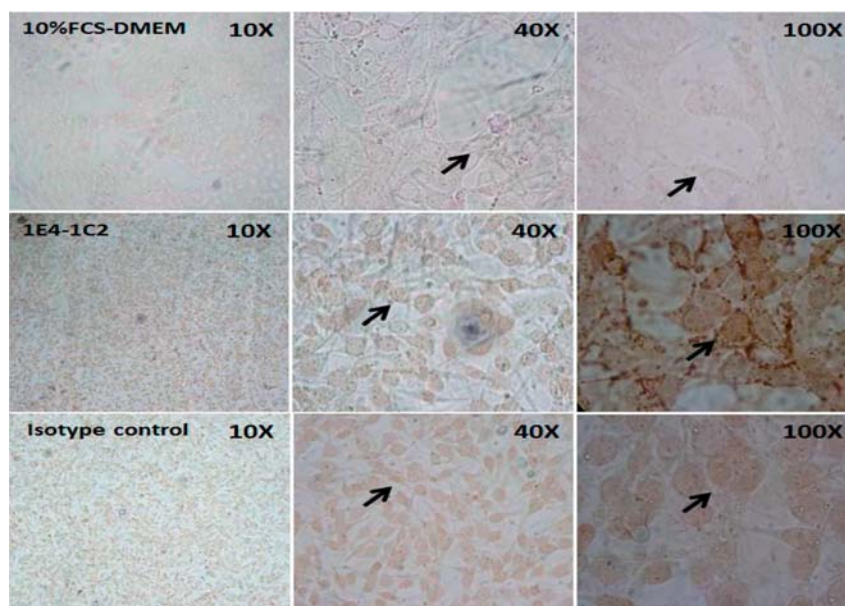
รูปที่ 3 ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์โคลน 4E12, 1C11, 5C6 และ 3D10



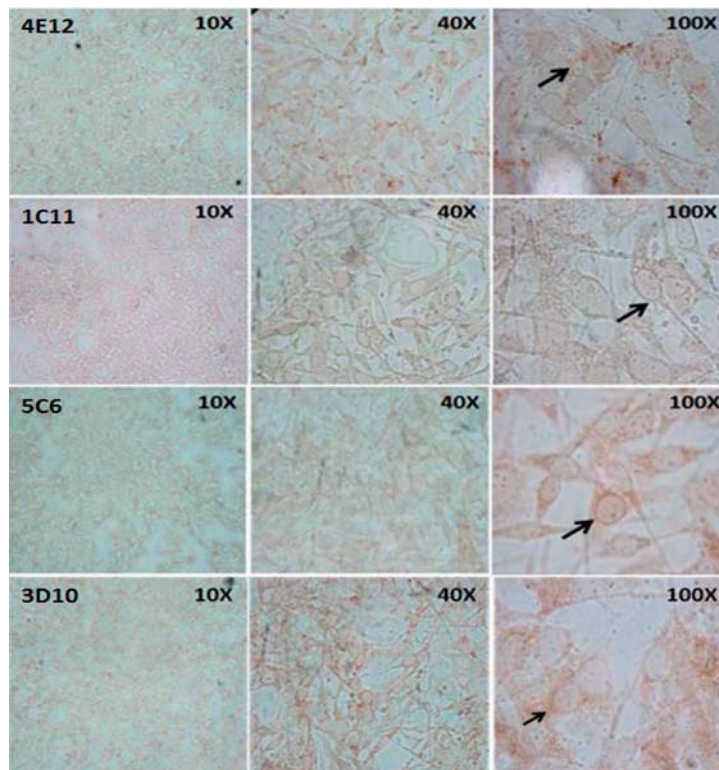
รูปที่ 4 ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์โคลน 2D2, 1D4, 1E3 และ 2A10

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมขึ้นเนื้อ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เมื่อย้อมกับเซลล์ HepG2 ในสภาวะเกาะติดเพื่อยืนยันว่าแอนติบอดีแต่ละโคลนนั้น จะมีความจำเพาะและสามารถสามารถตรวจสอบได้ไม่ว่าโมเลกุลดังกล่าวจะอยู่บนผิวเซลล์ในสภาวะใดๆ จึงมีการจำลองสภาวะให้เซลล์เกาะติดบนพื้นผิวเช่นเดียวกับในตัวอย่างเนื้อเยื่อและย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้

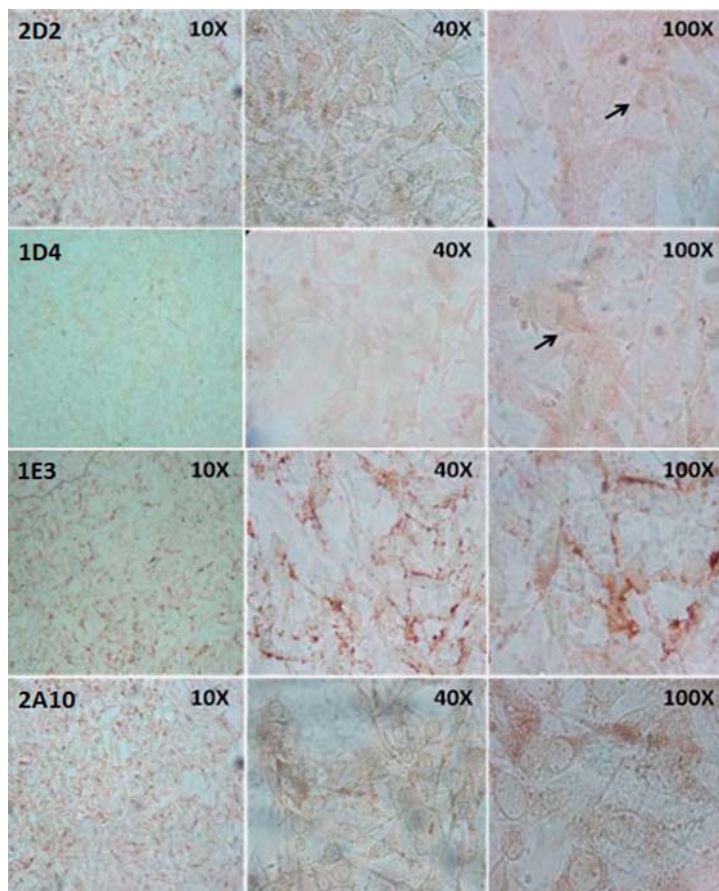
10% FCS-DMEM เป็น negative control, 1E4-1C2 เป็น positive control และ anti-HIV p24 เป็น IgG1, Isotype match control พบว่ามีความแตกต่างกันในตำแหน่งของการย้อมติดแอนติเจน โดยโคลน 1E4-1C2 ย้อมติดแอนติเจนในส่วนของ cytoplasm และ nucleus ในขณะที่ anti-HIV p24 ย้อมติดในส่วน of nucleus เท่านั้น (รูปที่ 5) ส่วนโคลนต่างๆ ที่ผลิตขึ้นทั้ง 8 โคลนที่ใช้ในการศึกษาพบว่า ย้อมติดแอนติเจนในส่วน of cytoplasm ดังแสดงในรูปที่ 6-7



รูปที่ 5 การย้อมเซลล์ HepG2 ในสภาวะเกาะติดด้วยแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 และแอนติบอดีควบคุม Anti-HIV p24 ด้วยเทคนิค immunohistochemistry



รูปที่ 6 การย้อมเซลล์ HepG2 ในสภาวะเกาะติดด้วยแอนติบอดีโคลน 4E12, 1C11, 5C6 และ 3D10 ด้วยเทคนิค immunohistochemistry



รูปที่ 7 การย้อมเซลล์ HepG2 ในสภาวะเกาะติดด้วยแอนติบอดีโคลน 2D2, 1D4, 1E3 และ 2A10 ด้วยเทคนิค immunohistochemistry

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่ามีปัญหาจากการใช้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง เนื่องจากเซลล์ในระยะที่กำลังเจริญเติบโตเต็มที่นั้น สามารถแบ่งตัวและทำให้เกิดพยาธิสภาพแก่สัตว์ทดลอง ทั้งทำให้เกิดก้อนท่อน้ำเหลืองและในบางการทดลองทำให้สัตว์ป่วยตาย ผู้วิจัยจึงปรับแก้ไขปัญหาโดยเตรียมเซลล์ในระยะที่กำลังเจริญเติบโตเต็มที่แต่ทำให้เสียสภาพโดยการแช่เย็นเป็นเวลาข้ามคืน ซึ่งพบว่าเซลล์ตายแล้วจากการย้อมด้วย trypan blue exclusion จึงช่วยแก้ปัญหาการก่อพยาธิสภาพในสัตว์ทดลองได้ แต่ยังคงสภาพแอนติเจนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีได้ตามวัตถุประสงค์

แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเซลล์ HepG2 ได้ทั้งเซลล์ที่อยู่เป็นอิสระในตัวกลางและที่เกาะติดบนผิวเซลล์ซึ่งทำขึ้นเพื่อตรวจสอบว่าแอนติบอดียังคงจำเพาะต่อโมเลกุลของเซลล์ไม่ว่าจะอยู่ในสภาพใด ทั้งนี้เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่จะนำแอนติบอดีไปใช้ในการตรวจย้อมชิ้นเนื้อต่อไป อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าการย้อมเซลล์ในสภาวะเกาะติดนี้ แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่พบในไซโตพลาสซึม

ของเซลล์มีบางโคลนที่เห็นการติดสีไม่ชัดเจน เช่น 1E3 ซึ่งน่าจะเป็นการย้อมติดในส่วน extracellular matrix ซึ่งต้องมีการตรวจสอบต่อไปถึงความจำเพาะ

จากการศึกษากล่าวได้ว่า สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่มีต้นกำเนิดจากมะเร็งชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) ของคนได้ตามวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการศึกษาต่อไปคือ การทดลองนำไปใช้ในการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับชนิด HCC ซึ่งหากมีความจำเพาะโดยไม่เกิดผลบวกกับชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดอื่นก็น่าจะมีทางเลือกใหม่สำหรับแอนติบอดีที่ใช้ตรวจยืนยันชิ้นเนื้อมะเร็งตับชนิด HCC ต่อไป เพิ่มเติมจากรูปแบบการตรวจวินิจฉัยเดิมที่มีในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

นิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์ วัสดุและอุปกรณ์ส่วนหนึ่งใช้ร่วมกับโครงการวิจัยหลักที่ได้รับการสนับสนุนจาก สภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2552-2553

เอกสารอ้างอิง

1. Bosch, F.X., J. Ribes, and J. Borrás, Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis*, 1999; 19(3): 271-85.
2. Bosch, F.X., et al., Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 2005; 9(2): 191-211.
3. McGlynn, K.A. and W.T. London, Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2005; 19(1): 3-23.
4. Yu, M.C., et al., Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol*, 2000; 14(8): 703-9.
5. Montalto, G., et al., Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 963: 13-20.
6. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med*, 2000; 160(21): 3227-30.
7. Brandtzaeg, P.E., Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 964: p. 13-45.
8. Srivatanakul, P., H. Sriplung, and S. Deerasamee, Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2004; 5(2): 118-25.
9. Teo, E.K. and K.M. Fock, Hepatocellular carcinoma: an Asian perspective. *Dig Dis*, 2001; 19(4): 263-8.
10. Parikh, S. and D. Hyman, Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med*, 2007; 120(3): 194-202.
11. Lang, L., CME series focuses on Patient-Centered GI Practice. *Gastroenterology*, 2004; 127(1): 5.
12. Cottingham, K., Candidate biomarkers for liver cancer. *J Proteome Res*, 2009. 8(2): p. 428.
13. Benowitz, S., Liver cancer biomarkers struggling to succeed. *J Natl Cancer Inst*, 2007. 99(8): p. 590-1.
14. Alafar, H., J.H. Prestegard, and F. Valafar, Data mining protein structure databanks for crystallization patterns of proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 980: 13-22.
15. Xue, R., et al., Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008; 22(8): 1181-6.
16. จริญญา ออนตะไคว้. การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ Recombinant gp41 ของเชื้อ HIV-1 subtype E. ภาควิชาเทคนิคการแพทย์. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544 : 7-11
17. เลิศลักษณ์ (ฤทธาพรณ์) ภูพัฒน์. Immunoperoxidase technique. *อิมมูโนเพอรอกซิเดสเทคนิค*. 2533: 1-75
18. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-1-2.