

การแสดงออกของ พี-กลัยโคโปรตีน เซอร์ไววิน และโมเลกุล CD147 ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงดื้อยาหลายขนานชนิด K562/Adr

Expressions of P-glycoprotein, survivin and CD147 molecules on multidrug resistance leukemic cell line K562/Adr

■ อรณิข สมโน ทรงยศ อนุชปรีดา สาวิตรี เจียมพานิชกุล*
Aoranit Somno Songyot Anuchpreeda Sawitree Chiampanichayakul*

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

* Corresponding author (Email: sawitree.chiampa@cmu.ac.th)

Received May 2015

Accepted as revised August 2015

Abstract

Introduction: Leukemia is a hematologic malignant disease. To date, chemotherapy is the most effective method for leukemia treatment. However, multidrug resistance (MDR) is a major obstacle of leukemia treatment failure. Previous studies have shown that multidrug resistance phenotype is associated with P-glycoprotein (P-gp) and survivin which is a drug transporter protein and inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), respectively. Moreover, overexpressed CD147 has been reported to be involved in the multidrug resistance cell lines. However, the relationship of P-gp, survivin, and CD147 in leukemia with MDR phenotype have not been reported.

Objective: The purpose of this study was to investigate the expressions of P-gp, survivin and CD147 in leukemic cells with MDR phenotype K562/Adr compared to drug sensitive K562 cells.

Materials and methods: The sensitivity of the adriamycin on K562/Adr (drug resistance) and K562 (drug sensitive) cells were determined by MTT assay. Expressions of P-gp, survivin, and CD147 were then investigated by RT-PCR and Western blotting.

Results: Adriamycin showed the cytotoxic effect on K562 cells more than K562/Adr cells with the inhibitory concentration at 50% growth (IC_{50}) values of $2.17 \pm 1.02 \mu M$ and $>10 \mu M$, respectively. P-gp, survivin, and CD147 showed the significant increase in both protein and mRNA levels in K562/Adr cells by Western blot and RT-PCR.

Conclusion: This study is the first report describing the high level expression of P-gp, survivin, and CD147 in leukemia with multidrug resistance phenotype.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(3): 173-181. Doi: 10.14456/jams.2015.21

Keywords: Multidrug resistance, P-glycoprotein, survivin, CD147, K562 cell line

บทคัดย่อ

บทนำ: มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคทางระบบโลหิตในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือเคมีบำบัด แต่ปัญหาตามมาที่มักพบคือ การดื้อยาแบบหลายขนาน (multidrug resistance; MDR) การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการดื้อยาแบบหลายขนานมีความสัมพันธ์กับ พี-กลัยโคโปรตีนและเซอร์โวอิน ซึ่งเป็นโปรตีนขับไล่ยา (drug transporter) และโปรตีนที่ยับยั้งอะพอพโทซิส (inhibitors of apoptosis proteins; IAPs) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า โปรตีน CD147 มีการแสดงออกสูงขึ้นและสัมพันธ์กับการดื้อยาหลายขนานในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานยืนยันว่าโปรตีนทั้ง 3 ชนิดทำงานร่วมกันอย่างไรต่อการดื้อยาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว รายงานนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงความสัมพันธ์เบื้องต้นของโปรตีนพี-กลัยโคโปรตีน เซอร์โวอิน และ CD147

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการแสดงออกของ พี-กลัยโคโปรตีน เซอร์โวอิน และโมเลกุล CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อยาหลายขนานชนิด K562/Adr เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไวต่อยาชนิด K562

วัสดุและวิธีการ: ศึกษาการตอบสนองต่อยาอะเดรียมัยซินของเซลล์ K562/Adr และ K562 โดยวิธี MTT และการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน เซอร์โวอิน และ CD147 ในระดับยีนและโปรตีนโดยวิธี RT-PCR และ Western blotting

ผลการศึกษา: ยาอะเดรียมัยซินมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ K562 มากกว่า K562/Adr โดยแสดงค่า IC_{50} ในเซลล์ K562 และ K562/Adr เท่ากับ $2.17 \pm 1.02 \mu M$ และ $>10 \mu M$ ตามลำดับ และพบว่าในเซลล์ K562/Adr มีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน เซอร์โวอิน และ CD147 ชนิดในระดับที่สูงกว่า เซลล์ K562 ทั้งในระดับโปรตีนและยีน โดยวิธี Western blot และ RT-PCR ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา: การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ยืนยันว่า พี-กลัยโคโปรตีน เซอร์โวอิน และ CD147 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นร่วมกันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงดื้อยาชนิด K562/Adr

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(3): 173-181. Doi: 10.14456/jams.2015.21

คำรหัส: การดื้อยาแบบหลายชนิด พี-กลัยโคโปรตีน CD147 เซอร์โวอิน เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562

บทนำ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์เม็ดเลือด ทำให้ไขกระดูกมีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดผิดปกติ มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์เกิดเป็นอันดับ 6 ของโรคมะเร็งทั้งหมดที่พบทั่วโลก และประมาณร้อยละ 32.6 ของโรคมะเร็งที่พบในเด็ก¹ ปัจจุบันการรักษาที่มีประสิทธิภาพคือการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งเป็นการใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน แต่ปัญหาที่มักพบคือ เกิดการดื้อยาแบบหลายขนาน (multidrug resistance; MDR) ทำให้การรักษาโรคไม่ประสบผลสำเร็จ การดื้อยาในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีหลายกลไก² กลไกที่สำคัญคือการแสดงออกของ พี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein หรือ P-gp) ที่เพิ่มขึ้นบนผิวเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา ทำหน้าที่ในการขับยาออกนอกเซลล์³ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า พี-กลัยโคโปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นบนผิวเซลล์มะเร็งหลายชนิดที่ดื้อยาหลายขนาน รวมถึงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว^{4,5}

พี-กลัยโคโปรตีน เป็นโปรตีนที่สร้างโดยยีนเอ็มดีอาร์วัน (*Multidrug resistance gene1* หรือ *MDR1*)⁴ ทำหน้าที่ในการขับสารต่างๆ ออกจากเซลล์ (efflux pump) เช่น สารพิษ ยาเคมีบำบัด เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนเพิ่มขึ้นจะทำให้มีการขับยาเคมีบำบัดออกนอกเซลล์มากขึ้น ลดการสะสมของยาภายในเซลล์ ส่งผลให้การรักษารักษารักษาโรคมะเร็งไม่ประสบความสำเร็จ และมีความจำเป็นต้องใช้ยาเคมีบำบัดในปริมาณสูงขึ้น ทำให้เกิดการดื้อยา⁶ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนบ่งชี้การพยากรณ์โรคที่ไม่ดี⁷⁻⁹ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน

การดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis resistance) เป็นอีกกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดการดื้อยาหลายขนานของเซลล์มะเร็ง¹⁰⁻¹¹ โดยพบว่าเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มยับยั้งอะพอพโทซิส (inhibitor of apoptosis proteins หรือ IAPs) เพิ่มขึ้น โปรตีนกลุ่มนี้ยับยั้งกระบวนการตาย

แบบอะพอพโทซิสโดยยับยั้ง caspase cascade¹¹ เซอร์ไววิน (survivin) หรือ baculoviral inhibitor of apoptosis-repeat containing 5 เป็นโปรตีนที่กำหนดการสร้างโดยยีน *BIRC5* เป็นสมาชิกในกลุ่ม IAPs ที่มีบทบาทสำคัญในโรคมะเร็ง การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซอร์ไววินยับยั้งอะพอพโทซิส ทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยยับยั้ง caspase-3 และ 7 และยับยั้งการกระตุ้น caspase-9¹²⁻¹⁴ ผู้ป่วยมะเร็งที่มีการแสดงออกของเซอร์ไววินในระดับสูงจะมีอายุสั้น¹⁵ มีโอกาสกลับมาเป็นโรคซ้ำสูง¹⁶ และเกิดการดื้อต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดสูง¹⁷⁻¹⁸ โดยปกติเซอร์ไววินมีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อตัวอ่อน (embryonic tissues) และเซลล์มะเร็งรวมถึงมะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ไม่พบในเซลล์ปกติ¹⁹ การศึกษาของ Zaffaroni และคณะ²⁰ ชี้ให้เห็นว่าเซอร์ไววินเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่า เซลล์ที่มีการแสดงออกของเซอร์ไววินสูงดื้อต่อยาเคมีบำบัด ที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดอะพอพโทซิส (anticancer drug-induced apoptosis)²¹⁻²² ดังนั้นจะเห็นว่า เซอร์ไววิน เป็นอีกหนึ่งโมเลกุลสำคัญที่มีบทบาทต่อการเกิดการดื้อยาแบบหลายขนานในเซลล์มะเร็ง แต่ยังไม่มีความชัดเจนในกลไกควบคุมการทำงาน

โปรตีน CD147 หรือ basigin²³⁻²⁴ หรือ EMMPRIN²⁵ (extracellular matrix metalloproteinase inducer) หรือ M6 Ag²⁶ เป็นโปรตีนในกลุ่ม immunoglobulin superfamily²⁷ กำหนดการสร้างโดยยีน *basigin* (BSG) CD147 มีการแสดงออกทั้งในเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ชนิดอื่น (hematopoietic and non-hematopoietic cells)²⁸ และมีแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว²⁹ การศึกษาพบว่า CD147 เป็นโปรตีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส และมีรายงานว่า CD147 เกี่ยวข้องกับการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งด้วย³⁰⁻³² การศึกษาของ Li และคณะ³³ ยังพบว่า CD147 มีผลต่อการดื้อยาแบบหลายขนานโดยควบคุมการแสดงออกของยีน MDR1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม และการยับยั้งการแสดงออกของ CD147 โดยวิธี RNA interference สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อยา paclitaxel ในเซลล์มะเร็งรังไข่³⁴ และเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก³⁵ ดังนั้นจะพบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน CD147 กับการเกิดการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งดังกล่าว แต่ยังไม่มียารายงานใดกล่าวถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของฟี-กลัยโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อยาแบบหลายขนาน จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสามชนิดในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว รายงานนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ยาอะเดรียไมซิน (adriamycin)

ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงและใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นตัวแทนของยาที่มักเกิดการดื้อต่อยาแบบหลายขนานในเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ ฟี-กลัยโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ทั้งในระดับโปรตีนและยีน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อต่อยาหลายขนาน เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไวต่อยา

วัสดุและวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 (sensitive phenotype) และ K562/Adr (resistant phenotype) (RIKEN, Japan) เพาะเลี้ยงใน RPMI 1640 (GIBCO™ Grand Island, NY, USA) ที่มี fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 10% เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

ก่อนการทดลอง เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr ในสภาวะที่เพิ่มยาอะเดรียไมซินตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 0.1 ถึง 1 µM เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

2. การศึกษาพิษวิทยาของการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562/Adr เปรียบเทียบกับ K562

ศึกษาความแตกต่างของพิษวิทยาการดื้อต่อยาอะเดรียไมซินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด โดยวิธี MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide] assay โดยใช้เซลล์จำนวน 1x10⁴ เซลล์/100 µL/หลุม ใน 96-well plate บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 24 ชั่วโมง ครบเวลาเติมยาอะเดรียไมซินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-10 µM) บ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 µL และเติม MTT dye (Bio Basic Canada Inc, Canada) ปริมาตร 15 µL บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาคั่วเพลทและเติม DMSO (RCI Labscan, Thailand) ปริมาตร 200 µL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 630 nm คำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงระหว่างหลุมทดสอบกับหลุมควบคุมดังสมการ

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

3. การศึกษาการแสดงออกของ พี-กลัยโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และ K562/Adr โดยวิธี Western blot

ปั่นล้างเซลล์ K562 และ K562/Adr จำนวน 3 ครั้ง ด้วย ice-cold PBS ปรับความเข้มข้นเซลล์เป็น $5-10 \times 10^6$ cell/mL แยกเซลล์โดยเติม RIPA lysis buffer ปริมาตร 100 μ L และ บ่มที่ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง ครอบเวลาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 15 นาที เก็บส่วนใสซึ่งประกอบด้วยโปรตีนและ วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Folin-Lowry หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ สกัดได้ปริมาณ 30 μ g มาแยกโดยใช้ 12% gel SDS-PAGE และถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่น PVDF โดยใช้ semi-dry blotter และตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน CD147 และพี-กลัยโคโปรตีน โดยใช้ mouse anti-Pgp antibody (MT-Pgp1)³⁶ และ rabbit anti-CD147 antibody (Abcam, Cambridge, UK) เป็น primary antibody ทำปฏิกิริยานาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 0.1% tween-PBS และ เติม goat anti-rabbit IgG-HRP (Abcam, Cambridge, UK) หรือ rabbit anti-mouse Ig-HRP (Dako, Humburg, Germany) ทำปฏิกิริยานาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้างเมมเบรนด้วย 0.1% tween-PBS และตรวจหาแถบโปรตีน ที่สนใจโดยใช้ ECL chemiluminescent kit (LuminataTM Forte Western HRP Substrate, Merck Millipore)

4. การศึกษาการแสดงออกของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และ K562/Adr โดยวิธี Semi-Quantitative RT-PCR

ปั่นล้างเซลล์ K562 และ K562/Adr ด้วย ice-cold PBS และปรับความเข้มข้นเป็น $5-10 \times 10^6$ cell/ μ L สกัด อาร์เอ็นเอโดยใช้ Trizol[®] reagent (Invitrogen™) นำอาร์เอ็นเอ ที่สกัดได้ปริมาณ 1 μ g สังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA, cDNA) โดยใช้ RevertAid strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) RT-PCR mixture ประกอบ ด้วย random hexamer primer, 5X reaction buffer, 10 mM dNTP mix, RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L), RevertAid RT (200 U/ μ L) อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 1 μ g ทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที และ 42 °C นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจาก การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ โดยใช้ DreamTaq Green PCR Master Mix ปฏิกริยาประกอบด้วย 2X DreamTaq Green PCR Master Mix, ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 1) และ ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ 1 μ L ปฏิกริยา PCR ของแต่ละยีน ที่สนใจ (ตารางที่ 2) หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา นำ PCR product มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose 1.5% และย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/mL วิเคราะห์ความเข้มของแถบแบนโดยเครื่อง Gel documentation system (gel documentation XR+, BioRad, USA)

Table 1 The sequences of primers used to amplify P-gp, CD-147, survivin and GAPDH by PCR amplification.

Gene	Primer sequence
MDR1 ³⁶	Sense 5'-AAAGCGACTGAATGTTTCAGTGG-3'
	Antisense 5'-AATAGATGCCTTTCTGTGCCAG-3'
BSG ³⁵	Sense 5'-GCAGCGGTTGAGGTTGT-3'
	Antisense 5'-AGCCACGATGCCCAGGAAAGG-3'
Survivin ³⁶	Sense 5'-TGGCTGCCATGGATTGAG-3'
	Antisense 5'-TCTGAGGAGGCACAGGTGT-3'
GAPDH ³⁶	Sense 5'-CAACGTGTCACTGGTGGACCTG-3'
	Antisense 5'-TTACTCCTTGAGGCCATGTGG-3'

Table 2 The thermal cycling conditions used to amplify P-gp, CD-147, survivin and GAPDH by PCR amplification.

Gene	Cycling conditions		
MDR1 & GAPDH	Denature	94 °C	3 minutes
	Annealing	58 °C	1 minutes
	Extension	72 °C	1 minutes
	Final extension	72 °C	5 minutes
	The RT-PCR cycling was performed for 28 cycle		
BSG	Denature	97 °C	20 second
	Annealing	60 °C	20 second
	Extension	72 °C	20 second
	Final extension	72 °C	10 minutes
	The RT-PCR cycling was performed for 30 cycle.		
Survivin	Denature	94 °C	3 minutes
	Annealing	62 °C	30 second
	Extension	72 °C	1 minutes
	Final extension	72 °C	5 minutes
	The RT-PCR cycling was performed for 26 cycle.		

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงในรูปของ Mean±SD และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ student's t test โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษา

1. พิโนทัยป์ดื้อยาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และ K562/Adr

หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดร่วมกับยาอะเดรียมัยซินที่ความเข้มข้นต่างๆ

พบว่าเซลล์ K562 มีความไวต่อยาอะเดรียมัยซินมากกว่าเซลล์ K562/Adr โดยมีค่า IC_{50} $2.17 \pm 1.02 \mu M$ ในขณะที่เซลล์ K562/Adr ยังคงมีชีวิตอยู่ที่มีความเข้มข้นของยาอะเดรียมัยซิน $10 \mu M$ (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ K562/Adr มีการตอบสนองต่อยาอะเดรียมัยซินน้อยกว่าเซลล์ K562 ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงฟีโนทัยป์ของการดื้อต่อยาอะเดรียมัยซิน

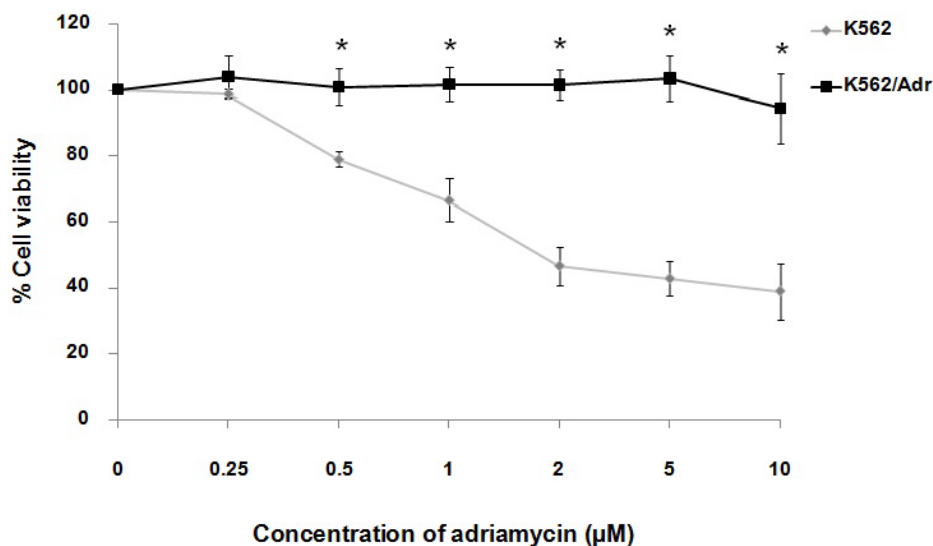


Figure 1. Cytotoxicity of adriamycin on K562/Adr and K562 leukemia cell lines by MTT assay. Data presented as mean±SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ when compared to K562 cells.

2. การแสดงออกของ MDR1, BIRC5 และ BSG mRNA ที่กำหนดการสร้าง พี-กลัยโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD 147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเลียงชนิด K562 และ K562/Adr

การศึกษาการแสดงออกของ MDR1 mRNA และ พี-กลัยโคโปรตีน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเลียงชนิด K562 และ K562/Adr โดยวิธี Western blotting และ semi-quantitative RT-PCR พบว่าระดับของ MDR1 mRNA และ พี-กลัยโคโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเลียงชนิด K562/Adr เมื่อเทียบกับเซลล์ K562 (รูปที่ 2A และ 3A) การแสดงออกของ

BIRC5 mRNA ที่กำหนดการสร้างเซอร์ไววินเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเลียงชนิด K562/Adr เมื่อเทียบกับเซลล์ K562 (รูปที่ 2A และ 3A)

นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ BSG mRNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr เพิ่มสูงขึ้นกว่าในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูป 2B) สอดคล้องกับระดับโปรตีน CD147 ในเซลล์ K562/Adr เพิ่มสูงมากกว่าในเซลล์ K562 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูป 3B) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีน CD147 มีการแสดงออกที่มากขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเลียงชนิด K562/Adr

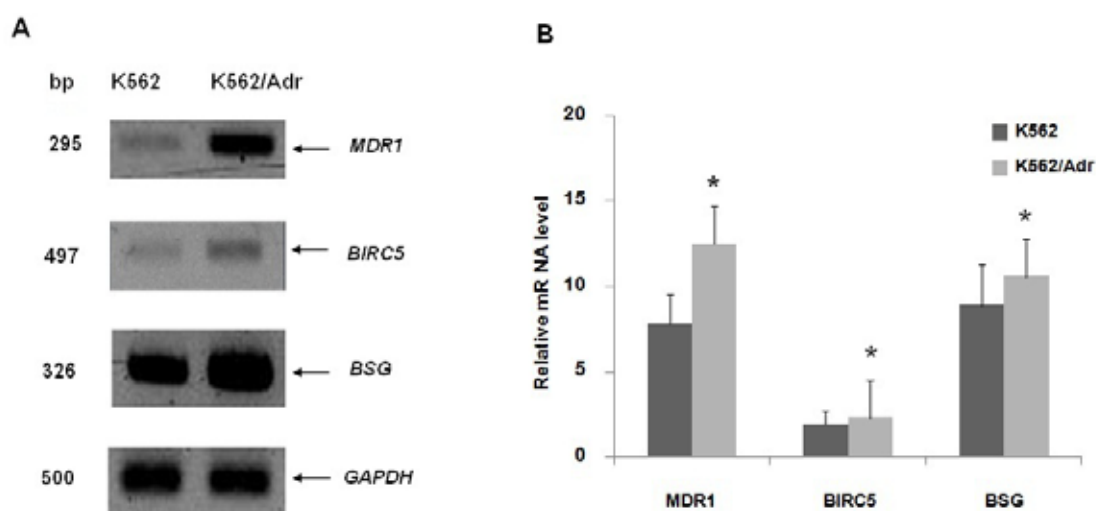


Figure 2. The levels of MDR1, BIRC5 and BSG mRNA in K562 and K562/Adr cells. (A) Results are representative of three similar experiments by quantitative RT-PCR analysis and (B) quantification of MDR1, BIRC5 and BSG mRNA expression in K562 and K562/Adr cells, the mRNA levels were normalized to the loading control GAPDH. The ratios of MDR1, BIRC5 and BSG mRNAs were calculated for each group. Data presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p<0.05$ when compared to K562 cells.

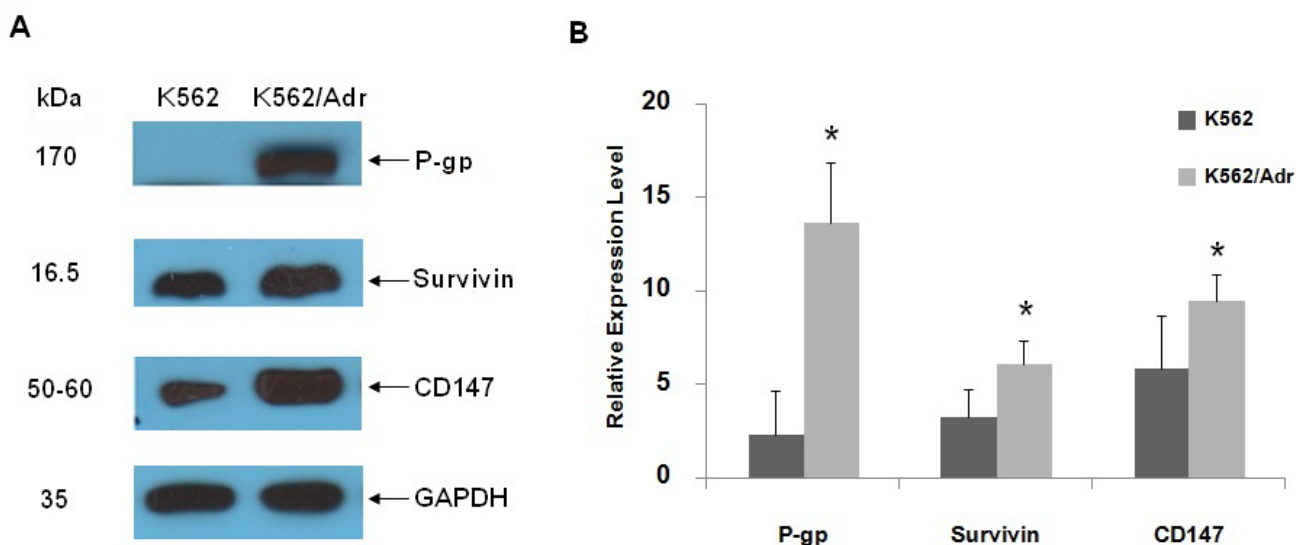


Figure 3. The protein expressions of P-gp, Survivin, and CD147 on K562 and K562/Adr cell lines. (A) Results are representative of three similar experiments by Western blotting and (B) quantification of P-gp, Survivin, and CD147 expressions in K562 and K562/Adr cells, the protein levels were normalized to the loading control GAPDH. The ratios of P-gp, Survivin and CD147 were calculated for each group. Data presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p<0.05$ when compared to K562 cells.

วิจารณ์ผลการศึกษา

การให้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด แต่มักพบปัญหาการดื้อยาแบบหลายขนาน การวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยรายงานพบความแตกต่างของการดื้อยาอะครีนิมัยซินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดพบว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562/Adr มีการดื้อยาอะครีนิมัยซิน โดยมีกลไกสำคัญคือเพิ่มการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน³ การศึกษาครั้งนี้พบว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562/Adr มีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนในสูงกว่าในเซลล์ชนิด K562 ทั้งในระดับโปรตีนและยีนสอดคล้องกับหลายรายงานที่พบว่าพี-กลัยโคโปรตีนมีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็งดื้อยาหลายชนิด^{35,37-39} ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของพี-กลัยโคโปรตีนต่อการดื้อยาเคมีบำบัด

การดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิส เป็นอีกกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งหลายชนิด¹⁰⁻¹¹ เซอร์ไรวิน เป็นโปรตีนในกลุ่ม IAPs ที่มีบทบาทสำคัญยับยั้งอะพอพโทซิส การศึกษานี้พบว่าในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562/Adr มีการแสดงออกของเซอร์ไรวินสูงกว่าในเซลล์ชนิด K562 ทั้งในระดับโปรตีนและยีน แสดงให้เห็นถึงบทบาทของเซอร์ไรวินใน

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยาเช่นกัน

CD147 เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์หลายชนิดและเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า CD147 เป็นมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง³⁰⁻³² อย่างไรก็ตามไม่มีการรายงานการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในมะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา และความสัมพันธ์ของโมเลกุลทั้งสามชนิด รายงานนี้พบว่า CD147 มีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562/Adr ทั้งในระดับโปรตีนและยีน เนื่องจาก CD147 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการควบคุมปัจจัยการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งหลายอย่าง เช่น การเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง^{24,31,40-41} และ ควบคุมการเกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB ผ่านการลดลงของ XIAP ซึ่งเป็นสมาชิกในกลุ่ม IAPs³⁵ ผลการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าโปรตีนทั้ง 3 ชนิดคือ พี-กลัยโคโปรตีน เซอร์ไรวิน และ CD147 เพิ่มขึ้นในมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดดื้อยา K562/Adr ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าโปรตีนทั้ง 3 ชนิดอาจมีความสัมพันธ์กัน และเกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายขนานของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Zhang X, Xiao W, Wang L, Tian Z, Zhang J. Deactivation of signal transducer and activator of transcription 3 reverses chemotherapeutics resistance of leukemia cells via down-regulating P-gp. *PLoS one* 2011; 6: e20965.
2. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
3. Fardel O, Lecœur V, Guillozo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 1283-91.
4. Tolis C, Ferreira C, Pinedo H, Giaccone G. Molecular pathways of drug resistance. In: Bronchud M, Foote M, Peters W, Robinson M, editors. *Principles of Molecular Oncology*: Humana Press 2000. p. 323-56.
5. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 385-427.
6. Kourti M, Vavatsi N, Gombakis N, Sidi V, Tzimagiorgis G, Papageorgiou T, et al. Expression of Multidrug Resistance 1 (MDR1), Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1), Lung Resistance Protein (LRP), and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Genes and Clinical Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Hematol* 2007; 86: 166-73.
7. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87: 1997-2004.

8. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991; 78: 586-92.
9. Norgaard JM, Bukh A, Langkjer ST, Clausen N, Palshof T, Hokland P. MDR1 gene expression and drug resistance of AML cells. *Br J Haematol* 1998; 100: 534-40.
10. Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E. Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002; 75: 161-5.
11. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-4.
12. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK and Oh BH. An antiapoptotic protein human surviving is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-23.
13. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC and Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13103-7.
14. Song Z, Yao X and Wu M. Direct interaction between surviving and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 23130-40.
15. Ikeguchi, Kaibara N. Survivin messenger RNA expression is a good prognostic biomarker for oesophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 87: 883-7
16. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM and Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *New Engl J Med* 1999; 341: 452-3.
17. Zhang M, Latham DE, Delaney MA and Chakravarti A. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 2005; 24: 2474-82.
18. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ and Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4349-54.
19. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A noble anti-apoptotic gene, survivin, is expressed in cancer and lymphoma, *Nat Med* 1997; 3: 917-21.
20. Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1406-12.
21. Rödel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rödel F. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: Survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55: 1341-7.
22. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4349-54.
23. Miyauchi T, Masuzawa Y and Muramatsu T. The Basigin Group of the Immunoglobulin Superfamily: Complete Conservation of a Segment in and around Transmembrane Domains of Human and Mouse Basigin and Chicken HT7 Antigen. *J Biochem* 1991; 110: 770-4.
24. Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S and Muramatsu T. Basigin, a New, Broadly Distributed Member of the Immunoglobulin Superfamily, Has Strong Homology with Both the Immunoglobulin V Domain and the β -Chain of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen. *J Biochem* 1990; 107: 316-32.
25. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily.

Cancer Res 1995; 55: 434-9.

26. Kasinrerker W, Fiebigler E, Stefanová I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* 1992; 149: 847-54.
27. Staffler G, and Stockinger H. CD147. *Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14: 327-30.
28. Intasai N, Mai S, Kasinrerker W, Tayapiwatana C. Binding of multivalent CD147 phage induces apoptosis of U937 cells. *Int Immunol* 2006; 18: 1159-69.
29. Misra S, Ghatak S, Zoltan-Jones A, Toole BP. Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem* 2003; 278: 25285-8.
30. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* 2007; 83: 283-95.
31. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (cd147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 2002; 99: 520-8.
32. Misra S, Ghatak S, Zoltan-Jones A, Toole BP. Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem* 2003; 278: 25285-8.
33. Li QQ, Wang WJ, Xu JD, Cao XX, Chen Q, Yang JM, et al. Involvement of CD147 in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs and in vitro invasion in breast cancer cells. *Cancer Sci* 2007; 98: 1064-9.
34. Zou W, Yang H, Hou X, Zhang W, Chen B, Xin X. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells. *Cancer Lett* 2007; 248: 211-8.
35. Kuang YH, Chen X, Su J, Wu LS, Liao LQ, Li D, et al. RNA interference targeting the CD147 induces apoptosis of multi-drug resistant cancer cells related to XIAP depletion. *Cancer Lett* 2009; 276: 189-95.
36. Chiampanichayakul S, Anuchapreeda S, Chruewkamlow N, Mahasongkram K, Thanaratanakorn P, Kasinrerker W. Production of monoclonal antibodies to P-glycoprotein: its application in detection of soluble and surface P-glycoprotein of leukemia patients. *Int J Hematol* 2010; 92: 326-33.
37. Liu F, Xie ZH, Cai GP, Jiang YY. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 2279-83.
38. Bradley G, Ling V. P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13(2): 223-33.
39. Goldstien LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. *J Natl Cancer Inst Journal of the National Cancer Institute* 1989; 81(2): 116-24
40. Kanekura T, Miyauchi T, Tashiro M, Muramatsu T. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct* 1991; 16: 23-30.
41. Chen X, Lin J, Kanekura T, Su J, Lin W, Xie HF, et al. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Res* 2006; 66: 11323-30.