

Real Time Monitoring Cell Proliferation of SW620 Colorectal Cancer Cell Line Following Co-culture with PHA-Stimulated Lymphocytes and CD44 Expression Following Cytotoxic and Apoptotic Induction

Supaporn Suparak* Kanokwan Ngueanchanthong Tawanchay Sangcharoen
Busarawan Sriwanthana and Somchai Sangkitporn

Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand

Abstract

CD44 is a cell surface protein detected in cancer stem cells of colon and other cancer types. This study aimed to real-time monitor cell proliferation by using cell index analysis of SW620 colorectal cancer cell line following co-culture with PHA-stimulated lymphocytes. The effects of anti-CD44 antibody on cell proliferation and CD44 expression following cytotoxic and apoptotic induction were also assessed. The cell proliferation of SW620 cells was decreased by anti-CD44 antibody in dose-dependent manner and more pronounced following co-culture with PHA-stimulated lymphocytes, compared to the untreated SW620 control cells. The expression of CD44 on SW620 cell line was significantly increased after induction of cytotoxicity and apoptosis as compared to the SW620 control cells ($p < 0.05$, paired t -test). Our study demonstrated a role of CD44 on cell proliferation and survival of SW620 cell line. These findings may lead to further applicative study of CD44 and other specific surface markers on colorectal cancer stem cells.

Keywords: Cancer stem cell, SW620 cell line, CD44, Cell cytotoxicity, Apoptosis

*Corresponding author E-mail address: supaporn.su@dmsc.mail.go.th

การตรวจติดตามการเพิ่มจำนวนในสภาพจริงของ เซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟซัยต์ที่ ถูกกระตุ้นด้วย PHA และการแสดงออกของ CD44 หลังจาก เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส

สุภาพร สุภารักษ์* กนกวรรณ เจื่อนจันทร์ทอง ตะวันฉาย แสงเจริญ

บุษราวรรณ ศรีวรรณ และ สมชาย แสงกิจพร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

CD44 เป็นโปรตีนที่ตรวจพบในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้และมะเร็งชนิดอื่นหลายชนิด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจติดตามการเพิ่มจำนวนในสภาพจริงของเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟซัยต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA โดยอาศัยหลักการวัดค่าความต่างศักย์ของเซลล์ (cell index) และตรวจวัดการแสดงออกของ CD44 หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ผลการทดสอบพบว่า การยับยั้งโปรตีน CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งลำไส้ ทำให้การแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของ anti-CD44 antibody เมื่อนำเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ถูกยับยั้งโปรตีน CD44 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟซัยต์ พบว่าค่า cell index ของการแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งลำไส้กลุ่มควบคุม และการแสดงออกของ CD44 เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งลำไส้กลุ่มควบคุม หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส ($p < 0.05$, paired t -test) การศึกษานี้สามารถทดสอบและตรวจติดตามการเพิ่มจำนวนในสภาพจริงของเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 และแสดงให้เห็นความสำคัญของ CD44 ในการแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่อาจมีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และสามารถเป็นต้นแบบการทดลองสำหรับศึกษาวิจัย บทบาทของ CD44 ร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 CD44 สภาวะเซลล์เป็นพิษ สภาวะอะพอพโทซิส

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: supaporn.su@dmsc.mail.go.th

รับบทความ: 16 ตุลาคม 2561

แก้ไขบทความ: 21 พฤศจิกายน 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 16 มกราคม 2562

บทนำ

สาเหตุของการรักษามะเร็งไม่หายขาดและกลับเป็นซ้ำ เกิดจากในเนื้อเยื่อมะเร็งประกอบด้วยเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell) ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัด ทำให้เกิดความรุนแรง และเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของมะเร็ง ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อการรักษา ไม่สามารถกำจัดได้โดยวิธีเคมีบำบัด และทำให้มะเร็งแพร่กระจายไปที่อวัยวะอื่น⁽¹⁻³⁾ วิธีการระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่ใช้กันมาก คือ การวิเคราะห์โปรตีนบ่งชี้ (marker-based analysis) ที่มีความจำเพาะกับการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ (surface marker) ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง แต่ข้อจำกัดของการวิเคราะห์โปรตีนบนผิวเซลล์ คือ โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเซลล์มีการเติบโตเพิ่มจำนวน จึงทำให้ไม่สามารถระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ ทั้งที่มีเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอยู่ ทำให้ผลตรวจวัดมีความแม่นยำต่ำ และจากรายงานวิจัยพบโปรตีนหลายชนิดบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยมะเร็งแต่ละชนิดมีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งแตกต่างกัน อีกทั้งบทบาทความสำคัญของโปรตีนแต่ละชนิดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด⁽³⁾

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจติดตามเซลล์มะเร็งทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง (real-time monitoring) อาศัยหลักการวัดการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าและวัดค่าความต่างศักย์ของเซลล์มะเร็งลำไส้ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงค่า cell index และอัตรา (slope) ของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ มีรายงานวิจัยหลายฉบับตรวจติดตามเซลล์มะเร็งทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริงด้วยเทคนิคนี้และแสดงผลการตรวจติดตามเซลล์ได้อย่างแม่นยำในสภาพจริง⁽⁴⁻⁷⁾

เนื่องจากพบรายงานอุบัติการณ์มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นอันดับสามในประเทศไทย⁽⁸⁾ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบตรวจติดตามเซลล์มะเร็ง

ลำไส้ SW620 หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟซัยต์ทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง โดยอาศัยหลักการวัดการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้า และตรวจติดตามการแสดงออกของ CD44 หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส ด้วยวิธี flow cytometry ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและประสิทธิภาพสูงในการตรวจวัดโปรตีนบนผิวเซลล์⁽⁹⁾ CD44 เป็นโปรตีนทำหน้าที่ยึดเกาะกับผิวเซลล์ และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และกระตุ้นต่อมน้ำเหลือง^(10,11) รายงานวิจัยตรวจพบ CD44 ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งตับอ่อน มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งศีรษะและคอ^(10,12,13) พบรายงานความสัมพันธ์ของ CD44 กับการบุกรุกเซลล์มะเร็งลำไส้ การกระตุ้นระบบต่อมน้ำเหลือง และการดำเนินโรคมะเร็งลำไส้⁽¹⁴⁾ และพบรายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ CD44 สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้^(15,16) นอกจากนี้ มีรายงานว่าเมื่อนำเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ CD44 มาปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง ทำให้เซลล์สัตว์ทดลองเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมใหม่ได้⁽¹⁷⁾

การศึกษานี้ได้ตรวจติดตามเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ในสภาพจริง ร่วมกับการตรวจวัดการแสดงออกของ CD44 เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ให้ผลความจำเพาะและแม่นยำสูง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ในสภาพจริง และทดสอบความสำคัญของ CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งลำไส้ในขณะที่ยังมีการเปลี่ยนแปลงได้ ผลการวิจัยนี้สามารถต่อยอดเพื่อศึกษาบทบาทของ CD44 ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ และเป็นต้นแบบการทดลองสำหรับตรวจติดตามความสำคัญของโปรตีนอื่นในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ได้

วัสดุและวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620, ATCC®CCL227™ human colorectal adenocarcinoma) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco Modified Eagle Medium, 10% v/v fetal bovine serum และ 1% v/v penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) บ่มเซลล์มะเร็งในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเซลล์มะเร็งแบ่งตัว จนได้เซลล์หนาแน่นประมาณร้อยละ 80-90 ของพื้นที่เพาะเลี้ยง จึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและล้างเซลล์ด้วย Dulbecco Phosphate Buffer Saline (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) เติมน้ำละลาย 0.05% trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) เพื่อย่อยให้เซลล์มะเร็งหลุดออกจากผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์มะเร็งในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลาประมาณ 2-5 นาที นำเซลล์ที่หลุดมาทำให้กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่ได้สามารถนำไปเพาะเลี้ยงต่อ หรือนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจติดตามเซลล์มะเร็งลำไส้ในสถานะต่าง ๆ ทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง (real time monitoring)

2.1 การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (cell proliferation)

ตรวจวัดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ $(3-8) \times 10^4$ เซลล์ โดยเติมเซลล์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันลงใน E-plate 16 (ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA, USA) และ

วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์เข้าสู่ภาวะสมดุลแล้วนำเข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument (ACEA Biosciences Inc, San Diego, CA, USA) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เพื่อให้เซลล์เกาะและเพิ่มจำนวน ตรวจสอบการแบ่งตัวของเซลล์โดยวัดค่าสัญญาณความต่างศักย์แบบต่อเนื่องทุก 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ครบเวลาวิเคราะห์การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยโปรแกรม RTCA Analyzer โดยวิเคราะห์ผลกราฟค่า cell index และ อัตราการเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ได้

2.2 การยับยั้งโปรตีน CD44

นำเซลล์มะเร็งลำไส้ความหนาแน่น 8×10^4 เซลล์ เติมน้ำใน E-plate 16 และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลา เติมน้ำ anti-CD44 antibody (RabMab EPR1013Y, Abcam UK) เพื่อยับยั้งโปรตีน CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยทดสอบเพื่อคัดเลือกว่าความเข้มข้น anti-CD44 antibody ที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 µg/mL ที่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเซลล์มะเร็ง นำ E-plate ไปแช่เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 45 นาที ครบเวลา นำ E-plate 16 ออกวางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ ตรวจสอบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม RTCA Analyzer โดยวิเคราะห์กราฟค่า cell index และ อัตราการเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ได้

เซลล์มะเร็งลำไส้กลุ่มควบคุม คือเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ไม่ยับยั้งโปรตีน CD44 และในการทดลอง มีการทดสอบ isotype control ร่วมด้วย (Rabbit IgG, monoclonal EPR25A, Abcam UK)

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าผลการทดสอบที่ได้มีความจำเพาะ

2.3 การเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ที่กระตุ้นด้วย PHA

นำตัวอย่าง leukocyte-enriched buffy coats จากอาสาสมัคร จำนวน 3 ราย มาคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) ด้วย Ficoll-Hypaque นำ PBMC มากระตุ้นด้วย 10 µg/mL phytohemagglutinin (PHA) เป็นเวลา 3 วัน ครบเวลานำ PHA-stimulated lymphocyte ที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน E-plate 16 ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ยับยั้ง CD44 (อัตราส่วนเซลล์มะเร็งลำไส้ : PBMC เท่ากับ 1:1, 1:5 และ 1:20) นำ E-plate 16 เข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ตรวจติดตามเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์มะเร็งลำไส้กลุ่มควบคุม คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ ที่ไม่ยับยั้ง CD44 ครบเวลา วิเคราะห์ข้อมูลการแบ่งตัวรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ ในสภาวะต่างๆ ด้วยโปรแกรม RTCA Analyzer โดยวิเคราะห์กราฟค่า cell index และ อัตราการเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ ในสภาวะต่างๆ

ตัวอย่าง leukocyte-enriched buffy coats ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (เอกสารเลขที่ สล.3228/2555) ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดผู้บริจาคเหลือใช้และได้รับการยินยอมตามกระบวนการบริจาคโลหิต และไม่สามารถระบุถึงตัวบุคคลผู้บริจาคได้ โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือกเลือดผู้บริจาคสุขภาพดีและไม่มีการติดเชื้อไวรัส เอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี และไวรัสตับอักเสบบี

2.4 การกระตุ้นสภาวะเซลล์เป็นพิษ (cell cytotoxicity)

ตรวจวัดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์

มะเร็งลำไส้ในสภาวะเซลล์เป็นพิษโดยเติมเซลล์มะเร็งลำไส้ ความหนาแน่น 3×10^4 เซลล์ ใน E-plate 16 และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เพื่อให้เซลล์เกาะและเพิ่มจำนวน อ่านค่าสัญญาณความต่างศักย์แบบต่อเนื่องทุก 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ครบเวลา เติมนสาร mitomycin-C (MMC) ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 50 µg/mL เพื่อกระตุ้นให้เกิดสภาวะเซลล์เป็นพิษ นำเซลล์เข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C 5%CO₂ และตรวจติดตามเซลล์อย่างต่อเนื่องโดยวัดสัญญาณความต่างศักย์ทุก 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เซลล์มะเร็งลำไส้กลุ่มควบคุม คือเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ไม่กระตุ้นสภาวะเซลล์เป็นพิษ ครบเวลาวิเคราะห์ข้อมูลการแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ในสภาวะเซลล์เป็นพิษด้วยโปรแกรม RTCA Analyzer โดยวิเคราะห์กราฟค่า cell index และ อัตราการเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ได้

2.5 การกระตุ้นสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส

ตรวจวัดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ในสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส โดยเติมเซลล์มะเร็งลำไส้ ความหนาแน่น 3×10^4 เซลล์ ใน E-plate 16 และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลา เติมน (S)-(+)-camptothecin (CPT) ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 µM เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิดสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส นำเซลล์เข้าเครื่อง xCELLigence® RTCA DP instrument ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เซลล์มะเร็งลำไส้

กลุ่มควบคุม คือเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ไม่กระตุ้นสถานะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ตรวจสอบติดตามเซลล์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวิเคราะห์ข้อมูลการแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ในสถานะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ด้วยโปรแกรม RTCA Analyzer โดยวิเคราะห์กราฟค่า cell index และ อัตราการเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ได้

2.6 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งลำไส้ หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส

ตรวจวัดการแสดงออกของ CD44 โดยวิธี flow cytometry หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส โดยย้อมเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วย CD44 antibody ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (anti-Human/mouse CD44-PE, Monoclonal IM7, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ตรวจวัดการแสดงออกของ CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) โดยมีการทดสอบ isotype control ร่วมด้วยในการทดลอง (Rat IgG2b kappa isotype control, PE, eB149/10H5, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าผลการทดสอบที่ได้มีความจำเพาะ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ความแตกต่างของการแสดงออก %CD44 ในกลุ่มเซลล์มะเร็งลำไส้ที่เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์มะเร็งลำไส้ควบคุม (SW620 cell control) ในแต่ละช่วงเวลา คำนวณโดยใช้โปรแกรม Statistic Package for the Social Sciences (SPSS) โดยใช้สถิติ paired *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.005$)

ผลการศึกษา

1. การตรวจติดตามการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อหาความหนาแน่นเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาทดลอง จึงได้ตรวจสอบติดตามเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง ที่ความหนาแน่นเซลล์ตั้งต้นต่างกัน ($3-8 \times 10^4$) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการตรวจสอบพบค่า cell index การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ (Fig. 1A) และอัตราการแบ่งตัว (slope, Fig. 1B) แปรผันตามจำนวนเซลล์ตั้งต้น จึงสามารถคัดเลือกความหนาแน่นเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับศึกษาในแต่ละการทดสอบต่อไป

2. การตรวจติดตามเซลล์มะเร็งลำไส้ ในสถานะเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์และยับยั้ง CD44

2.1 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ที่กระตุ้นด้วย PHA

เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวมีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์มะเร็งไม่ให้แพร่กระจายและเพิ่มจำนวน การทดสอบนี้จึงทำเพื่อตรวจสอบการเพิ่มจำนวนในสภาพจริงของเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ โดยคัดแยกลิมโฟซัยต์จากอาสาสมัครสุขภาพดี มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ในอัตราส่วนต่างกัน ผลทดสอบพบว่าหลังเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ พบค่า cell index การแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงแปรผันตามจำนวนลิมโฟซัยต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งลำไส้กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟซัยต์ (Fig. 2A, Table 1)

Fig.1A

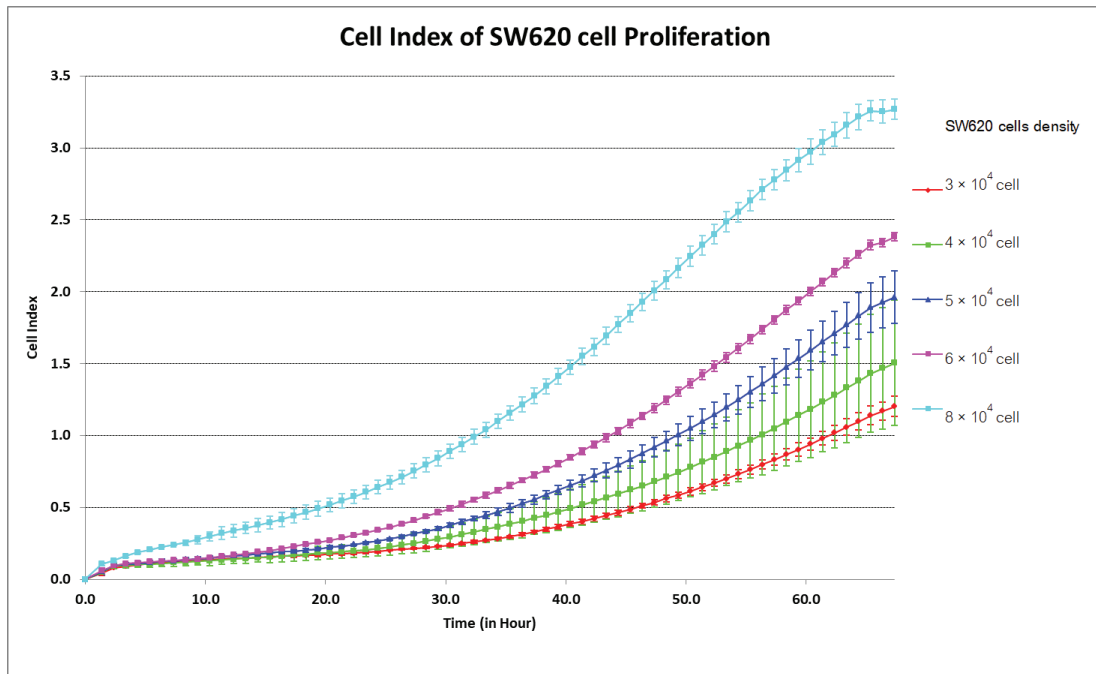


Fig.1B

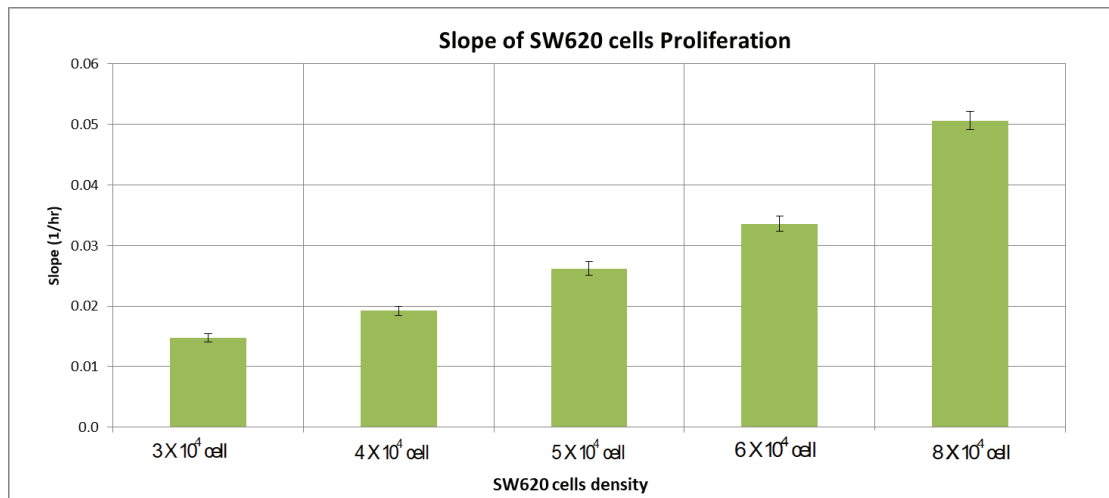


Fig. 1 Real-time monitoring of SW620 cell proliferation started at different cell densities. Cell index (A) and slope (B) of SW620 cell proliferation were cell-density dependent. Results were the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean.

Fig. 2A

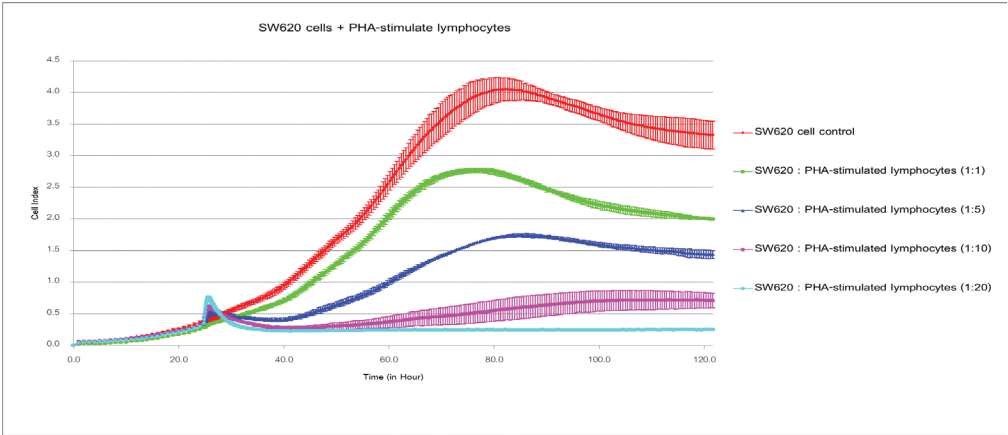


Fig. 2B

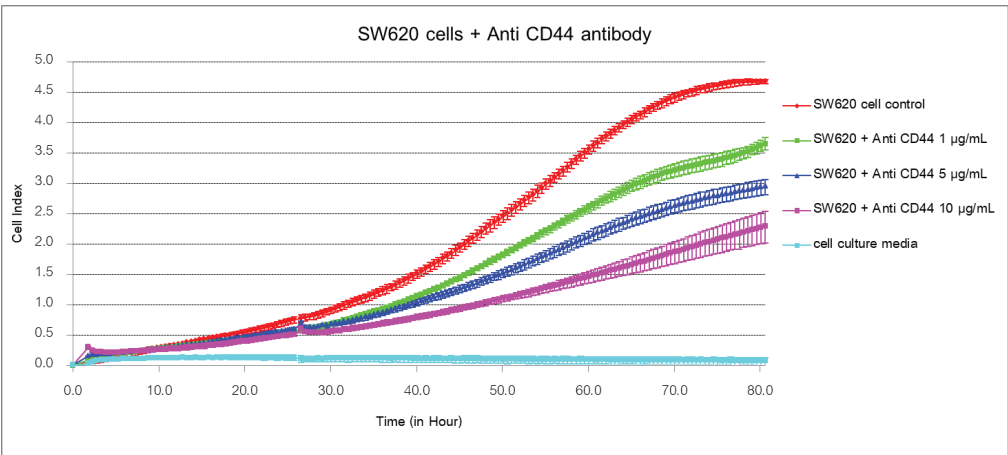


Fig. 2C

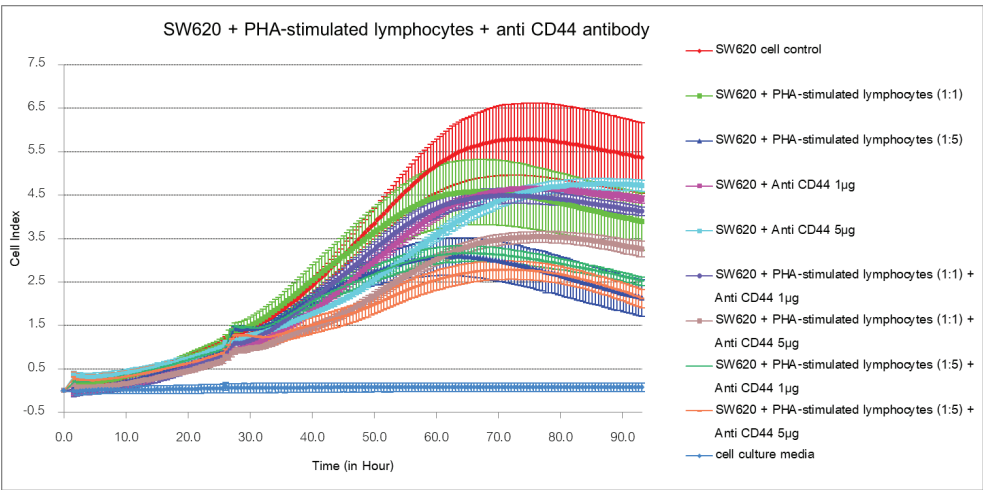


Fig. 2D

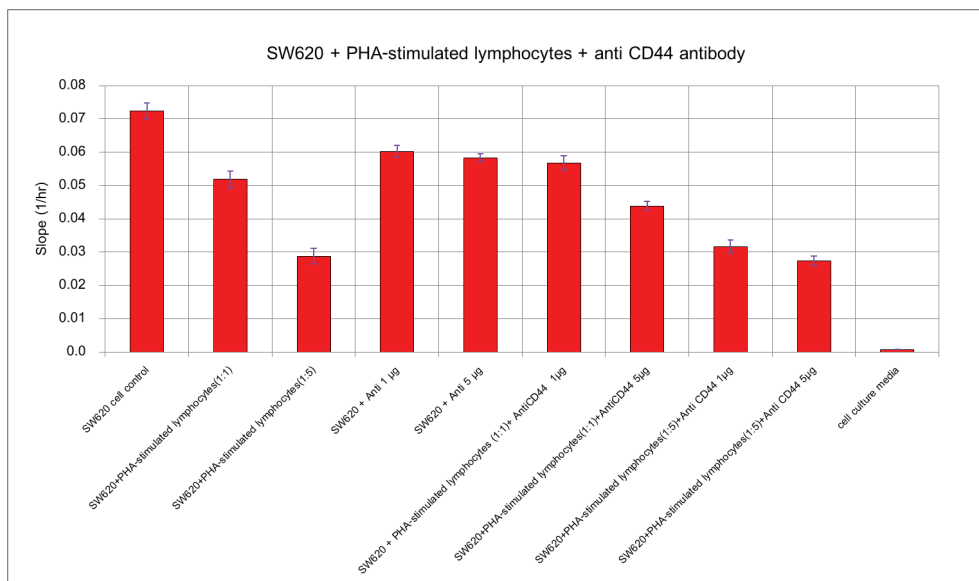


Fig. 2 Real time monitoring of SW620 cells. (A) SW620 cells co-cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMC), (B) SW620 cells blocked with anti-CD44 antibody, (C) Cell index and (D) slope, SW620 cells blocked with anti-CD44 antibody and co-cultured with PHA-stimulated lymphocytes. Results were the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean.

Table 1 Cell index of SW620 cells co-cultured with PHA-stimulated lymphocytes

Time	Cell Index $\pm$ SD		
	24 hrs.	72 hrs.	96 hrs.
SW620 cell control	0.99 $\pm$ 0.06	5.77 $\pm$ 0.82	5.26 $\pm$ 0.79
SW620 + PHA-Stimulated lymphocytes (1:1)	0.97 $\pm$ 0.14	4.52 $\pm$ 0.74	3.80 $\pm$ 0.68
SW620 + PHA-Stimulated lymphocytes (1:5)	0.81 $\pm$ 0.06	2.92 $\pm$ 0.46	2.01 $\pm$ 0.40
SW620 + Anti CD44 1 μ g	0.71 $\pm$ 0.05	4.63 $\pm$ 0.60	4.34 $\pm$ 0.09
SW620 + Anti CD44 5 μ g	0.93 $\pm$ 0.07	4.47 $\pm$ 0.15	4.68 $\pm$ 0.13
SW620 + PHA-Stimulated lymphocytes (1:1) + Anti CD44 1 μ g	0.71 $\pm$ 0.11	4.48 $\pm$ 0.17	4.05 $\pm$ 0.10
SW620 + PHA-Stimulated lymphocytes (1:1) + Anti CD44 5 μ g	0.63 $\pm$ 0.06	3.50 $\pm$ 0.13	3.18 $\pm$ 0.20
SW620 + PHA-Stimulated lymphocytes (1:5) + Anti CD44 1 μ g	0.88 $\pm$ 0.02	3.09 $\pm$ 0.16	2.41 $\pm$ 0.10
SW620 + PHA-Stimulated lymphocytes (1:5) + Anti CD44 5 μ g	0.79 $\pm$ 0.16	2.77 $\pm$ 0.21	1.90 $\pm$ 0.24
cell culture media	0.05 $\pm$ 0.10	0.08 $\pm$ 0.10	0.08 $\pm$ 0.09

2.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะยับยั้งโปรตีน CD44

การศึกษาความสำคัญ CD44 ในเซลล์มะเร็งรังไข่ทำได้โดยการทดสอบยับยั้งโปรตีน CD44 ในเซลล์มะเร็งรังไข่ด้วย anti-CD44 antibody ที่ความเข้มข้นต่างกัน และตรวจติดตามการแบ่งตัวเซลล์มะเร็งรังไข่เป็นเวลาต่อเนื่อง พบค่า cell index การแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งรังไข่ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของ anti-CD44 antibody เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งรังไข่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ยับยั้ง CD44 และผลทดสอบ isotype control ไม่มีผลยับยั้ง CD44 เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าผลการทดสอบที่ได้มีความจำเพาะ (Fig. 2B, Table 1)

2.3 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยต์ และยับยั้งโปรตีน CD44

การทดสอบความสำคัญ CD44 ในการหลบหนีการทำลายจากเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยต์ ทำโดยการตรวจติดตามการแบ่งตัวเซลล์มะเร็งรังไข่หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับลิ้มโฟซัยต์และยับยั้งโปรตีน CD44 ในอัตราส่วนต่างกัน พบค่า cell index การแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งรังไข่ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของ anti-CD44 antibody และจำนวนลิ้มโฟซัยต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งรังไข่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับลิ้มโฟซัยต์ (Fig. 2C, 2D, Table 1) ผลการศึกษานี้อาจเกิดจากการยับยั้ง CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งรังไข่ทำให้การแบ่งตัวรอดชีวิตลดลง และส่งผลให้เซลล์มะเร็งรังไข่ถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยต์เพิ่มมากขึ้น

3. การตรวจติดตามเซลล์มะเร็งรังไข่ ในสภาวะเซลล์เป็นพิษและสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส

การศึกษาเพื่อทดสอบความสำคัญของ CD44 ต่อการแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งรังไข่

SW620 ในสภาวะเซลล์เป็นพิษทำโดยการเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งรังไข่ให้เกิดความเป็นพิษ ด้วย mitomycin C (MMC) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยกระตุ้นด้วย camptothecin ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และตรวจติดตามการแบ่งตัวเซลล์มะเร็งรังไข่ เป็นเวลาต่อเนื่อง 96 ชั่วโมง ผลทดสอบ พบค่า cell index การแบ่งตัวและรอดชีวิตเซลล์มะเร็งรังไข่ลดลงในสภาวะเซลล์เป็นพิษและสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส แปรผันตามความเข้มข้นของ MMC และ CPT ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งรังไข่กลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่สภาวะเซลล์เป็นพิษและตายแบบอะพอพโทซิส (Fig. 3A, B)

ผลการตรวจวัด %CD44 ด้วยวิธี flow cytometry ที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งรังไข่กลุ่มควบคุม พบว่าในสภาวะเซลล์มะเร็งรังไข่เป็นพิษ หลังจากกระตุ้นด้วย mitomycin-C ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ค่า %CD44 สูงขึ้น ($p < 0.05$, paired t -test) และในสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส หลังจากกระตุ้นด้วย camptothecin ความเข้มข้น 2 และ 4 μM ค่า %CD44 สูงขึ้น ที่เวลา 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$, paired t -test) (Table 2, Fig. 4) แสดงให้เห็นว่า CD44 อาจมีบทบาทในการแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งรังไข่ในสภาวะเซลล์เป็นพิษและสภาวะเซลล์ตายแบบ อะพอพโทซิส

วิจารณ์

การศึกษานี้ตรวจวัดปริมาณ CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งรังไข่ด้วยวิธี flow cytometry และตรวจติดตามการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และรอดชีวิตเซลล์มะเร็งรังไข่ ทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง ในสภาวะเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยต์ สภาวะ

การตรวจติดตามการเพิ่มจำนวนในสภาพจริงของเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับลิพิดที่ถูกรกระตุ้นด้วย PHA และการแสดงออกของ CD44 หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิส 6877

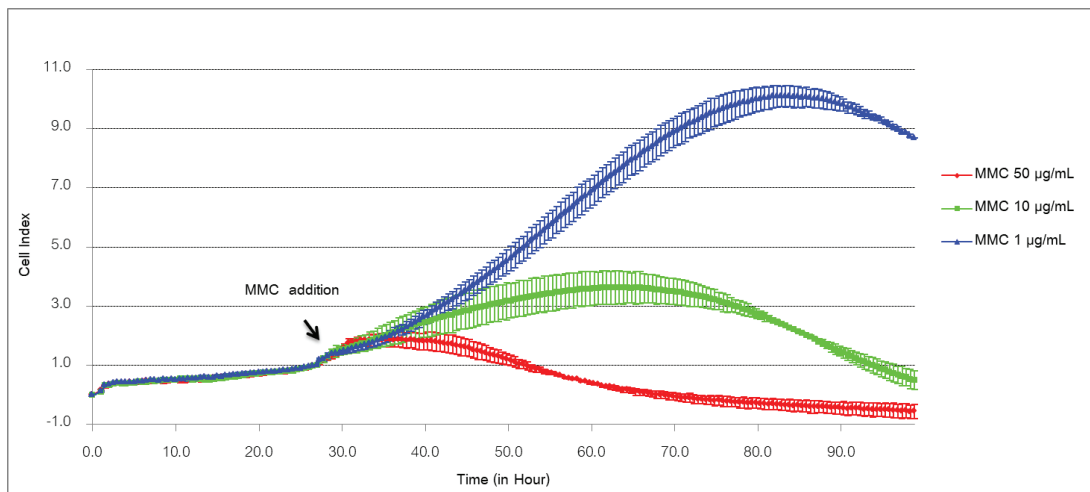


Fig. 3A Reduction of SW620 cell index after induction of cytotoxicity is MMC dose dependent. Results were the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean

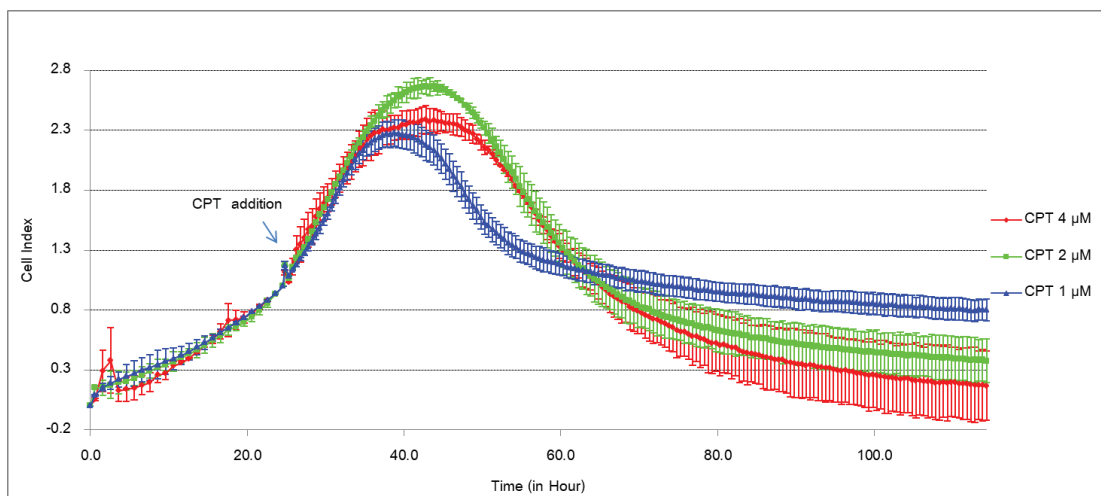


Fig. 3B Reduction of SW620 cell index after induction of apoptosis is CPT dose dependent. Results were the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean

Fig. 3 Real-time monitoring of SW620 after induction of cytotoxicity (A) and apoptosis (B)

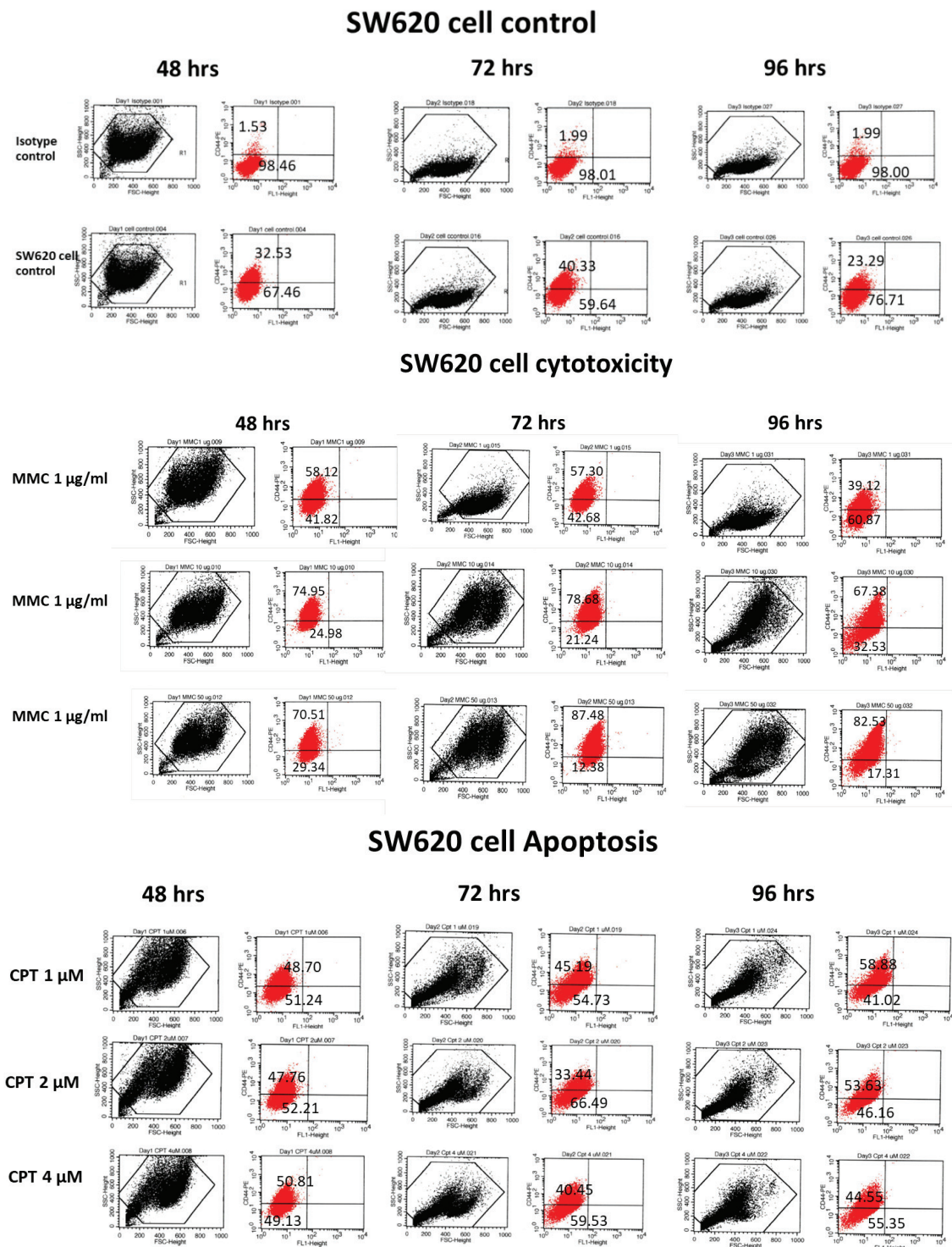


Fig. 4 The percentage of CD44 expression on SW620 cell control, SW620 cell cytotoxicity and SW620 cell apoptosis. Data showed FACS plots of SW620 cells stained with anti CD44-PE antibody selected from one of three independent experiments

Table 2 The percentages of CD44 in SW620 cell lines in the induction of cytotoxicity and apoptosis experiments. Results were the average of three independent experiments. *, $p < 0.005$, paired t -test (SW620 cell control vs treated cells at different time)

Time (hrs)	SW620 cell control	%CD44					
		SW620 cell control cytotoxicity			SW620 cell Apoptosis		
		MIMC 1 $\mu\text{g/ml}$	MIMC 10 $\mu\text{g/ml}$	MIMC 50 $\mu\text{g/ml}$	cpt 1 μm	cpt 2 μm	cpt 4 μm
48	36.26	66.30*	75.81*	82.61*	57.87	57.81	63.77
72	47.17	57.30*	84.27*	87.73*	65.92	34.01	63.58
96	23.24	37.53*	70.98*	71.60*	46.13	53.99*	47.80*

เซลล์เป็นพิษ (cytotoxicity) และสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสด้วยหลักการวัดค่าความต่างศักย์ของเซลล์ทำให้สามารถตรวจติดตามเซลล์ได้อย่างจำเพาะและมีความแม่นยำสูง และเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องน่าเชื่อถือและไม่มีความแปรปรวนจากปัจจัยภายในเซลล์ ทุกครั้งก่อนทดสอบได้ตรวจสอบคุณสมบัติและคุณสมบัติของเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณลักษณะไม่แตกต่างกันในทุกการทดสอบ ทำให้ผลตรวจติดตามเซลล์ที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำ

ผลการศึกษาพบว่า การยับยั้งโปรตีน CD44 บนผิวเซลล์มะเร็งลำไส้ ทำให้จำนวนและอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลง แปรผันตามความเข้มข้นของ anti-CD44 antibody แสดงให้เห็นว่า CD44 อาจมีบทบาทในการแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ และเมื่อนำเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ยับยั้งโปรตีน CD44 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ถูกทำลายเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง CD44 ทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้แบ่งตัวและรอดชีวิตลดลง เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์จึงอาจถูกทำลายมากขึ้น หรือ CD44 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้ง

เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ และทำให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบปริมาณ CD44 เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้^(15, 16) และพบรายงานความสำคัญของ CD44 ในการบุกรุกเซลล์ มะเร็งลำไส้ส่งผลกระทบต่อมน้ำเหลืองและทำให้การดำเนินโรคมะเร็งลำไส้เพิ่มมากขึ้น⁽¹⁴⁾ และการวิจัยในสัตว์ทดลอง พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ถูกยับยั้ง CD44 และนำมาปลูกถ่ายในหนูทดลอง ทำให้ความรุนแรงของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูทดลองลดลง⁽¹⁸⁾

ผลตรวจวัด CD44 พบปริมาณเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งลำไส้สภาวะเซลล์เป็นพิษ และสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส แสดงให้เห็นว่า CD44 อาจมีบทบาทความสำคัญในการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ในสภาวะเซลล์เป็นพิษหรือเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส อาจเกิดจาก CD44 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ดังเช่นที่มีการตรวจพบในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งผิวหนัง^(19, 20) หรือ CD44 ในเซลล์มะเร็งลำไส้มีบทบาทในการขนส่งและถ่ายทอดสัญญาณระหว่างเซลล์ชนิดอื่นและเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจาย

และต่อการรักษา ดังรายงานวิจัยที่พบในมะเร็งตับอ่อน⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตาม ควรศึกษาวิจัยต่อยodobทบาทและกลไกความสำคัญ CD44 ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ต่อไป

การตรวจติดตามคุณสมบัติและความสำคัญของ CD44 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ในสภาวะเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ สภาวะเซลล์เป็นพิษ (cytotoxicity) และสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสนี้ สามารถเป็นต้นแบบการทดลองเพื่อนำไปศึกษาวิจัยต่อยodobทบาทและทดสอบบทบาทความสำคัญของโปรตีนอื่นบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ร่วมด้วย เช่น CD133, CD66 และ CD24⁽³⁾ เพื่อสามารถตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโปรตีนบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ในสภาพจริง และศึกษาความสำคัญที่แน่ชัดได้ต่อไป

สรุป

การศึกษานี้สามารถตรวจติดตามการเพิ่มจำนวนในสภาพจริงของเซลล์มะเร็งลำไส้ และทดสอบความสำคัญของ CD44 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ขณะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงได้ ผลการตรวจติดตามการยับยั้งโปรตีน CD44 ในเซลล์มะเร็งลำไส้หลังเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์พบการแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลง และพบปริมาณ CD44 เพิ่มมากขึ้นในสภาวะเซลล์เป็นพิษและสภาวะเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส แสดงให้เห็นบทบาทความสำคัญของ CD44 ในการแบ่งตัวและรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่อาจเป็นสาเหตุทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้แพร่กระจายและต่อการรักษา การศึกษานี้สามารถเป็นต้นแบบการทดลองสำหรับนำไปตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ในแต่ละสภาวะที่สนใจศึกษา โดยร่วมกับการตรวจวัดโปรตีนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง จึงควรศึกษาต่อยodobทบาทของ CD44 ร่วมกับโปรตีนอื่นในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

ลำไส้ เพื่อนำไปพัฒนาป้องกันการแพร่กระจายและกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณ นางสาวสิริลดา พิมพา ผู้ช่วยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในห้องปฏิบัติการบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

1. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 781-6.
2. Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 307-19.
3. Punjaruk W. Cancer Stem Cells: Perspective application in cancer. *Srinagarind Med J* 2015; 30: 164-74. (in Thai)
4. Erskine CL, Henle AM, Knutson KL. Determining optimal cytotoxic activity of human Her2neu specific CD8 T cells by comparing the Cr51 release assay to the xCELLigence system. *J Vis Exp* 2012; 8: 1-6.
5. Cai C, Rodepeter FR, Rossmann A, *et al.* SIVmac239-Nef down-regulates cell surface expression of CXCR4 in tumor cells and inhibits proliferation, migration and angiogenesis. *Anticancer Res* 2012; 32: 2759-68.

6. Böhmert L, Niemann B, Thünemann AF, Lampen A. Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1107-15.
7. Visagie M, Mqoco T, Joubert A. Sulphamoylated estradiol analogue induces antiproliferative activity and apoptosis in breast cell lines. *Cell Mol Biol Lett* 2012; 17: 549-58.
8. National Cancer Institute, Thailand. Hospital-based cancer registry annual report 2017. Bangkok: Pornsup Printing Company; 2018. (in Thai)
9. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry* 2012; 81: 284-93.
10. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JL. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
11. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998; 51: 191-200.
12. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007; 58: 267-84.
13. Chen K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 732-40.
14. Huh JW, Kim HR, Kim YJ, *et al.* Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. *Pathol Int* 2009; 59: 241-6.
15. Fernández JC, Vizoso FJ, Corte MD, *et al.* CD44s expression in resectable colorectal carcinomas and surrounding mucosa. *Cancer Invest* 2004; 22: 878-85.
16. Du L, Wang H, He L, *et al.* CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6751-60.
17. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-8.
18. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 2006; 12: 1167-74.
19. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, *et al.* Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on β -catenin signalling. *Nature* 2008; 452: 650-3.
20. Gerson SL, Reese J, Kenyon J. DNA repair in stem cell maintenance and conversion to cancer stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2006; 231-44.
21. Abel EV, Kim EJ, Wu J, *et al.* The Notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PLoS One* 2014; 9: 1-13.