ผลของการยับยั้ง mitotic checkpoint ต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A

The Effect of Mitotic Checkpoint Inhibition on Radiosensitivity of Cervical Cancer Cell Line C-33A

โสวิชญา หัวคำ (Sowitchaya Huakham)* ดร.ดนุพล นันทจิต (Dr.Danupon Nantajit)**
ดร.อรุณี เหมะธุลิน (Dr.rer.nat.Arunee Hematulin)***

บทคัดย่อ

Mitotic checkpoint เป็นกลไกที่สำคัญในการป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในขณะที่เซลล์ทำการแบ่งตัวแบบไมโทซิส มีรายงานว่าประสิทธิภาพของ DNA damage checkpoints มีผลกระทบต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง แต่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนว่า mitotic checkpoint มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็งหรือไม่ งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาว่าประสิทธิภาพของ mitotic checkpoint มีผลต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หรือไม่ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของ mitotic checkpoint ของเซลล์ C-33A ในการตอบสนองต่อยาพาคลิแทคเซล จากการตรวจสอบการกระจายตัวของเซลล์ตามวัฏจักรเซลล์ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังได้รับยาพาคลิแทคเซล พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระยะ G_2/M อย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ C-33A มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติ และเมื่อทำการทดสอบการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ C-33A หลังการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 พบว่าการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ C-33A ที่ได้รับสาร NMS-P715 ไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ C-33A ที่ไม่ได้รับสาร NMS-P715 และยังพบว่าการได้รับสาร NMS-P715 ไม่ส่งผลกระทบต่อรูปแบบการตายหลักหลังการได้รับรังสี งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อรังสีและรูปแบบการตายของเซลล์ C-33A หลังจากได้รับรังสีเอกซ์

ABSTRACT

Mitotic checkpoint is one of the most important failsafe mechanisms during mitosis cell division. It has been welled documented that the efficiency of DNA damage checkpoints effect radiosensitivity of cancer cell. Nevertheless, the role of mitotic checkpoint on the radiosensitivity of cancer cell has never been investigated. In this study, we assessed whether the proficiency of mitotic checkpoint has an impact on the radiosensitivity of cervical cancer cell line C-33A. We determined mitotic checkpoint proficiency of C-33A cell in response to Paclitaxel treatment. We found that the proportion of the cells in G_2/M phases strikingly increased as determined at 48 and 72 hours after treatment. This result indicated an intact function of mitotic checkpoint of C-33A cell. We further investigated the effect of mitotic checkpoint inhibition on the radiosensitivity of C-33A cell by using NMS-P715. The result showed that mitotic checkpoint inhibition did not affect cellular radiosensitivity of C-33A cell. Furthermore, we evaluated the mode of cell death by using NMS-P715. We found that mitotic checkpoint inhibition did not change the mode of cell death of C-33A cell after using mitotic checkpoint inhibition. In conclusion, inhibition of mitotic checkpoint had no impact on radiosensitivity and mode of cell death of C-33A cell after x-ray irradiation.

คำสำคัญ: จุดตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ การตอบสนองต่อรังสีของเซลล์

Keywords: Cell cycle checkpoints, Cellular radiosensitivity

** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

*** อาจารย์ คณะแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์*

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชารังสีเทคนิค คณะสเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

บทนำ

การรักษามะเร็งด้วยรังสีเป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานในการรักษามะเร็ง โดยประสิทธิภาพของการรักษาขึ้นอยู่กับการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง กล่าวคือมีประสิทธิภาพของการรักษาสูงในมะเร็งที่มีความไวต่อรังสีมาก แต่มีประสิทธิภาพของการรักษาต่ำในมะเร็งที่ดื้อต่อรังสี (Orth et al., 2014) การตอบสนองต่อรังสีนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งประสิทธิภาพการทำงานของ cell cycle checkpoints เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความไวต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง (Pawlik, Keyomarsi, 2004; Hematulin et al., 2014) โดย DNA damage checkpoints ทำหน้าที่ยับยั้งวัฏจักรเซลล์เพื่อให้เซลล์มีเวลาในการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ นอกจากนั้น DNA damage checkpoints ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายเมื่อความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอมีความรุนแรงจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ (Barnum, O'Connell, 2014) โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งมักมีความบกพร่องของ G_1 checkpoint ทำให้เซลล์สูญเสียกลไกในการยับยั้งวัฏจักรเซลล์และกลไกการตายของเซลล์ในระยะ G_1 ส่งผลให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อรังสี (Kim et al., 2015) และหากเซลล์มะเร็งชนิดนั้นมีการทำงานของ G_2 checkpoint ที่ปกติ G_2 checkpoint ก็จะเป็นกลไกหลักในการยับยั้งการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับรังสี แต่ถ้าหากเซลล์มะเร็งชนิดนั้นมีความบกพร่องของ G_2 checkpoint เซลล์ก็จะมีความไวต่อรังสีมากขึ้น เนื่องจากเซลล์ที่ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายจากการได้รับรังสีจะทำการแบ่งตัวโดยที่ความเสียหายของดีเอ็นเอยังไม่มีการซ่อมแซม ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายในขณะที่กำลังแบ่งตัวหรือตายหลังจากแบ่งตัวไปแล้ว (Vance et al., 2011; Bridges et al., 2016)

นอกจาก DNA damage checkpoints แล้ว เซลล์ในระยะไมโทซิสยังมี mitotic checkpoint ซึ่งทำหน้าที่ในการป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในขณะที่เซลล์ทำการแบ่งตัว โดยทำหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของการยึดเชื่อมกันระหว่างเส้นใยสปินเดิลและไคนีโตคอร์ และตรวจสอบความสมดุลย์ของแรงดึงในการแยกโครโมโซม ซึ่งหากตรวจพบความเสียหาย mitotic checkpoint จะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์จนกว่าความเสียหายนั้นจะถูกซ่อมแซมให้เป็นปกติหรือหากไม่สามารถทำการซ่อมแซมได้ mitotic checkpoint จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Burgess et al., 2014; Ferrari, Gentili, 2016) ความเกี่ยวข้องระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของ DNA damage checkpoints ต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Ahmed et al., 2015; Wang et al., 2015) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนว่าการทำงานของ mitotic checkpoint มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็งหรือไม่ งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาว่าประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint มีผลต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หรือไม่ โดยทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองต่อรังสีเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 ในเซลล์ C-33A ที่มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติกับเซลล์ C-33A ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 โดยผลที่ได้จากการทดลองจะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญซึ่งอาจสามารถนำไปสู่การศึกษาต่อยอดและการประยุกต์ใช้ในการรักษามะเร็งเพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยมะเร็งในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในศึกษานี้คือเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ C-33A โดยเป็นเซลล์ทางการค้าของบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี แต่มีความผิดปกติของขนาดโปรตีน retinoblastoma และมีการกลายพันธุ์ของยีน TP53 แบบ point mutation จากการเปลี่ยนแปลงลำดับของโปรตีนอาร์จีนีนไปเป็นโปรตีนซีสทีน (McCormack et al., 2013) โดยเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการเติม sodium bicarbonate 0.25%, heat-inactivated FBS 10%, streptomyces 1% (100 µg/mL) และ penicillin 1% (100 U/mL) ในตู้เพาะเลี้ยง ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

การให้สารแก่เซลล์เพาะเลี้ยง

การให้ยาแพคลิแทกเซล (Paclitaxel) เพื่อกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A โดยละลายยาพาคลิแทคเซลในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปใช้ในการทดลอง

การให้สาร NMS-P715 เพื่อยับยั้งทำงานของ mitotic checkpoint แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A โดยละลายสาร NMS-P715 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปฉายรังสีและใช้ในการทดลอง

การฉายรังสีแก่เซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการฉายรังสีให้แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ด้วยเครื่องเร่งอนุภาคแนวตรงยี่ห้อ Varian รุ่น Trilogy ณ แผนกรังสีรักษา โรงพยาบาลจุฬาภรณ์ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร ด้วยโฟตอนพลังงาน 6 เมกะโวลต์ อัตราการแผ่รังสี 600 MU/min พื้นที่ลำรังสี 25x25 ตารางเซนติเมตร ด้วยเทคนิค source to axis distance (SAD technique) ใช้ back scatter ขนาด 5 เซนติเมตร ด้วยเทคนิคการฉายรังสีแบบครั้งเดียว ปริมาณรังสี 2 เกรย์ (212 MU), 4 เกรย์ (424 MU), 6 เกรย์ (636 MU) และ 8 เกรย์ (848 MU) โดยการฉายรังสีให้แก่เซลล์ในการทดลองใช้ปริมาณรังสี 4 เกรย์

การวิเคราะห์การกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี

หลังให้ยาแพคลิแทกเซลเพื่อกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A จากนั้นทำการเก็บเซลล์ตามระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการให้ยาพาคลิแทคเซล โดยทำการตรึงและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพด้วยเอทานอลที่เย็นจัดความเข้มข้น 70% แล้วเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำเซลล์ไปวิเคราะห์การกระจายตัวของเซลล์ ทำการล้างและปั่นเซลล์ด้วย PBS จากนั้นย้อมนิวเคลียสด้วยสารละลายโพรพริเดียมไอโอไดด์ (PI) ที่ประกอบด้วย PI, RNase A และ Na-citrate ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงจากแสงเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

การศึกษาสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยการทดสอบการสร้างโคโลนี

ให้สาร NMS-P715 ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปฉายรังสีด้วยเทคนิคการฉายรังสีแบบครั้งเดียว ปริมาณรังสี 0, 2, 4, 6 และ 8 เกรย์ หลังการฉายรังสีทำการล้างสาร NMS-P715 ออกด้วย PBS จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 13 วัน จนกระทั่งสามารถมองเห็นโคโลนีของ

เซลล์ที่รอดชีวิตได้ด้วยตาเปล่า โดยใน 1 โคโลนีต้องมีจำนวนเซลล์ไม่น้อยกว่า 50 เซลล์ หลังการนับโคโลนีคำนวณหาประสิทธิภาพในการเลี้ยงเซลล์ และคำนวณหาสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์โดยพิจารณาจากปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตร้อยละ 37 (D_{37}) จากจำนวนตั้งต้น

การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีจากลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียส

ให้สาร NMS-P715 ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปฉายรังสีปริมาณ 0 หรือ 4 เกรย์ หลังการฉายรังสีทำการล้างสาร NMS-P715 ออกด้วย PBS แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ โดยเริ่มจากการตรึงและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพด้วยเมทานอลที่เย็นจัดความเข้มข้น 90% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเมทานอลออกด้วย PBS แล้วย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33342 บ่มที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงจากแสงเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นประกบแผ่นกระจกเข้ากับแผ่นสไลด์ด้วย anti-faded solution แล้วประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 40X จากการถ่ายภาพแบบสุ่มทั่วทั้งแผ่นสไลด์ การประเมินรูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีจากลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสจากนิวเคลียสอย่างน้อย 500 เซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยประเมินรูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีตามวิธีการของ Amornwichet N (Amornwichet et al., 2014) โดยการตายแบบ apoptosis ลักษณะของนิวเคลียสติดสีเข้มและพบชิ้นส่วนของ apoptotic bodies การตายแบบ mitotic catastrophe ลักษณะของนิวเคลียสติดสีเป็นพูโดยมีจำนวนมากกว่า 2 พูขึ้นไป และการตายแบบ senescence ลักษณะของนิวเคลียสติดสีไม่สม่ำเสมอและพบการติดสีของขอบเซลล์จาง ๆ

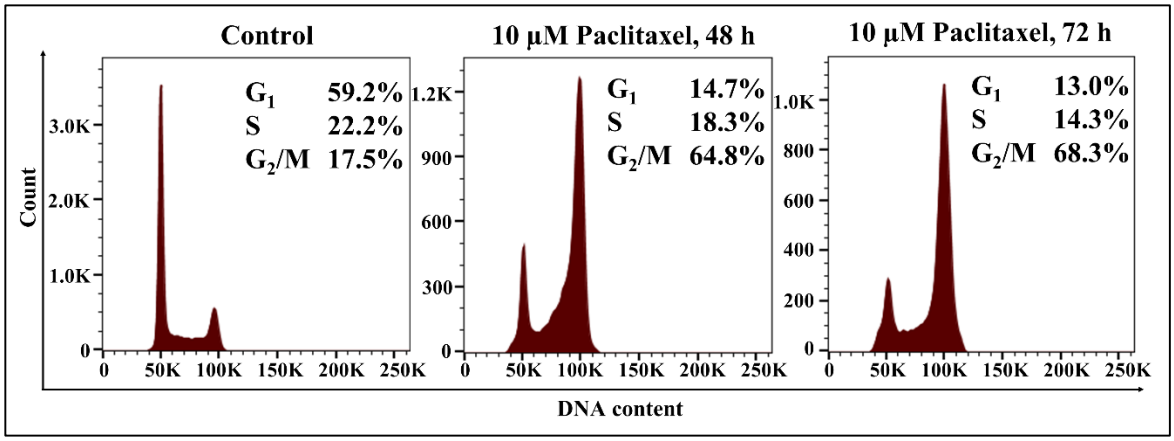
การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์แสดงในรูปของร้อยละ ข้อมูลการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สร้างกราฟสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ในรูปแบบเอกซ์โพเนนเชียล จากนั้นคำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตร้อยละ 37 จากจำนวนตั้งต้น และหาความแตกต่างของสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p \leq 0.05$) และข้อมูลรูปแบบการตายของเซลล์จากลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสแสดงในรูปของร้อยละจากค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

ประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ในการยับยั้งการดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์หลังได้รับยาพาคลิแทคเซล

การกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทคเซลมีการกระจายตัวของเซลล์ในระยะ G_1, S และ G_2/M เท่ากับ 59.2%, 22.2% และ 17.5% ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับยาพาคลิแทคเซลเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง มีการหยุดในระยะ G_2/M โดยมีสัดส่วนประชากรของเซลล์ในระยะ G_2/M เท่ากับ 64.8% และ 68.3% ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทคเซล ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า mitotic checkpoint ของเซลล์ C-33A มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์หลังได้รับยาพาคลิแทคเซล

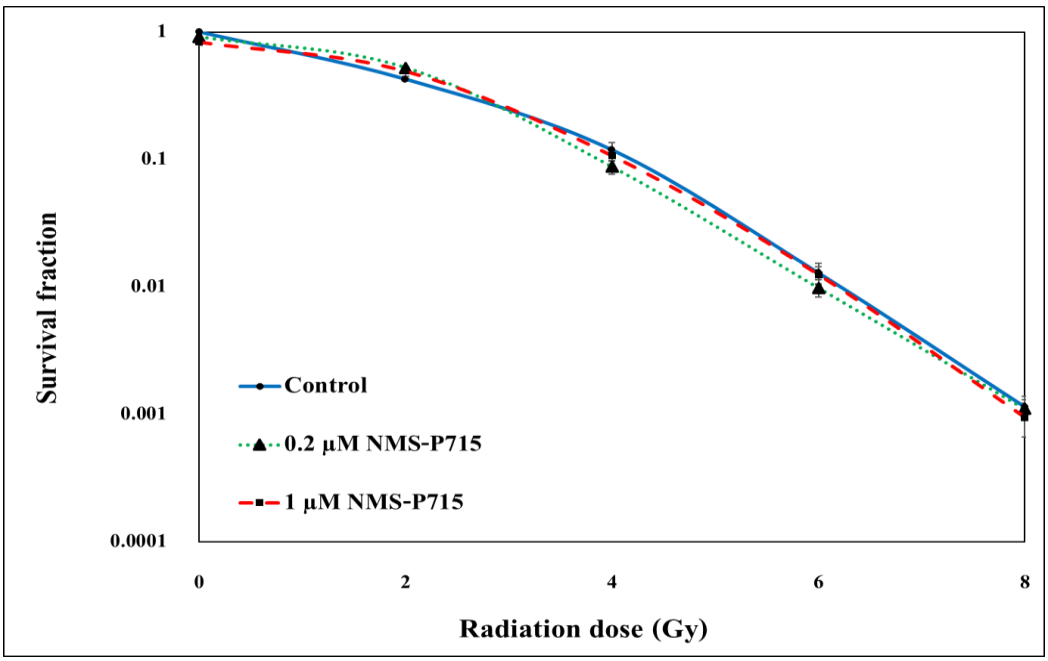


รูปที่ 1 การกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังได้รับยาพาคลิแทคเซลที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทคเซล (Control) และเซลล์ที่ได้รับยาพาคลิแทคเซล ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (10 µM Paclitaxel)

ประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A

ในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ว่ามีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์หรือไม่ สามารถศึกษาโดยการเปรียบเทียบความไวต่อรังสีของเซลล์ระหว่างเซลล์ C-33A ที่มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติกับเซลล์ C-33A ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 โดยประเมินจากความสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์หลังได้รับรังสี

สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าเซลล์ที่ได้รับรังสีเพียงอย่างเดียว และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่าของปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตร้อยละ 37 จากจำนวนตั้งต้น เท่ากับ 1.85±0.07, 1.78±0.09 และ 1.80±0.10 เกรย์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p \leq 0.05$) พบว่าสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.583$) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ C-33A

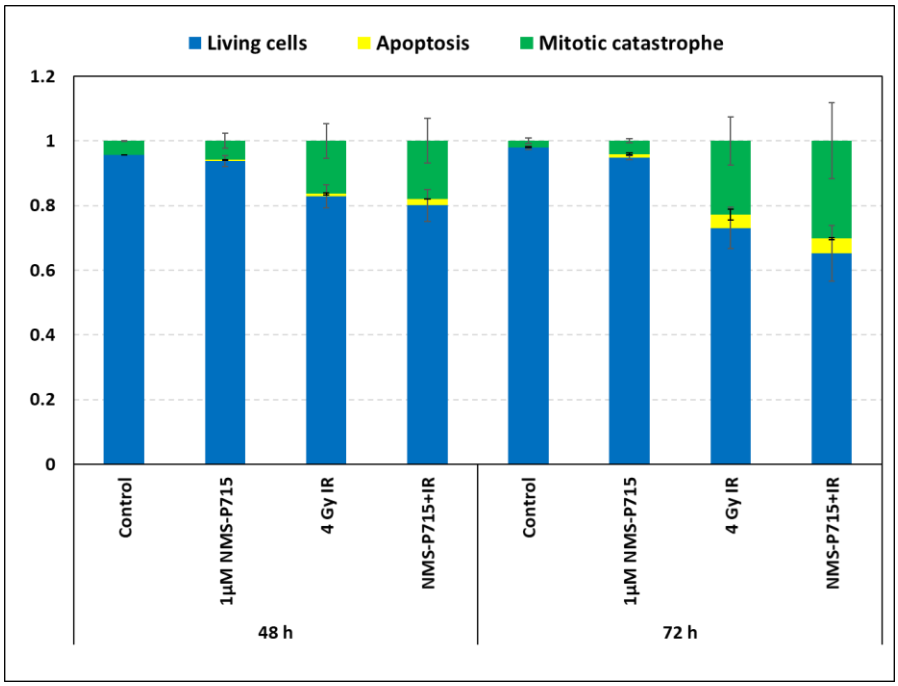


รูปที่ 2 สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ที่ได้รับรังสีเพียงอย่างเดียว (Control) เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ ก่อนการได้รับรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (0.2 และ 1 µM NMS-P715 ตามลำดับ)

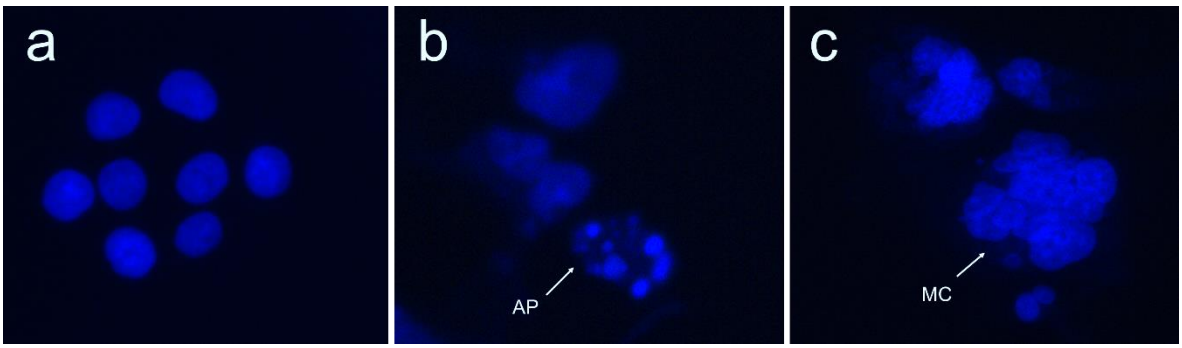
รูปแบบการตายของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสี

ลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสีดังแสดงในรูปที่ 3 ลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิตดังแสดงในรูปที่ 3 (a) เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis มีลักษณะของนิวเคลียสติดสีเข้มและพบชิ้นส่วนของ apoptotic bodies ดังแสดงในรูปที่ 3 (b) เซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe มีลักษณะของนิวเคลียสขนาดใหญ่ เกิดการติดสีเป็นพูโดยมีการติดสีของนิวเคลียสมากกว่า 2 พู และพบลักษณะของนิวเคลียสขนาดเล็กดังแสดงในรูปที่ 3 (c) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับทั้งรังสีและสาร NMS-P715 พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 95.70±0.04 และ 4.30±0.06 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 93.77±1.67, 0.40±0.09, 5.83±2.28 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 82.92±3.57, 0.69±0.31, 16.39±5.35 ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสี พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 80.03±4.87, 2.00±0.02, 17.96±6.91 ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับทั้งรังสีและสาร NMS-P715 พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 97.86±0.51, 0.16±0.10, 1.97±0.82 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 94.80±0.60, 1.16±0.26, 4.04±0.59 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต

เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 73.09±6.47, 4.18±1.65, 22.74±7.50 ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสี พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 65.17±8.58, 4.65±0.35, 30.18±11.78 ตามลำดับ โดยรูปแบบการตายหลักของเซลล์หลังการได้รับรังสีเป็นการตายแบบ apoptosis และ mitotic catastrophe



รูปที่ 3 ร้อยละของรูปแบบการตายของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสีที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับทั้งรังสีและสาร NMS-P715 (Control) เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1 µM NMS-715) เซลล์ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ (4 Gy IR) และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ (NMS-715+IR)



รูปที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสี โดย (a) คือลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต (b) คือเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis (AP) และ (c) คือเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe (MC)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

ประสิทธิภาพของการฉายรังสีเพื่อรักษามะเร็งขึ้นอยู่กับการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง โดยประสิทธิภาพการทำงานของ cell cycle checkpoints เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง (Pawlik, Keyomarsi, 2004; Hematulin et al., 2014) โดย DNA damage checkpoints ทำหน้าที่ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส (Shaltiel et al., 2015) แต่เมื่อเซลล์ผ่านจากระยะอินเตอร์เฟสไปยังระยะไมโทซิสแล้ว mitotic checkpoint จะที่ทำหน้าที่ในการตรวจสอบความพร้อมของเซลล์ก่อนที่จะทำการแบ่งตัว (Liu, Zhang, 2016) มีรายงานว่าเซลล์ที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอเมื่อผ่านเข้าสู่ระยะไมโทซิส เซลล์จะมีกลไกในการตรวจจับความผิดปกติและมีการส่งต่อสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอในระยะถัดไปหลังจากเซลล์ทำการแบ่งตัวไปแล้ว แต่ถ้าหากความเสียหายของดีเอ็นเอมีความรุนแรง เซลล์จะเกิดการตายขณะที่กำลังแบ่งตัว (Ferrari, Gentili, 2016) แต่ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจนว่าการตรวจจับดีเอ็นเอที่มีความเสียหาย และกลไกการตายของเซลล์ในระยะไมโทซิสมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพทำงานของ mitotic checkpoint หรือไม่

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A สามารถทำได้โดยวิเคราะห์จากการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีหลังการกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยยาพาคลิแทคเซลซึ่งเข้าจับกับ β-subunit ของทิวบูลินในไมโครทิวบูลอันเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เส้นใยสปินเดิล โดยยาพาคลิแทคเซลทำให้ทิวบูลินเกิดการคงรูปไม่สามารถเกิดการหดและคลายตัวได้ จึงส่งผลให้ไม่เกิดการยึดเชื่อมกันระหว่างเส้นใยสปินเดิลและไคนีโตคอร์ และไม่เกิดแรงดึงในการแยกโครมาติด (Matson, Stukenberg, 2011) โดยเมื่อกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยยาพาคลิแทคเซลพบว่าเซลล์ที่ได้รับยาพาคลิแทคเซลความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีสัดส่วนประชากรของเซลล์ในระยะ G_2/M เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทคเซล ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ C-33A มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่มีประสิทธิภาพ

เพื่อศึกษาว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ส่งผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงทำการเปรียบเทียบความไวต่อรังสีของเซลล์ C-33A ที่ไม่มีการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint กับเซลล์ C-33A ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ MPS1 kinase อันเป็นโปรตีนที่สำคัญในการทำงานของ mitotic checkpoint (Musacchio, 2015) ผลการทดลองพบว่าหลังการได้รับรังสีเซลล์ C-33A ที่ไม่ได้รับสาร NMS-P715 และเซลล์ C-33A ที่ได้รับสาร NMS-P715 มีสัดส่วนการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ C-33A

ข้อจำกัดของงานวิจัยในครั้งนี้คือความเป็นพิษของสาร NMS-P715 โดยการใช้สาร NMS-P715 ความเข้มเข้ม 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า IC_{50} ที่ 0.182 ไมโครโมลาร์ ทำให้หลังการฉายรังสีผู้วิจัยล้างสาร NMS-P715 ออก (Caldarelli et al., 2011; Colombo et al., 2010; Maachani et al., 2015) ซึ่งการล้างสาร NMS-P715 ออกอาจส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ดังนั้นหากต้องการหลีกเลี่ยงข้อจำกัดของสาร NMS-P715 ผู้วิจัยเสนอให้ทำการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint โดยใช้ small interfering RNA ที่จำเพาะกับ MPS1 kinase แทน นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ทำการประเมินรูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสเท่านั้น ซึ่งหากต้องการยืนยันกลไกการตายของเซลล์ที่จำเพาะมากขึ้นจะต้องทำการศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่จำเพาะต่อกลไกการตายของเซลล์แต่ละชนิดร่วมด้วย เช่น คาสเปส หรือเบต้ากาแลคโตซิเดส เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยยาพาคลิแทคเซล โดยประเมินจากการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ทำให้ทราบว่าเซลล์ C-33A มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติ เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ส่งผลต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ โดยการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 พบว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่เปลี่ยนแปลงรูปแบบการตายหลักของเซลล์หลังการได้รับรังสี ผลจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางรังสีชีววิทยาที่อาจนำไปใช้ในการศึกษาเชิงลึกต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนเงินทุนบางส่วนสำหรับการทำการวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนแผนกรังสีรักษา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร แผนกรังสีรักษา โรงพยาบาลจุฬาภรณ์ และหน่วยห้องปฏิบัติการวิจัยระดับโมเลกุลและจีโนม งานห้องปฏิบัติการกลางเพื่อการวิจัย ฝ่ายวิจัยนวัตกรรมและวิเทศสัมพันธ์ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดีในการเข้าไปทำวิจัยและเก็บข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

Ahmed SU, Carruthers R, Gilmour L, Yildirim S, Watts C, Chalmers AJ. Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Research 2015; 75(20): 4416-4428.

Amornwichet N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, et al. Carbon-Ion Beam Irradiation Kills X-Ray-Resistant p53-Null Cancer Cells by Inducing Mitotic Catastrophe. PLOS ONE 2014; 9(12): e115121.

Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 2014: 1170, 29-40.

Bridges KA, Chen X, Liu H, Rock C, Buchholz TA, Shumway SD, et al. MK-8776, a novel chk1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. Oncotarget 2016; 7(44): 71660-71672.

Burgess A, Rasouli M, Rogers S. Stressing mitosis to death. Frontiers in Oncology 2014; 4: 140.

Caldarelli M, Angiolini M, Disingrini T, Donati D, Guanci M, Nuvoloni S, et al. Synthesis and SAR of new pyrazolo[4,3-h]quinazoline-3-carboxamide derivatives as potent and selective MPS1 kinase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011; 21(15): 4507-4511.

Colombo R, Caldarelli M, Mennecozzi M, Giorgini ML, Sola F, Cappella P, et al. Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. Cancer Research 2010; 70(24): 10255-10264.

Ferrari S, Gentili C. Maintaining Genome Stability in Defiance of Mitotic DNA Damage. Frontiers in Genetics 2016; 7: 128.

Hematulin A, Sagan D, Sawanyawisuth K, Seubwai W, Wongkham S. Association between cellular radiosensitivity and G1/G2 checkpoint proficiencies in human cholangiocarcinoma cell lines. International Journal of Oncology 2014; 45(3): 1159-1166.

Kim BM, Hong Y, Lee S, Liu P, Lim JH, Lee YH, et al. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences 2015; 16(11): 26880-26913.

Liu ST, Zhang H. The mitotic checkpoint complex (MCC): looking back and forth after 15 years. AIMS Molecular Science 2016; 3(4): 597-634.

Maachani UB, Kramp T, Hanson R, Zhao S, Celiku O, Shankavaram U, et al. Targeting MPS1 Enhances Radiosensitization of Human Glioblastoma by Modulating DNA Repair Proteins. Molecular Cancer Research: MCR 2015; 13(5): 852-862.

Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. Molecular Interventions 2011; 11(2): 141-150.

McCormack A, Fan JL, Duesberg M, Bloomfield M, Fiala C, Duesberg P. Individual karyotypes at the origins of cervical carcinomas. Molecular Cytogenetics 2013; 6(1): 44.

Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. Current Biology: CB 2015: 25(20): R1002-1018.

Orth M, Lauber K, Niyazi M, Friedl AA, Li M, Maihöfer C, et al. Current concepts in clinical radiation oncology. Radiation and Environmental Biophysics 2014; 53(1): 1-29.

Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 2004; 59(4): 928-942.

Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, Medema RH. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. Journal of Cell Science 2015; 128(4): 607-620.

Vance S, Liu E, Zhao L, Parsels JD, Parsels LA, Brown JL, et al. Selective radiosensitization of p53 mutant pancreatic cancer cells by combined inhibition of Chk1 and PARP1. Cell Cycle (Georgetown, Tex.) 2011; 10(24): 4321-4329.

Wang Z, Lai ST, Ma NY, Deng Y, Liu Y, Wei DP, et al. Radiosensitization of metformin in pancreatic cancer cells via abrogating the G2 checkpoint and inhibiting DNA damage repair. Cancer Letters 2015; 369(1): 192–201.