

เฟนฟอร์มินยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Phenformin Suppresses Proliferation of Cholangiocarcinoma Cells

รัตนารณ์ ใจดี (Rattanaporn Jaidee)* ดร.เอื่อมเดือน ประวะพา (Dr.Auemduan Prawan)**

ดร.ลัดดาวัลย์ เส็งกันไพร (Dr.Laddawan Senggunprai)*** ดร.อุพา กุ๋องวิริยพันธุ์ (Dr.Upa Kukongviriyapan)****

ดร.ศรีญา กงเพชร (Dr.Sarinya Kongpetch)***** ดร.วีรพล กุ๋องวิริยพันธุ์ (Dr.Veerapol Kukongviriyapan)*****

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นโรคมะเร็งที่มีความรุนแรงและยากต่อการตรวจวินิจฉัยในระยะเริ่มต้น จึงมีการหาทฤษฎีใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา เฟนฟอร์มินเป็นอนุพันธ์ของไบกัวไนด์ เช่น เมทฟอร์มิน ซึ่งละลายในไขมัน ได้ดีกว่า และไม่ต้องงดไขมันในการนำเข้าสู่เซลล์ ทำให้ยาเฟนฟอร์มินมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ดีกว่า โครงการวิจัยศึกษาฤทธิ์ของยาเฟนฟอร์มินในการยับยั้งการเจริญเติบโต และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-452 KKU-M156 และ KKU-100 โดยใช้เทคนิค sulforhodamine-B assay และ wound healing assay ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่ายาเฟนฟอร์มินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญ ค่า IC50 ของเซลล์ KKU-452 KKU-M156 และ KKU-100 มีเท่ากับ 57.4±11.0, 124.0±35.7 และ 357.8±248.9 μ M ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ KKU-452 เห็นผลที่เวลา 6 ชั่วโมง และ KKU-M156 ที่เวลา 18 ชั่วโมง งานวิจัยจึงแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าเฟนฟอร์มินมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive malignancy and very difficult in diagnosis. Phenformin is a biguanide derivative of metformin, with higher potency than metformin. Phenformin is more lipophilic and does not require transporters to enter cells. In the present study, the effects of phenformin in CCA cells were investigated. Antiproliferation and migration on KKU-452 KKU-M156 and KKU-100 CCA calls were assessed using sulforhodamine-B assay and wound healing method respectively. The results showed that phenformin significantly inhibited cell proliferation within a concentration- and time-dependent manners. The most sensitive cell line is KKU-452, and the most resistance cell line is KKU-100 with IC50 values of 57.4±11.0, 124.0±35.7 and 357.8±248.9 μ M respectively. Phenformin significantly suppressed cell migration of both cells. This study shows that phenformin has a potential to be used in the treatment of CCA.

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำดี เฟนฟอร์มิน การเคลื่อนที่ของเซลล์

Keywords: Cholangiocarcinoma, Phenformin, Migration

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***** อาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***** ศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

โรคมะเร็งท่อน้ำดี เป็น โรคมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อของท่อน้ำดี พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีความรุนแรงสูง และยากต่อการตรวจวินิจฉัยในระยะเริ่มต้น การรักษาในปัจจุบันที่มีประสิทธิภาพดีคือการผ่าตัด และการใช้ยาเคมีบำบัด ซึ่งมีผลข้างเคียงสูงและมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันแนวทางการวินิจฉัยและวิธีการรักษาจะก้าวหน้าไปมาก แต่อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยยังสูง โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรกมักอยู่ในระยะท้ายของโรค ทำให้จำเป็นต้องมีการศึกษาหาชนิดใหม่หรือกลายพันธุ์ใหม่เพื่อใช้ในการรักษาเพิ่มประสิทธิภาพ และลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้น (Razumilava and Gores, 2014) พยาธิใบไม้ตับเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของมะเร็งท่อน้ำดี โดยมีคุณลักษณะของการกลายพันธุ์ (mutation) และการแสดงออกของยีน (gene expression) แตกต่างจากมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในภูมิภาคที่ไม่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Jinawath et al., 2006; Kongpetch et al., 2015)

เมทฟอร์มิน (metformin) เป็นยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี โดยการกระตุ้นเอนไซม์ AMPK ลดการทำงานของ Akt, mTOR และ p70S6K (Wandee et al., 2018) แต่เนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่าการรักษาโรคเบาหวานมาก จึงเป็นข้อจำกัดที่จะใช้ในการรักษา ยาเฟนฟอร์มิน (phenformin) เป็นอนุพันธ์ของเมทฟอร์มินซึ่งละลายในไขมันได้ดีกว่า และไม่ต้องอาศัยตัวขนส่ง (transporter) เช่น Oct1 ในการนำเข้าสู่เซลล์ ทำให้ยาเฟนฟอร์มินมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ได้ดีกว่าเมทฟอร์มิน โดยมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ AMPK และ EGFR (Huang et al., 2018) เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของยาเฟนฟอร์มินในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากภูมิภาคที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ของยาเฟนฟอร์มินในการลดการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยในภูมิภาคที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาความเป็นพิษของยาเฟนฟอร์มินต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้เป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-452 KKU-M156 และ KKU-100 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Ham's F12 (Life Technologies, USA) ที่ประกอบด้วย 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.3, gentamycin sulphate (50 µg/ml), penicillin (100 unit/ml), และ 10% fetal bovine serum โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ ทำการ subculture ทุกๆ 2 วันด้วย 0.25% trypsin-EDTA

การทดสอบความเป็นพิษของยาเฟนฟอร์มิน ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยวิธี sulphorhodamine B (SRB)

assay

ใส่เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-452 KKU-M156 และ KKU-100 ใน 96 well plate ปริมาณ 7,500 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12 ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการเติมยาเฟนฟอร์มิน ความเข้มข้นสุดท้าย 30,100,300 และ 600 µM เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ทำการ fix เซลล์โดยเติม 10% trichloroacetic acid เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย deionized water จากนั้นย้อมสีเซลล์

ด้วยสารละลาย 0.4% SRB ใน 1% acetic acid เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 1% acetic acid รอให้แห้ง จากนั้นละลายสีออกด้วย 10 mM Tris base pH 10.5 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm และคำนวณหาร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity)

การทดสอบฤทธิ์ของยาเฟนฟอร์มิน ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยวิธี wound healing assay

เลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-452 และ KKU-M156 ใน 24 well plate จำนวน 300,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12 จากนั้นสร้างรอยแผลเป็นเส้นตรงบริเวณกลางหลุมโดยใช้ปิเปตทิป (pipette tip) ล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วย phosphate buffer saline จากนั้นเติมยาเฟนฟอร์มิน ความเข้มข้นสุดท้าย 30, 100 และ 300 μ M ถ่ายรูปที่ 0, 6 และ 12 ชั่วโมง ในเซลล์ชนิด KKU-452 และที่ 0, 18 และ 24 ชั่วโมง ในเซลล์ชนิด KKU-M156 วัดพื้นที่ของรอยแผล เพื่อนำไปคำนวณหาความกว้าง และร้อยละการปิดของรอยแผล (%wound closure)

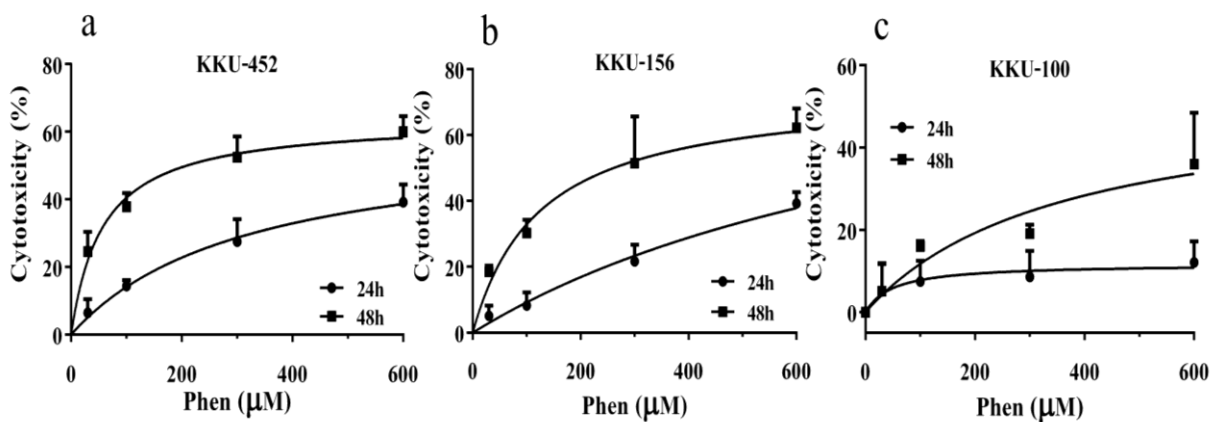
สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

ผลการทดลองแสดงโดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) \pm SD และใช้การเปรียบเทียบสถิติแบบ one way ANOVA หรือ Student's t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม (control group) และกลุ่มทดสอบ (treatment group) พิจารณาผลโดยใช้ค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ค่า median inhibitory concentration (IC₅₀) เป็นค่าความเข้มข้นของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ของความสามารถสูงสุดสูงในการยับยั้งเซลล์ และค่า Emax (%) หรือค่าร้อยละความสามารถสูงสุดในการยับยั้งเซลล์ คำนวณค่าโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism

ผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษของยาเฟนฟอร์มินต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยวิธี SRB assay

ผลการทดสอบความเป็นพิษของยาเฟนฟอร์มิน ด้วยวิธี SRB assay ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 3 ชนิด ได้แก่ KKU-452 KKU-M156 และ KKU-100 ที่เลี้ยงในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง ยาเฟนฟอร์มินมีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับสาร (รูปที่ 1) เซลล์ KKU-452 มีความไวต่อยามากที่สุด และ KKU-100 ตอบสนองต่อยาน้อยที่สุด ค่า IC₅₀ และ Emax ของยาต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดงดังตารางที่ 1



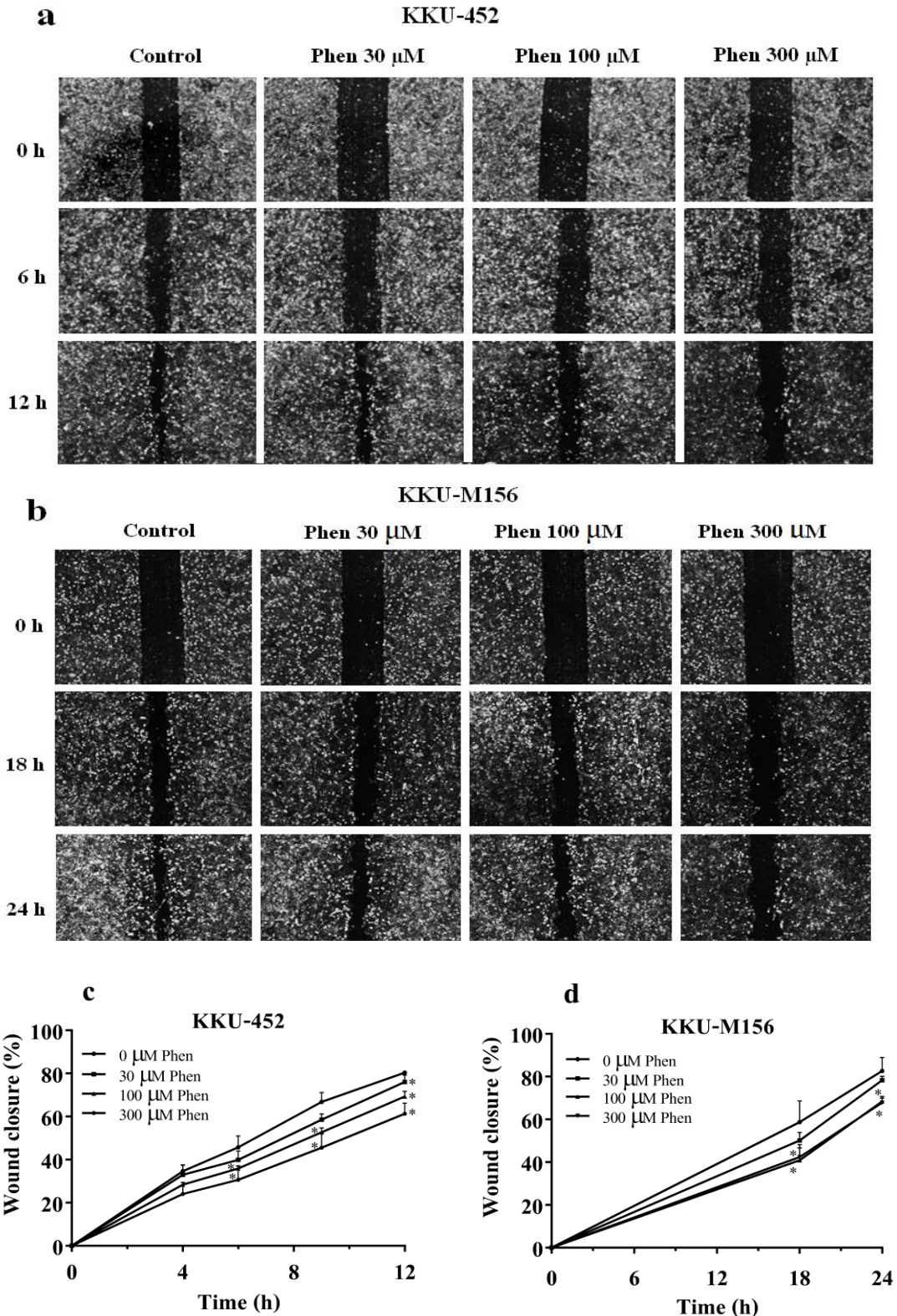
รูปที่ 1 ค่าความเป็นพิษของเซลล์ KKU-452 (a) KKU-M156 (b) และ KKU-100 (c) เมื่อได้รับยาเฟนฟอร์มินความเข้มข้น 30-600 μ M เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC50 ของยาเฟนฟอร์มิน ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

	CCA cell line		
	KKU-452	KKU-M156	KKU-100
IC50 (μM)	57.4 \pm 11.0	124.0 \pm 35.7	357.8 \pm 248.9
E _{max} (%)	63.7 \pm 3.1	73.7 \pm 6.9	53.7 \pm 17.9

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ของยาเฟนฟอร์มินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

การทดสอบฤทธิ์ของยาเฟนฟอร์มินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-452 และ KKU-M156 ด้วยวิธี wound healing assay พบว่ายาเฟนฟอร์มินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ทั้งสองชนิด โดยความเข้มข้น 100 และ 300 μM ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-452 และที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-M156 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของยาเฟนฟอร์มินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งต่อน้ำดีด้วยวิธี wound healing assay รูป 2a แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-452 ที่เวลา 0, 4, และ 12 ชั่วโมง รูป 2b แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-M156 ที่เวลา 0, 18, และ 24 ชั่วโมง รูป 2c,d แสดงการปิดของรอยแผล (% wound closure) * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการทดลองพบว่ายาเฟนฟอร์มินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเซลล์ KKU-452 ไวต่อยาเฟนฟอร์มินมากที่สุด รองลงมาคือเซลล์ KKU-M156 และเซลล์ที่ไวต่อยาเฟนฟอร์มินมากที่สุดคือเซลล์ KKU-100 เมื่อเปรียบเทียบกับยามาเมทฟอร์มิน (Wandee et al., 2018) พบว่ายาเฟนฟอร์มินมีประสิทธิภาพสูงกว่าในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีพบว่ายาเฟนฟอร์มินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-452 ได้ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ KKU-M156 ที่เวลา 18 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยาเฟนฟอร์มินกับเซลล์มะเร็งอื่น เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร neuroblastoma และมะเร็งต่อลูกหมาก พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน (Caraci et al., 2003; Huang et al., 2018) ในขณะที่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ไวต่อยาเฟนฟอร์มินมากกว่า (Lea et al., 2018) ดังนั้นงานวิจัยจึงแสดงให้เห็นเบื้องต้นว่ายาเฟนฟอร์มินมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2561 และสถาบันวิจัยมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Caraci F, Chisari M, Frasca G, Chiechio S, Salomone S, Pinto A, Sortino MA, Bianchi A. Effects of phenformin on the proliferation of human tumor cell lines. *Life Sci* 2003; 74(5): 643-650.
- Huang Y, Zhou S, He C, Deng J, Tao T, Su Q, Darko KO, Peng M, Yang X. Phenformin alone or combined with gefitinib inhibits bladder cancer via AMPK and EGFR pathways. *Cancer Commun (Lond)* 2018; 38(1): 50.
- Jinawath N, Chamgramol Y, Furukawa Y, Obama K, Tsunoda T, Sripan B, Pairojkul C, Nakamura Y. Comparison of gene expression profiles between *Opisthorchis viverrini* and non-*Opisthorchis viverrini* associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2006; 44(4): 1025-1038.
- Kongpetch S, Jusakul A, Ong CK, Lim WK, Rozen SG, Tan P, Teh BT. Pathogenesis of cholangiocarcinoma: From genetics to signalling pathways. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015; 29(2): 233-244.
- Lea MA, Kim H, des BC. Effects of Biguanides on Growth and Glycolysis of Bladder and Colon Cancer Cells. *Anticancer Res* 2018; 38(9): 5003-5011.
- Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2014; 383(9935): 2168-2179.
- Wandee J, Prawan A, Senggunprai L, Kongpetch S, Tusskorn O, Kukongviriyapan V. Metformin enhances cisplatin induced inhibition of cholangiocarcinoma cells via AMPK-mTOR pathway. *Life Sci* 2018; 207 172-183.