
การสร้างเซลล์ลูกผสม Dendritic cells กับเซลล์ มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองเพื่อกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน

สุภาพร สุภารักษ์* ตะวันฉาย แสงเจริญ* และบุษราวรรณ ศรีวรรณ**

*สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข **สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Dendritic cells (DCs) ของผู้ป่วยมะเร็งไม่สามารถตรวจจับและนำเสนอเซลล์มะเร็งเพื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การศึกษานี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ DCs ในหลอดทดลองและกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte และ Natural Killer (NK) cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม โดยคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์จาก Buffy coat ของโลหิตบริจาคจำนวน 6 ราย กระตุ้นให้เป็น DCs ด้วย GM-CSF และ IL-4 เป็นเวลา 6 วัน และตรวจวัดคุณสมบัติของ DCs ด้วยวิธี Flow Cytometry พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการแสดงออกของ CD11c และ HLA-DR และลดการแสดงออกของ CD14 จากนั้นนำ DCs มาสร้างเซลล์ลูกผสมกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ตรวจวัดผลสำเร็จการสร้างเซลล์ลูกผสม ด้วยวิธี Flow Cytometry พบว่าสามารถสร้างเซลล์ลูกผสมได้ คิดเป็นร้อยละเฉลี่ย 34.67 จากการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ลูกผสม พบว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte เฉลี่ยจากร้อยละ 24.55 เป็นร้อยละ 72.00 และเพิ่มประสิทธิภาพ NK cell ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเฉลี่ยจากร้อยละ 22.91 เป็นร้อยละ 65.59 การศึกษานี้สามารถเป็นต้นแบบในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสม DCs และเพื่อใช้พัฒนาเป็นทางเลือกสำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมต่อไป

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

Received: 23 November 2017

Revised: 31 August 2018

Accepted: 18 March 2019

บทนำ

รายงานอุบัติการณ์มะเร็งรายใหม่ของประเทศไทย พบมะเร็งเต้านมสูงเป็นอันดับหนึ่งในหญิงไทย คิดเป็นร้อยละ 41.96 ของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด⁽¹⁾ การรักษามะเร็งด้วยการผ่าตัด การฉายแสง และการให้ยาเคมีบำบัดไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมด ยังมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ทั่วร่างกาย เนื่องจากเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยสามารถยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมากขึ้น⁽²⁾ การวิจัยพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งให้มีประสิทธิภาพ ไม่กลับมาเป็นซ้ำหรือแพร่กระจาย จึงมีความจำเป็น ปัจจุบันมีการพัฒนารักษามะเร็งโดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตัวผู้ป่วย โดยใช้วิธีการกระตุ้นเซลล์ของผู้ป่วยเองหรือนำเซลล์ของผู้อื่นมากระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย เพื่อให้สามารถทำลายและยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ ปัจจุบันการเพิ่มประสิทธิภาพของ Dendritic cells (DCs) เป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจาก DCs เป็นเซลล์ที่ตรวจจับนำเสนอเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการแบ่งตัวของ T lymphocyte เพื่อเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และกระตุ้นการทำงานของ NK cell เพื่อทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ⁽³⁻⁴⁾ โดยมีรายงานว่าสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ สามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองและทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ^(5, 6)

วิธีการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs ในระดับห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเซลล์⁽⁷⁾ 2) วิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้ไวรัสเป็นตัวนำพาให้สร้างเซลล์ลูกผสมในเซลล์เป้าหมาย⁽⁸⁾ และ 3) วิธีการใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่าง DCs และเซลล์มะเร็ง เช่น สารเคมี polyethylene glycol⁽⁹⁾ lysplecithin⁽¹⁰⁾ และ fusogen⁽¹¹⁾ เป็นต้น

การศึกษานี้ได้กระตุ้น DCs โดยสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยใช้ polyethylene glycol และทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ลูกผสม DCs ต่อการแบ่งตัวของ T lymphocyte และกระตุ้นการทำงานของ NK cell

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC® HTB-22™, human breast cancer adenocarcinoma cell line) ใน culture flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) 1% Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) และ 10% fetal bovine serum (FBS; Grand Island Biological Company, Grand Island, NY, USA) บ่มเซลล์มะเร็งในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) ในสภาวะที่มี 5% CO₂ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์มะเร็งแบ่งตัวจนได้เซลล์ประมาณร้อยละ 80-90 ของพื้นที่เพาะเลี้ยง จึงนำมาย่อยด้วยสารละลาย 0.05% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ นาน 2-5 นาที แล้วนำเซลล์ที่ย่อยได้ไปเพาะเลี้ยงต่อ หรือนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

การเตรียม DCs

นำ Leukocyte-Enriched Buffy coats จากอาสาสมัครจำนวน 6 ราย มาปั่นคัดแยก Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) โดยใช้ IsoPrep (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) แล้วนำมาคัดแยกเซลล์โมโนไซต์ ด้วยวิธี CD14 positive cells purification โดยใช้ Immunomagnetic Microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และความเหมือน (identity) ของเซลล์โมโนไซต์โดยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences,

San Jose, CA, USA) นำเซลล์โมโนไซต์ ที่ได้มากระตุ้นให้เป็น DCs โดยเฉพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่มีไซโตไคน์ 1,000 unit/ml Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 500 unit/ml interleukin-4 (IL-4; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin เป็นเวลา 5-7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน เมื่อครบเวลา ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์ไปเป็นเซลล์ DCs โดยย้อมกลุ่มของโปรตีนบนผิวเซลล์ (Cluster of differentiation, CD) ที่ปรากฏขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยไซโตไคน์ GM-CSF และ IL-4 โดยย้อมด้วยสาร antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ บนผิวเซลล์ และติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorophore) ได้แก่ anti-CD14-FITC, anti-CD11c-FITC, anti-HLA-DR-PE monoclonal antibody; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ตรวจวัดโปรตีนบนผิวเซลล์ที่จับกับ antibody ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

ตัวอย่าง Leukocyte-Enriched Buffy coats จากอาสาสมัคร ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยได้รับการยินยอมตามกระบวนการบริจาคโลหิต และไม่สามารถระบุถึงตัวบุคคลผู้บริจาคได้

การคัดแยก T lymphocyte (CD3⁺) หรือ NK cell (CD3⁻ CD56⁺)

คัดแยก T lymphocyte (CD3⁺) ด้วยชุด EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit (STEM CELL technologies, Vancouver, Canada) และคัดแยก NK cell (CD3⁻ CD56⁺) ด้วยชุด Easy Sep™ Human CD56 Positive Selection Kit (STEM CELL technologies, Vancouver, Canada) โดยนำ PBMCs ปริมาณ 1 x 10⁶ เซลล์ เติมนลงใน EasySep® CD3 Positive selection cocktail ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สำหรับคัดแยก T lymphocyte หรือ EasySep® CD56 Positive selection cocktail สำหรับคัดแยก NK cell ผสมเบา ๆ แล้ว บ่มที่ 25±5 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม EasySep® magnetic nanoparticles cocktail ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สำหรับ T lymphocyte หรือ NK cell นำไปบ่มที่ 25±5 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 2.5 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 และ 10% FBS จากนั้นนำไปวางใน EasySep® Magnet เป็นเวลา 5 นาที จึงเท supernatantทิ้ง แล้วเติม RPMI 1640 และ 10% FBS ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทำซ้ำเช่นเดิม หลังจากนั้นตรวจวัดคุณสมบัติของเซลล์ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

การสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells)

ผสมเซลล์เพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัครแต่ละราย (มีการแสดงออกของโปรตีน HLA-DR บนผิวเซลล์, HLA-DR⁺) กับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 (มีการแสดงออกของโปรตีน MUC1 บนผิวเซลล์, MUC1⁺) ในอัตราส่วน 10:1 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย RPMI 1640 และ 10% FBS จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 50% polyethylene glycol (Sigma, St. Louis, MO, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติม RPMI 1640 และ 10%FBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม RPMI 1640 และ 10%FBS ที่มี 1,000 unit/ml GM-CSF และ 500 unit/ml IL-4 และนำไปเลี้ยงที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจวัดคุณสมบัติของเซลล์ลูกผสมที่ได้ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) โดยเซลล์ลูกผสม DCs (DCs - MCF-7 fusion cells) ต้องมีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง HLA-DR และ MUC1 บนผิวเซลล์ นำเซลล์ลูกผสมไปปั่นที่ 1,200 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs

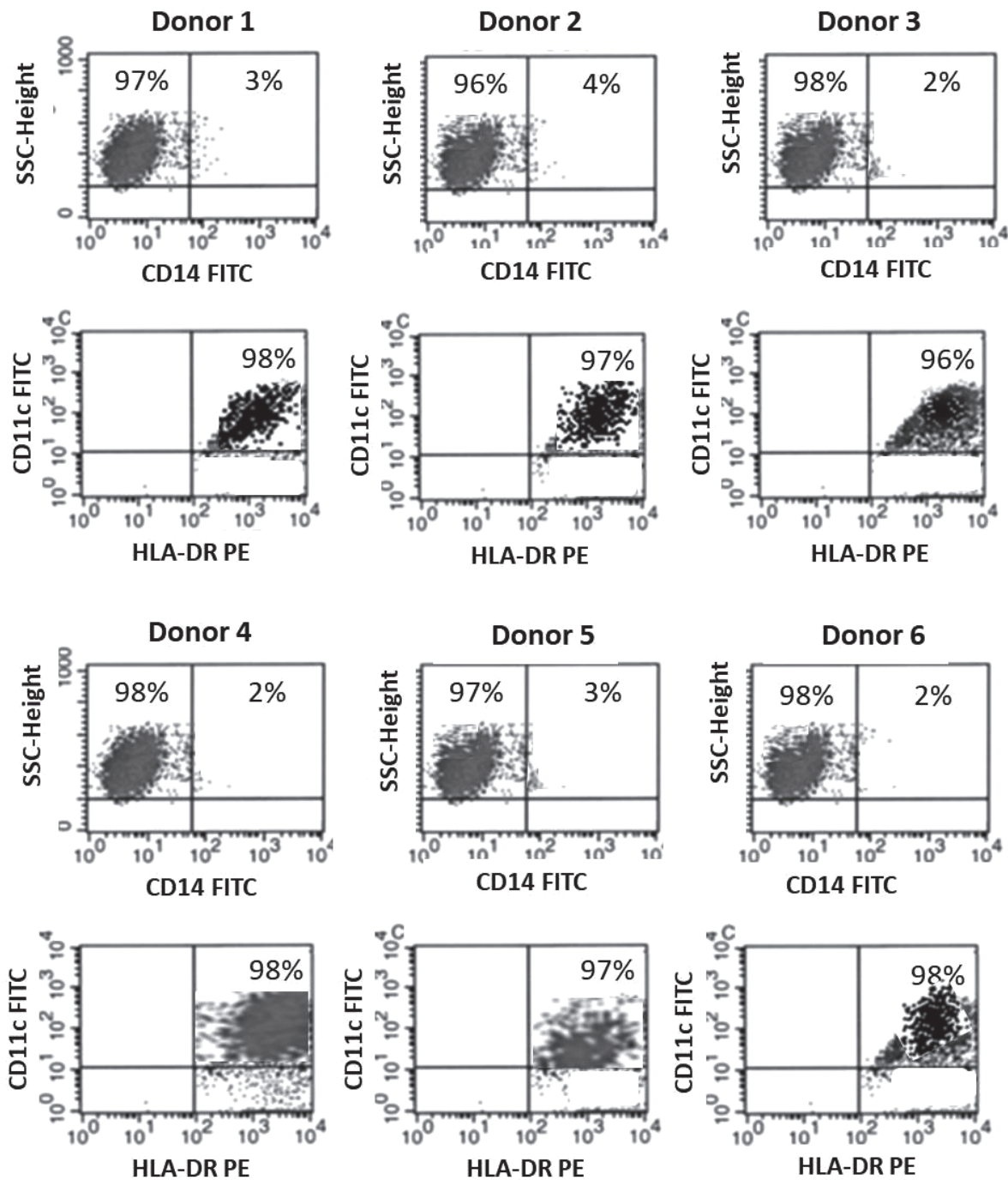
การเพิ่มจำนวน *T lymphocytes* นำเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs – MCF-7 fusion cells) ที่เตรียมได้มาทดสอบประสิทธิภาพ ด้วยการวัดผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวน *T lymphocyte* โดยนำ *T lymphocyte* ที่แยกไว้มาย้อมด้วยสารเรืองแสง Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ลูกผสม โดยนำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาย้อมด้วยสารเรืองแสง Propidium iodide (PI; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ตรวจวัด *T lymphocyte* ที่เพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometer (Millipore Corp, Hayward, CA, USA) โดยที่ negative control คือ *T lymphocyte* ที่ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) และ positive control คือ *T lymphocyte* ที่ถูกกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin (PHA; Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย *T lymphocyte* ที่ถูกกระตุ้น (แสดงผลเป็น %) มีการติดสี CFSE และย้อมไม่ติดสี PI

การเพิ่มความสามารถ *NK cell* ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม นำ *NK cell* ที่คัดแยกไว้มากกระตุ้นด้วยเซลล์ลูกผสม (DCs – MCF-7 fusion cells) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ *NK cell* ที่ถูกกระตุ้นมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง CFSE ที่ขนาดความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 15 นาที หลังจากบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง จึงนำมาย้อมสารเรืองแสง PI และตรวจวัดการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม ด้วยเครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometers (Millipore Corp, Hayward, CA, USA) โดยที่ negative control คือ *NK cell* ที่ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) และ positive control คือ *NK cell* ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกทำลาย (แสดงผลเป็น %) ย้อมติดสี CFSE และสี PI

ผล

การเพาะเลี้ยง DCs

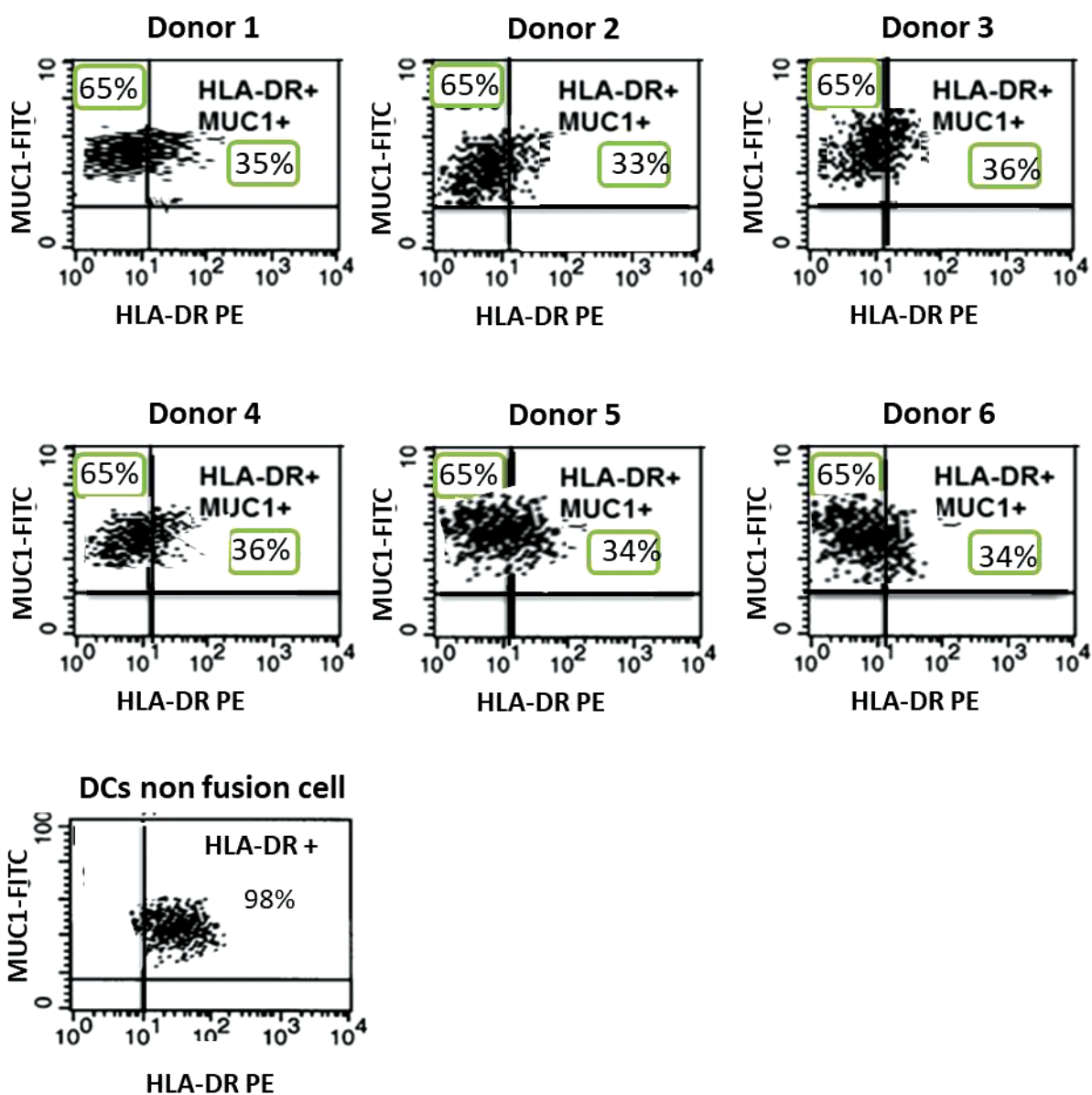
ผลการคัดแยกเซลล์โมโนซัยท์และนำมาเพาะเลี้ยงกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ GM-CSF และ IL-4 เพื่อให้เปลี่ยนคุณสมบัติจากเซลล์โมโนซัยท์ไปเป็น DCs จากการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์โมโนซัยท์หลังกระตุ้น พบว่าบนผิวเซลล์โมโนซัยท์ที่เปลี่ยนเป็น DCs ของอาสาสมัครแต่ละราย มีการแสดงออกของโปรตีน CD14 บนผิวเซลล์ลดลง ขณะที่ CD11c และ HLA-DR มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ได้เซลล์เพาะเลี้ยง DCs (DCs generation) สำเร็จเฉลี่ย ร้อยละ 97.33 (ตารางที่ 1) ผลตรวจวัดคุณสมบัติของ DCs จากอาสาสมัคร 6 ราย ด้วยเครื่อง flow cytometer (ภาพที่ 1) โดยเซลล์เพาะเลี้ยง DCs ลดการแสดงออกของโปรตีน CD 14 และมีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง CD11c และ HLA-DR (CD11c⁺ HLA-DR⁺) บนผิวเซลล์



ภาพที่ 1 คุณสมบัติเซลล์เพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย หลังจากคัดแยกเซลล์โมโนซัยท์และกระตุ้นด้วย GM-CSF และ IL-4 เพื่อเปลี่ยนเป็นเซลล์ DCs ตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยคัดแยกตามขนาด ส่วนประกอบโครงสร้างภายในเซลล์ (side scatter, SSC-Height) และการแสดงออกของโปรตีน CD14 CD11c และ HLA-DR บนผิวเซลล์

การสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells)

สร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells) โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยง DCs ของอาสาสมัครแต่ละราย ที่มีคุณสมบัติแสดงออกโปรตีน HLA-DR บนผิวเซลล์ (HLA-DR^+) มาผสมกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง ที่มีคุณสมบัติแสดงออกโปรตีน MUC1 บนผิวเซลล์ (MUC1^+) โดยใช้สารเคมี polyethylene glycol เพื่อให้เซลล์รวมกันได้เซลล์ลูกผสม พบว่า DCs ของอาสาสมัครทั้ง 6 ราย สามารถรวมกับ MCF-7 ได้ผลอัตราการสร้างเซลล์ลูกผสมสำเร็จ เฉลี่ยร้อยละ 34.67 (ตารางที่ 1) ผลตรวจวัดคุณสมบัติของเซลล์ลูกผสมจากเซลล์เพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัคร 6 ราย ด้วยเครื่อง flow cytometer (ภาพที่ 2) โดยเซลล์ลูกผสมมีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ทั้ง HLA-DR และ MUC1 ($\text{HLA-DR}^+ \text{MUC1}^+$) ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสมมีการแสดงออกเฉพาะโปรตีน HLA-DR บนผิวเท่านั้น (HLA-DR^+)

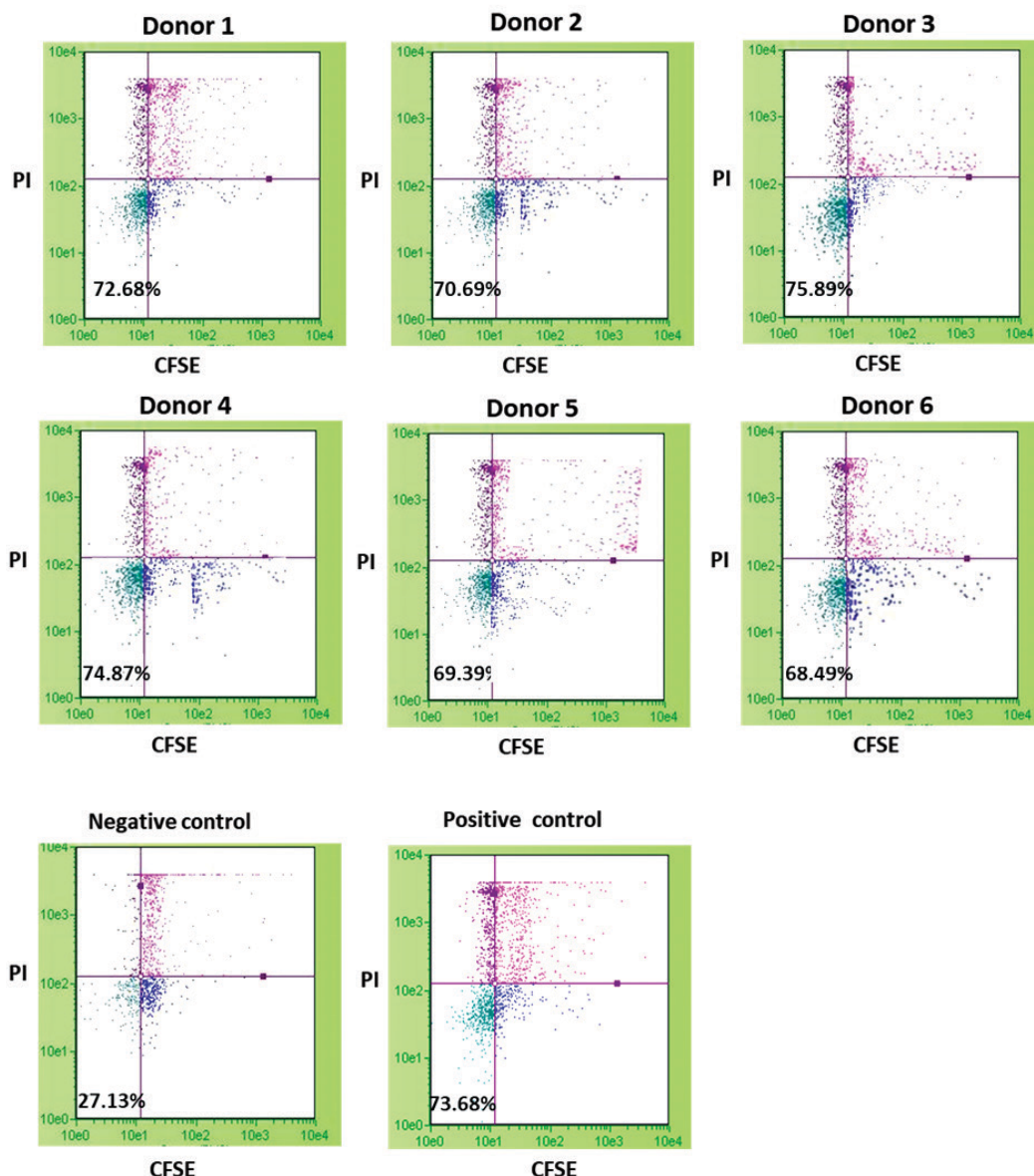


ภาพที่ 2 คุณสมบัติเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells) จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย ตรวจวัดโปรตีน HLA-DR และ MUC1 บนผิวเซลล์ ด้วยเครื่อง Flow cytometer

การทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells)

การกระตุ้นเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte

นำเซลล์ลูกผสม DCs (DCs - MCF-7 fusion cells) มาทดสอบประสิทธิภาพกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte พบว่าเซลล์ลูกผสมของอาสาสมัครทั้ง 6 ราย สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte ได้เฉลี่ยร้อยละ 75.89 ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) กระตุ้น T lymphocyte เฉลี่ยร้อยละ 24.55 (ตารางที่ 1) ผลทดสอบกระตุ้น T lymphocyte ด้วยเซลล์ลูกผสม DCs - MCF-7 fusion cells จากอาสาสมัคร 6 ราย (ภาพที่ 3) โดย T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนมีการติดสี CFSE ลดลงและไม่ติดสี PI



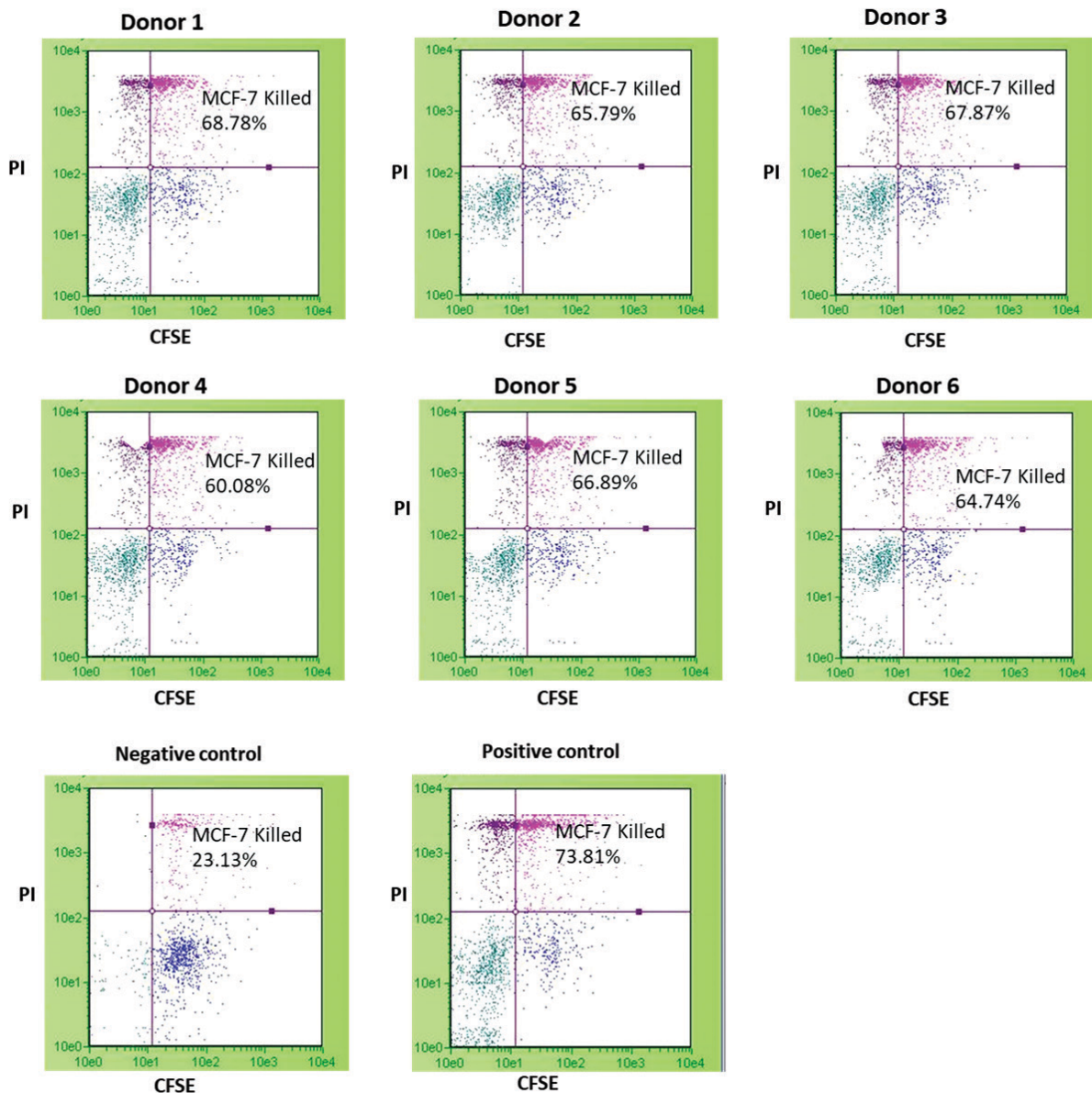
ภาพที่ 3 ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสมกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocytes จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย ตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer

Negative control: T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่ได้สร้างเซลล์ลูกผสม (แสดงเฉพาะ Donor 1)

Positive control: T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วย PHA (แสดงเฉพาะ Donor 1)

การทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงโดย NK cell

ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs (DCs - MCF-7 fusion cells) ต่อการกระตุ้น NK cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 พบว่าเซลล์ลูกผสม DCs สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ NK cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้สูงสุดถึง ร้อยละ 68.89 ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) กระตุ้น NK cell ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม เฉลี่ยร้อยละ 22.91 (ตารางที่ 1) ผลทดสอบเซลล์ลูกผสม DCs - MCF-7 fusion cells จากอาสาสมัคร 6 ราย (ภาพที่ 4) โดยเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกทำลายจะย้อมติดทั้งสี CFSE และสี PI



ภาพที่ 4 ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสมกระตุ้น NK cells ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย ตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer

Negative control: NK cells ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่ได้สร้างเซลล์ลูกผสม (แสดงเฉพาะ Donor 1)

Positive control: NK cells ถูกกระตุ้นด้วย PHA (แสดงเฉพาะ Donor 1)

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยง DCs (DCs generation) การสร้างเซลล์ลูกผสม (DCs - MCF-7 fusion cells) และประสิทธิภาพของเซลล์ลูกผสมต่อการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมของ NK cell ของอาสาสมัคร (Donor) 6 ราย

DCs features (%)	Donor						Mean (%)
	1	2	3	4	5	6	
DCs generation	98	97	96	98	97	98	97.33
DCs - MCF-7 fusion cells	35	33	36	36	34	34	34.67
DCs - MCF-7 fusion cells induced T cell proliferation	72.68	70.69	75.89	74.87	69.39	68.49	72.00
DCs non - fusion cells induced T cell proliferation	27.13	25.47	26.48	24.15	22.64	21.47	24.55
DCs - MCF-7 fusion cells induced NK cell kill MCF-7 cells	68.78	65.79	67.87	60.08	66.89	64.74	65.69
DCs non - fusion cells induced NK cell kill MCF-7 cells	23.13	24.58	25.34	23.47	23.78	21.89	22.91

วิจารณ์

การสร้างเซลล์ลูกผสมเป็นทางเลือกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ DCs ในหลอดทดลองเพื่อให้ DCs สามารถตรวจจับ นำเสนอเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การศึกษานี้ใช้ polyethylene glycol โมลโมเลกุล 1450 ความเข้มข้น 50% ซึ่งสามารถเพิ่มแรงดึงดูด ชักนำให้เกิดความไม่เสถียร ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ และไม่เกิดผลเสียต่อเซลล์^(9, 12) เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสม DCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงที่ได้อัตราความสำเร็จเฉลี่ย 34.67% สอดคล้องกับรายงานการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs-tumor cells ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ที่อัตราส่วน DCs ต่อเซลล์มะเร็ง 3:1 ถึง 10:1 ใน 50% polyethylene glycol พบว่าได้ผลความสำเร็จ 18-71% แตกต่างกันผู้ป่วยแต่ละราย⁽¹³⁾ การสร้างเซลล์ลูกผสมในผู้ป่วยเนื้องอกไกลิโอมา (Glioma) ในอัตราส่วน DCs ต่อเซลล์มะเร็ง 3:1 ใน 50% polyethylene glycol พบว่าได้ผลความสำเร็จ 66.2%⁽¹⁴⁾ และการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่อัตราส่วน 10:1 ใน 50% polyethylene glycol พบว่าผลจากเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยงได้ความสำเร็จ 34.50% และผลจากเซลล์มะเร็งลำไส้จากตัวผู้ป่วยเองได้ความสำเร็จ 33.28%⁽¹⁵⁾ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จการสร้างเซลล์ลูกผสม ได้แก่ แหล่งที่มาของ DCs ชนิดของเซลล์มะเร็งที่นำมากระตุ้น และวิธีการสร้างเซลล์ลูกผสม^(16, 17)

ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs พบว่าเซลล์ลูกผสม DCs ที่เตรียมจากอาสาสมัครกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และเพิ่มประสิทธิภาพ NK cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นที่พบว่าเซลล์ลูกผสม DCs สามารถกระตุ้น T lymphocyte เมื่อทดสอบกับมะเร็งหลายชนิด ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง และการวิจัยทางคลินิก ดังเช่นเซลล์ลูกผสม DCs จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และเมื่อนำไปฉีดกระตุ้นในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม สามารถกระตุ้น CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte ให้สร้างไซโตไคน์ INF- γ เพิ่มมากขึ้น^(18, 19) รวมทั้งรายงานวิจัยทดสอบเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านมจากหนูทดลองเพาะเลี้ยงและเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ากระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และกระตุ้น specific CD8⁺ T lymphocyte ให้สามารถทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เพิ่มมากขึ้น^(20, 21) เช่นเดียวกับการทดสอบเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งศีรษะและคอ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และกระตุ้นการสร้าง INF- γ ในระดับสูง และเซลล์ลูกผสมเมื่อนำไปฉีดในหนูทดลองที่ทำให้ป่วยเป็นมะเร็งศีรษะและคอ พบว่าหนูมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น⁽²²⁾ ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ DCs สามารถนำเสนอเซลล์มะเร็งได้ทั้งทาง MHC class I และ MHC class II จึงกระตุ้น T lymphocyte ได้ทั้งชนิด T helper cell (CD4⁺) และ T cytotoxicity cell (CD8⁺) ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้มากขึ้น^(15, 23)

การศึกษานี้เป็นการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs ที่เตรียมจากอาสาสมัครกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นในสัตว์ทดลอง และประยุกต์ใช้เซลล์ลูกผสม DCs สำหรับการศึกษาทางคลินิก จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีโดยกระตุ้นด้วยเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมในหลอดทดลอง สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และเพิ่มประสิทธิภาพ NK Cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การศึกษาทางคลินิกเพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมสำหรับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมแต่ละรายได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณนายแพทย์สมชาย แสงกิจพร ที่สนับสนุนการดำเนินการวิจัย นายสมภพ คชหาร และ นางสาวทัศนีย์ ทองดี ที่ช่วยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการด้านโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐฯ ด้านสาธารณสุขที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometer

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2558. กรุงเทพฯ: บริษัท พรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด; 2560.
2. Dalgleish AG, Browning MJ. Tumor immunology: immunotherapy and cancer vaccines. New York: Cambridge University Press; 1996.
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245–52.
4. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449: 419–26.
5. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 558–61.
6. Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, et al. Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 516768. (14 p.).
7. Hayashi T, Tanaka H, Tanaka J, Wang R, Averbook BJ, Cohen PA, et al. Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic–tumor hybrid cells generated by electrofusion. *Clin Immunol* 2002; 104: 14–20.
8. Roos DS, Duchala CS, Stephensen CB, Holmes KV, Choppin PW. Control of virus-induced cell fusion by host cell lipid composition. *Virology* 1990; 175: 345–57.
9. Lentz BR. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur Biophys J* 2007; 36: 315–26.
10. Turksen K, editor. Embryonic stem cells: methods and protocols. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2002.
11. Aguilar PS, Baylies MK, Fleissner A, Helming L, Inoue N, Podbilewicz B, et al. Genetic basis of cell–cell fusion mechanisms. *Trends Genet* 2013; 29: 427–37.
12. Davidson RL, O'Malley KA, Wheeler TB. Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. *Somatic Cell Genet* 1976; 2: 271–80.
13. Avigan D, Vasir B, Gong J, Borges V, Wu Z, Uhl L, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4699–708.
14. Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, Fukuda T, Saotome H, Ryan JL, et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother* 2004; 27: 452–9.
15. Koido S, Hara E, Homma S, Torii A, Toyama Y, Kawahara H, et al. Dendritic cells fused with allogeneic colorectal cancer cell line present multiple colorectal cancer-specific antigens and induce antitumor immunity against autologous tumor cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7891–900.
16. Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Ohkusa T, Gong J, et al. Cancer vaccine by fusions of dendritic and cancer cells. *Clin Dev Immunol* 2009; 2009: 657369. (13 p.).
17. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999; 50: 507–29.
18. Gelao L, Criscitiello C, Esposito A, De Laurentiis M, Fumagalli L, Locatelli MA, et al. Dendritic cell-based vaccines: clinical applications in breast cancer. *Immunotherapy* 2014; 6: 349–60.

19. Allahverdiyev A, Tari G, Bagirova M, Abamor ES. Current approaches in development of immunotherapeutic vaccines for breast cancer. *J Breast Cancer* 2018; 21: 343-53.
20. Gong J, Apostolopoulos V, Chen D, Chen H, Koido S, Gendler SJ, et al. Selection and characterization of MUC1-specific CD8⁺ T cells from MUC1 transgenic mice immunized with dendritic-carcinoma fusion cells. *Immunology* 2000; 101: 316-24.
21. Koido S, Hara E, Torii A, Homma S, Toyama Y, Kawahara H, et al. Induction of antigen-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses by fusion of autologous dendritic cells and metastatic colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2005; 117: 587-95.
22. Mou Y, Xie H, Huang X, Han W, Ni Y, Su H, et al. Immunological suppression of head and neck carcinoma by dendritic cell tumor fusion vaccine. *Oncol Lett* 2013; 6: 1799-803.
23. Koido S. Dendritic-tumor fusion cell-based cancer vaccines. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 828. (16 p.).

***In vitro* Generation of Dendritic Cell – Breast Cancer Cell Hybrids For Induction of Cellular Immunity**

Supaporn Suparak* Tawanchai Sangcharoen* and Busarawan Sriwanthana**

**National Institute of Health ** Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand*

Abstract Dendritic cells (DCs) of cancer patients are unable to effectively process and present tumor associated antigens to immune cells, resulting in a spread of cancer cells. Our study was to enhance *in vitro* efficacy of DCs to further induce activities of T lymphocytes and Natural Killer (NK) cells for inhibition/reduction of a growth of a breast cancer cell line (MCF-7). Human monocytes, derived from buffy coat of six normal blood donors, were positively selected and generated DCs by culturing with recombinant GM-CSF and IL-4 for 6 days. Human monocyte-derived DCs were determined by a decrease in a level of CD14 and an increase in CD11c and HLA-DR levels by flow cytometry. The DCs were further pulsed with breast cancer cell lines (MCF-7) to generate DCs – MCF-7 tumor fusion cells with a mean success rate at 34.67%. The DCs – MCF-7 fusion cells were able to stimulate T cell proliferation as well as to enhance NK cells activities to kill MCF-7 from an average of 22.45% to 72.00% and 22.91% to 65.69%, respectively. Our study demonstrated a model for *in vitro* generation of effective human monocyte derived DCs – tumor fusion cells and a possibility to further develop alternative method to treat cancer patients.

Keywords: Dendritic cells, T lymphocyte, NK cell, MCF-7, breast cancer