

นิพนธ์ฉบับ

ผลของอาหารเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย ลิพอลิแซคคาไรด์จากพอไฟโรโมแนสจึงจิवालีส ต่อการเพิ่มจำนวน การรุกราน และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ

อานิดย์ โทณลักษณ์, ลิทธิชัย ขุนทองแก้ว, กมลพรรณ รักดี

บทคัดย่อ

- บทนำ:** การศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ พอไฟโรโมแนสจึงจิवालีส ต่อการเพิ่มจำนวน การรุกราน และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ
- วิธีการศึกษา:** กระตุ้นเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ (ทีเอชพี-1) ด้วยลิพอลิแซคคาไรด์ของแบคทีเรียแกรมลบ พอไฟโรโมแนสจึงจิवालีส ที่ความเข้มข้น 250 - 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้น เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ชนิดปฐมภูมิ (เอชเอ็น18) และชนิดแพร่กระจาย (เอชเอ็น17) เพื่อทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวน การรุกราน และการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส โดยวิธีเอ็มทีที มอดิฟายด์บอยเดนแซมเบอร์ และ โฟลโซโตเมทรี แอนเนกซินไพล์ - เอฟไอทีซี ตามลำดับ
- ผลการศึกษา:** เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (ทีเอชพี-1) ที่ถูกกระตุ้นด้วยพอไฟโรโมแนสจึงจิवालีส มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ชนิดปฐมภูมิและชนิดแพร่กระจาย พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัว และมีความสามารถในการรุกรานเพิ่มขึ้น และอัตราการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดลดลง
- สรุปผลการศึกษา:** จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการอักเสบจากเซลล์โมโนไซต์ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อจุลชีพในช่องปาก พอไฟโรโมแนสจึงจิवालีส มีผลทำให้เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคามีความรุนแรงมากขึ้น และทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายลดลง
- คำสำคัญ:** มะเร็งศีรษะและลำคอ, อะพอพโทซิส, โมโนไซต์, พอไฟโรโมแนสจึงจิवालีส

วันที่รับบทความ: 20 สิงหาคม 2561 วันที่แก้ไขบทความ: 23 พฤษภาคม 2562 วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: 28 พฤษภาคม 2562

บทนำ

มะเร็งที่ศีรษะและลำคอเป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงที่เกิดขึ้นในบริเวณ ช่องปาก คอหอย กล่องเสียง และโพรงจมูก ซึ่งพบบ่อยเป็นอันดับที่ 6 จากทั่วโลก ร้อยละ 50 ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้จะเสียชีวิต และพบว่าผู้ป่วยร้อยละ 5 สามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งชนิดอื่น^{1, 2} ซึ่งมีลักษณะการรุกรานและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำคอ³ รวมทั้งมีความสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้กระบวนการตอบสนองเพื่อยับยั้งการเกิดมะเร็งแย่ลง พบความบกพร่องในการเกิดอะพอพโทซิส ของ T cell และแมโครฟาจบริเวณรอบๆ อาจมีบทบาทในการหลั่ง VEGF เพื่อกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดของเซลล์มะเร็ง⁴

Tumor-associated macrophages มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง จากการถูกกระตุ้นของแมโครฟาจให้เปลี่ยนเป็น M2 phenotype สามารถหลั่งโปรตีนที่มีผลทำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่และการแพร่กระจายของเซลล์ เช่น TGF- β , VEGF, GM-CSF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 และ MMPs⁵⁻⁷ มีการศึกษาพบว่า TAM เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเส้นเลือดและการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยมีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในมะเร็งระยะลุกลาม⁸

มีรายงานว่าผู้ป่วยที่มีปัญหาสุขภาพช่องปากเป็นโรคปริทันต์อักเสบ และมีการสูญเสียฟัน มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งในช่องปาก⁹ โรคปริทันต์อักเสบ เกิดจากการอักเสบทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะรอบรับรากฟัน เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคปริทันต์อักเสบเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รวมถึง *Porphyromonas gingivalis*¹⁰ ซึ่งมีลิพอลิแซคคาไรด์ (LPS) เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์¹¹ สามารถไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ให้เกิดการหลั่งสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ¹² ทั้งนี้มีงานวิจัยสนับสนุนว่า การอักเสบเรื้อรังเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องไปสู่การพัฒนาของโรคมะเร็ง โดยเซลล์ที่เกิดการอักเสบและไซโตไคน์ที่พบ มีส่วนทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และลดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จะไปยับยั้งการเกิดเนื้องอก^{13, 14}

จากสาเหตุดังกล่าวเพื่อทำให้เกิดความเข้าใจของกลไกการเกิดโรคมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จึงน่าจะมีการศึกษาผลจากสารคัดหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากเซลล์โมโนไซต์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในช่องปากคือ *Porphyromonas*

gingivalis ต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ชนิดปฐมภูมิ (HN18) และชนิดแพร่กระจาย (HN17) โดยศึกษาการเพิ่มจำนวนความสามารถในการรุกราน และการตายของเซลล์มะเร็ง

วิธีการศึกษา

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 การเลี้ยงเซลล์ human monocyte cell line THP-1 (ATCC#TIB-202, Manassas, USA) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI (GIBCO Products International, Inc., California, USA) ที่มี 5% fetal bovine serum (PAA, Austria) และ 1% Penicillin-Streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 - 3 วัน และ subculture เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ อดอาหารเซลล์โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน 6-well plate หลุมละ 5 มิลลิลิตร และใส่ LPS-PG (InvivoGen, San Diego, CA) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 250, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 6 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เก็บเฉพาะส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วเพื่อนำไปทดสอบ

1.2 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดปฐมภูมิ (primary cancer cell line; HN18, clinical staging T2N2M0) และชนิดแพร่กระจาย (metastatic cancer cell line; HN17, clinical staging T2N2M0) จากผู้ป่วยคนเดียวกัน ในการทดลองนี้เซลล์มะเร็ง HN18 และ HN17 เลี้ยงด้วยอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO Products International Inc., California, USA) ที่มี 5% fetal bovine serum และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปลี่ยนอาหารเซลล์ทุก 2 - 3 วัน เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บเซลล์โดยใช้ trypsin แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อการทดสอบ

2. วัดความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยวิธี MTT

อดอาหารเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเซลล์ให้ได้จำนวน 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน 96 well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร และใส่อาหารเลี้ยง

เซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มร่วมกันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มี 5% fetal bovine serum ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และใส่ MTT (Sigma-Aldrich Pte Ltd, Singapore) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดค่าความดูดกลืนแสงด้วย microplate reader (Tecan, Sunrise TWTC, Männedorf, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยกลุ่มควบคุมคือ เซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS ดังสมการนี้

$$\text{Percent of growth (PG)} = \left(\frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}} \right) \times 100$$

3. การวัดการรุกรานของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ

การทดลองการรุกรานของเซลล์มะเร็งผ่านเบสเมมเบรนโดยใช้ Boyden chamber (Neuro Probe, Gaithersburg, MD)¹⁵ นำ upper chamber เคลือบแผ่นเมมเบรนโพลีคาร์บอเนต ที่มีรูขนาด 13 ไมครอน (Osmonic, Livermore, CA) ด้วย Matrigel (Corning, NY, USA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ลงใน lower chamber แล้ววางเมมเบรนที่เคลือบด้วย Matrigel ใน lower chamber นำเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ในสภาวะอดอาหาร ปริมาณ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน upper chamber ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในกลุ่มควบคุมจะใส่เซลล์ลงใน chamber ที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำเมมเบรนมาย้อมสีด้วย 0.5% crystal violet ที่ละลายใน 25% methanol ประมาณ 8 - 10 นาที นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยการนับเซลล์จะนับ 5 บริเวณต่อ 1 เมมเบรน แล้วหาค่าเฉลี่ย

4. การวัดการตายของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ โดยวิธี Annexin V- FITC flow cytometry

อดอาหารเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ด้วย trypsin-EDTA นำเซลล์จำนวน $2 - 5 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาย้อมสี Annexin V-FITC และ PI (Affymetrix eBioscience, California, USA) แล้ววัดการเรืองแสงของเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิส ด้วยเครื่อง flow cytometry (Cytoflex, Beckman Coulter, US) กลุ่มควบคุมคือ เซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 บ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS

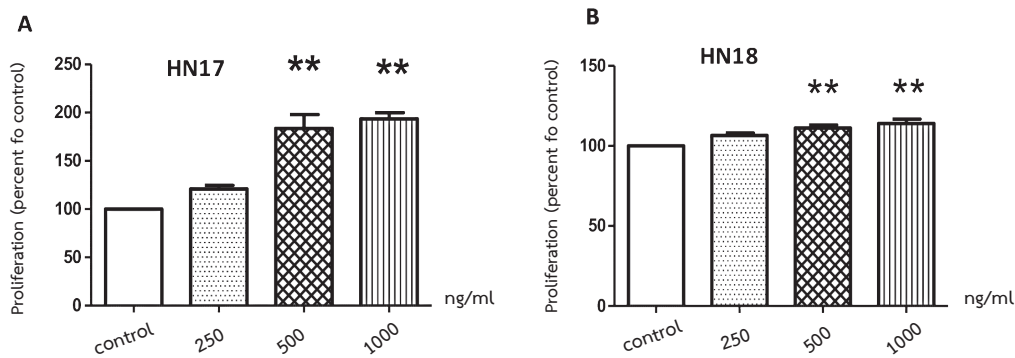
5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาการแบ่งตัว การรุกราน และการตายของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอแบบอะพอพโทซิสทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error of measurement; mean $\pm$ SEM) และเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รหัสโครงการเลขที่ 33/2556 หนังสือรับรองเลขที่ 007/2558

ผลการศึกษา

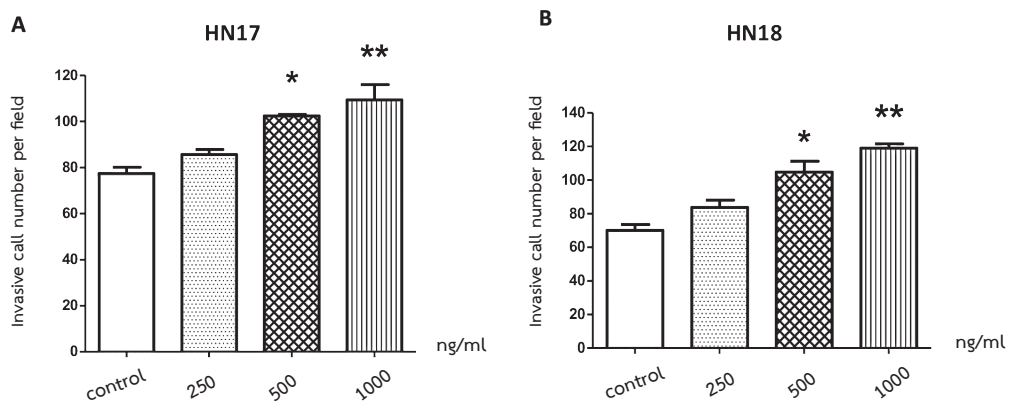
เมื่อนำ HN17 และ HN18 ที่บ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นตั้งแต่ 250, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการแบ่งตัวด้วยวิธี MTT พบว่าค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 121.028%, 183.899%, 193.749%, 106.623%, 111.183% และ 114.050% ตามลำดับ การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของ LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 (A) และ HN18 (B) เมื่อบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ (THP-1) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P.gingivalis* ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี MTT (mean± SEM, n = 3) (** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

ผลการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 เมื่อบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อ

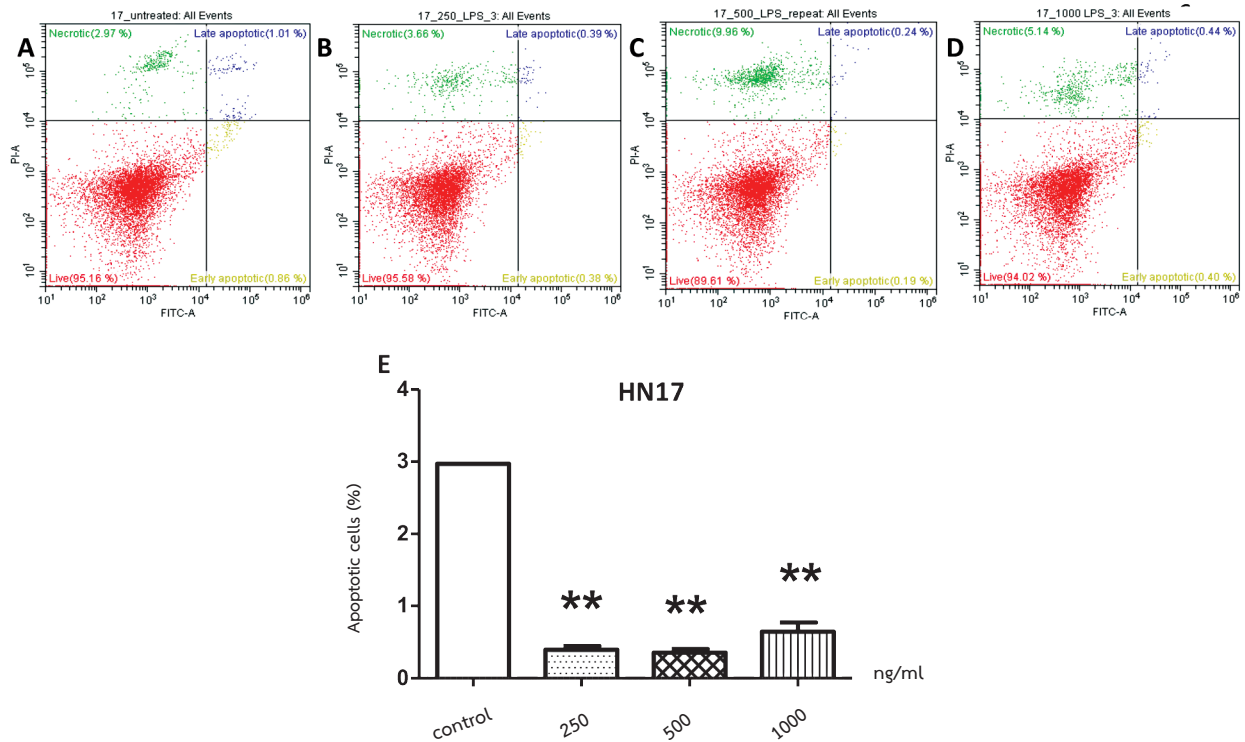
มิลลิลิตร มีการรุกรานผ่านเมมเบรนที่เคลือบด้วย Matrigel ของเซลล์มะเร็ง ทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 2



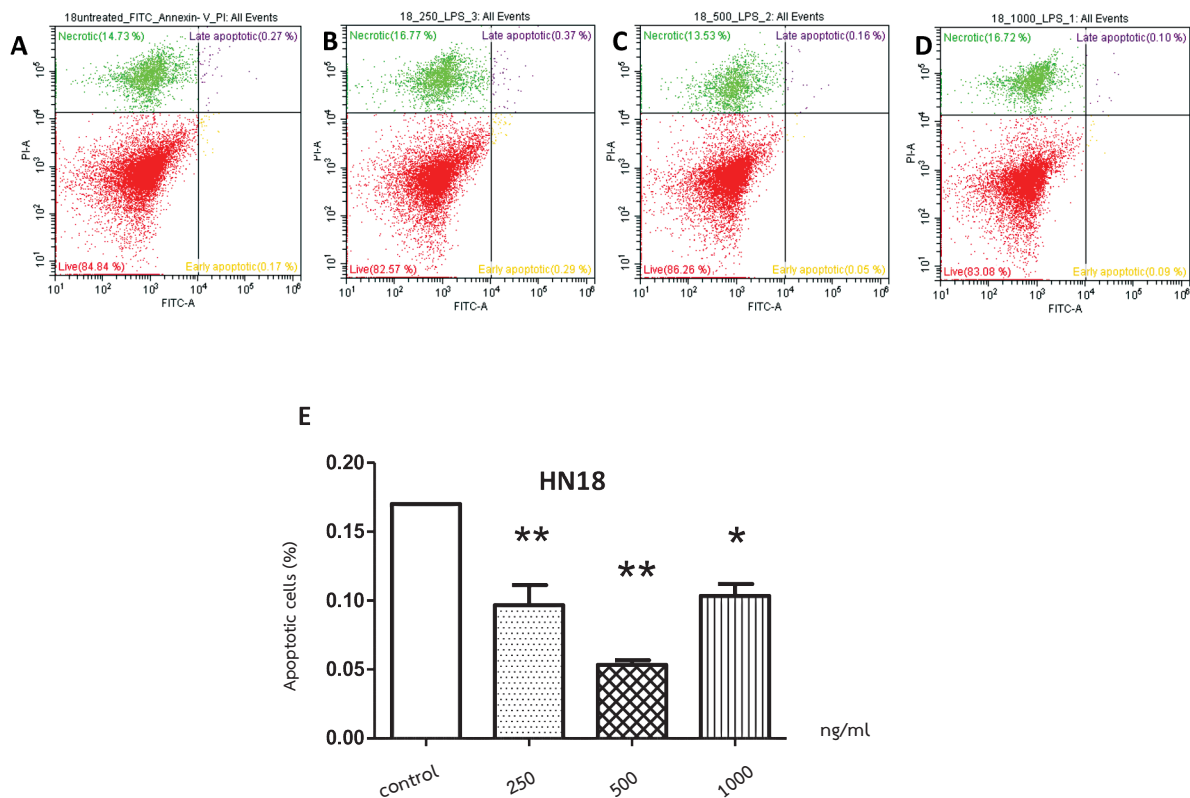
รูปที่ 2 การรุกรานของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 (A) และ HN18 (B) ผ่านโพลีคาร์บอเนตเมมเบรนที่เคลือบด้วย Matrigel เมื่อบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ (THP-1) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P. gingivalis* ความเข้มข้นต่างๆ (mean± SEM, n = 3) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

เมื่อทดลองนำอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด

ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ของ THP-1 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 3 และ 4



รูปที่ 3 การเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง HN17 เมื่อบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P. gingivalis* ความเข้มข้นต่างๆ กลุ่มควบคุม (A), 250 (B), 500 (C) และ 1,000 (D) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยย้อมสี Annexin V- FITC และ PI วัดด้วยวิธี Flow cytometry (** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) (mean $\pm$ SEM, n = 3)(E)



รูปที่ 4 การเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง HN18 เมื่อป้อนร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วย LPS จาก *P. gingivalis* ความเข้มข้นต่างๆ กลุ่มควบคุม (A), 250 (B), 500 (C) และ 1,000 (D) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยย้อมสี Annexin V- FITC และ PI วัดด้วยวิธี Flow cytometry (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) (mean $\pm$ SEM, $n = 3$) (E)

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ THP-1 ด้วย LPS จาก *P. gingivalis* ที่เป็นสาเหตุของการอักเสบในโรคปริทันต์อักเสบ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งชนิดปฏุมภูมิ (HN18) และชนิดแพร่กระจาย (HN17) เพิ่มความสามารถในการแบ่งตัว และการรุกรานมากขึ้นโดยแปรผันตามความเข้มข้นของการกระตุ้นด้วย LPS ที่มากขึ้น แต่ส่งผลต่อการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดลดลง

การอักเสบเรื้อรังในโรคปริทันต์อักเสบ ที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ *P. gingivalis* อาจมีความเชื่อมโยงและความเป็นไปได้ที่จะเกิดการพัฒนารอยโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ และทำให้มะเร็งมีความรุนแรงมากขึ้นโดยอาจเกี่ยวข้องกับ TAM ที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วย LPS จาก *P. gingivalis* จะหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับ

การอักเสบในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งถูกกระตุ้นจากตัวรับ toll-like receptor 4 (TLR4)¹⁶ ผ่านวิถีส่งสัญญาณภายในเซลล์ NF- κ B, MAPK, p38, JNK และ ERK¹² เหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่ง IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α เอนไซม์ iNOS และ COX-2¹⁷ ซึ่งมีบทบาทส่งเสริมในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง^{18 - 20} *P. gingivalis* ยังไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-8 และ MMPs ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (OSCC) ทำให้เกิดการรุกรานมากขึ้น²¹ รวมทั้งพบว่าในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ มีการยับยั้งการกระตุ้นตัวรับ Fas/FasL ซึ่งจะเข้าไปกระตุ้นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มแคสเปส สามารถลดการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสจากไมโทคอนเดรียใน T cell⁴ องค์ประกอบที่เป็นสภาวะแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง (tumor microenvironment) โดยเฉพาะการหลั่งสารพวก cytokines, chemokines, growth factors และ protease enzymes เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและการแพร่กระจายของมะเร็ง²²

มีรายงานว่า การเลี้ยงเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ ร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MCF-7 จะพบการหลั่งของ TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ช่วยควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสลดลง แต่มีการหลั่ง IL-8 และ IL-10 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงร่วมกับเซลล์แมโครฟาจที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น และมีผลสอดคล้องกันเมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 ร่วมกับยีนต้านการเกิดอะพอพโทซิส Bcl-2 และเซลล์มะเร็งที่ต้านทานการเกิดอะพอพโทซิส เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด RKO²³ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า การกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ THP-1 ด้วย LPS ของ *P. gingivalis* แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งคาดว่าจะมี cytokines และโปรตีนต่างๆ มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 และ HN18 มีผลทำให้มีการเกิดอะพอพโทซิสลดลงเช่นกัน

จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการถูกกระตุ้นให้ในเซลล์โมโนไซต์ จากเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก ที่ก่อโรคปริทันต์ อาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็ง การพัฒนาและการแพร่กระจายของมะเร็ง ซึ่งผลการศึกษาจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาและป้องกันโรคมะเร็งศีรษะและลำคอต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ ปี 2557 กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตามสัญญาทุนเลขที่ 08/2557

เอกสารอ้างอิง

- Jennifer R, Grandis JAP, Joel S, et al. Head and neck cancer: meeting summary and research opportunities. *Cancer Research* 2004;64:8126-9.
- Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2009;21:194-200.
- Nigel JP, Beasley RP, Suneale B, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Research* 2002;62:1315-20.
- Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: A review. *Clin Dev Immunol* 2010;2010:1-15.
- Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *BBA-Rev Cancer* 2009;1796:11-8.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141:39-51.
- Pries R, Thiel A, Brocks C, Wollenberg B. Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 2006;20:45-8.
- Li C, Shintani S, Terakado N, Nakashiro K, Hamakawa H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology Report* 2002;9:1219-23.
- Michaud DS, Fu Z, Shi J, Chung M. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk. *Epidemiol Rev* 2017;39:49-58.
- Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of periodontal diseases. A review. *Biotechnol Biotech Eq* 2013;27:3754-9.
- Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:779-85.
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001;13:85-94.
- Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol* 2012;2:98.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-45.
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Research* 1987;47:3239-45.

16. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.
17. Chanput W, Mes J, Vreeburg RAM, Sayekoul HFJ, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct* 2010;1:254-61.
18. Van Waes C. Nuclear factor-kappa 13 in development, prevention and therapy of cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1076-82.
19. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis* 2012;18:236-43.
20. Buchanan FG, Wang DZ, Bargiacchi F, DuBois RN. Prostaglandin E-2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2003;278:35451-7.
21. Ha NH, Park DG, Woo BH, et al. *Porphyromonas gingivalis* increases the invasiveness of oral cancer cells by upregulating IL-8 and MMPs. *Cytokine* 2016;86:64-72.
22. Thanee M, Yongvanit P, Loilome W. Tumor microenvironment and its functions. *Srinagarind Med J* 2012;27:424-32.
23. Weigert A, Tzieply N, von Knethen A, et al. Tumor cell apoptosis polarizes macrophages - Role of sphingosine-1-phosphate. *Mol Biol Cell* 2007;18:3810-9.

Abstract

Effects of monocyte conditioning medium induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides on proliferation, invasion and apoptosis of head and neck cancer cell lines

Arnit Toneluck, Sittichai Koontongkaew, Kamolparn Pugdee

Oral Biology Research Unit, Faculty of Dentistry, Thammasat University

Corresponding author: Kamolparn Pugdee, Oral Biology Research Unit, Faculty of Dentistry, Thammasat University, Khlong Neung, Khlong Luang, Pathumthani, 12120 E-mail: pkamolparn@gmail.com

Introduction: The purpose of this study is to investigate the effect of lipopolysaccharide from periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* on proliferation, invasion and apoptosis of head and neck cancer cells.

Methods: Human monocytic cells (THP-1) were activated by *P. gingivalis* lipopolysaccharides (250-1,000 ng/ml) for 24 hours, then the conditioning media of the activated THP-1 were collected, and co-cultured with head and neck cancer cell lines (primary cancer cell line: HN18 and metastatic cancer cell line: HN17). Cell proliferation, invasion and apoptosis were analyzed by MTT assay, modified Boyden chamber assay and flow cytometry Annexin V- FITC assay, respectively.

Results: The head and neck cancer cell lines when co-cultured with conditioning media of *P. gingivalis* LPS activated THP-1 cells showed the significant increase of cell proliferation and invasion in dose dependent manner. In addition, the conditioning media could inhibit apoptosis in both primary and metastatic cell lines.

Conclusion: These results suggested that activated monocytes by *P. gingivalis* LPS can enhance aggressiveness in both primary and metastatic head and neck cancer cell lines

Key words: Head and neck cancer, apoptosis, monocytes, *Porphyromonas gingivalis*