บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจหาเซลล์ที่มีคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์มะเร็งที่มีแหล่งกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอกหรือชั้นในจากเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 โดยใช้วิธี immunocytochemistry พบว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ให้ผลเป็นลบต่อ cytokeratin AE1&AE3 ซึ่งจะจำเพาะต่อเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิวและเซลล์เชื้อสายที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นกลาง(Brouty-Boýe *et al.,* 1992; Freshney, 2004) แต่ให้ผลเป็นบวกต่อ vimentin และ AFP ซึ่งจำเพาะต่อเซลล์ที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอกและชั้นใน ตามลำดับ (Turnpenny *et al.,* 2003; Li *et al.,* 2005; Strulovici *et al.,* 2007) โดยมีระดับการติดสีของ vimentin ในระดับเข้มและจำนวนเซลล์ที่ติดสีมากกว่าร้อยละ 50 ในส่วนของ AFP นั้นมีการติดสีในระดับปานกลางและจำนวนเซลล์ที่ติดสีมีมากกว่าร้อยละ 50 เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุมซึ่งได้แก่ เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและมีจำนวนโครโมโซมผิดปกติพบว่าให้ผลเป็นบวกทั้ง cytokeratin AE1&AE3, vimentin และ AFP จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอกและชั้นในปะปนกันอยู่แต่ไม่พบเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิวเลย ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 เป็นเซลล์เชื้อสายที่มีการเพาะเลี้ยงมาแล้วหลายรุ่น (Sangngam, 2007) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน จำนวนเซลล์บุผิวจะลดลง เหลือเพียงเซลล์ไฟโบรบลาสซึ่งเป็นเซลล์ที่มาจากเนื่อเยื่อชั้นนอกของทารก (Prusa and Hengstschläger, 2002) โดยส่วนใหญ่ เซลล์ไฟโบรบลาสที่ให้ผลเป็นบวกต่อ vimentin นั้นคาดว่าเป็นเซลล์มาจากส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) และเนื้อเยื่อค้ำจุน (mesenchymal tissues) ที่พบในเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอก (Cremer *et al.,* 1981) ซึ่งจะพบได้ในทุกรุ่นของการเพาะเลี้ยง (Kaviani *et al.,* 2003) นอกจากนี้เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ที่ให้ผลเป็นบวกต่อ AFP พบว่าจะมีการติดสีในระดับปานกลาง ซึ่งน้อยกว่าเซลล์ที่ให้ผลเป็นบวกต่อ vimentin ที่มีการติดสีในระดับเข้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยการติดสีที่แตกต่างกันนี้ เนื่องมาจากระดับการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์แตกต่างกัน (Almadori *et al.,* 2005) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) และสารกระตุ้นการเจริญ (growth factors) ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ในสภาพเพาะเลี้ยง (Freshney, 2004) โดยส่วนใหญ่แล้ว AFP จะจำเพาะต่อเซลล์ที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นใน โดยเฉพาะเซลล์ที่มาจากบริเวณไขกระดูก ต่อมไทมัส และสมอง (Kubota *et al.,* 2002) ซึ่งหากเซลล์เหล่านี้หลุดออกมาในเซลล์น้ำคร่ำแล้วนำมาเพาะเลี้ยง เซลล์อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้มีระดับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ลดลงอันเนื่องมาจากสาเหตุที่กล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการแสดงออกร่วมกันของ vimentin และ AFP จะพบได้ทั่วไปในเซลล์ที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงและเซลล์มะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งตับ (Osborn *et al.,* 1980; Franke *et al.,* 1981; Franke *et al,* 1983) เพราะในเซลล์มะเร็งนั้นต้องมีการแสดงออกร่วมกันของ protein marker อย่างน้อยสองชนิด (Gatter *et al.,* 1986) ส่วนในเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและมีจำนวนโครโมโซมผิดปกตินั้น มีเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิว เซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอกและชั้นในปะปนกันอยู่มากกว่า เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงได้ไม่นาน จึงยังคงคุณสมบัติของความหลากหลายของชนิดของเซลล์เอาไว้ (Freshney, 2004)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอกและชั้นใน และยังคงคุณสมบัติความหลากหลายของชนิดของเซลล์อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการตรวจสอบด้วยวิธีการนี้จะให้ความแม่นยำสูงแต่ก็ควรมีการตรวจซ้ำและใช้การตรวจสอบด้วยเทคนิคอื่นๆร่วมด้วยเช่นการใช้ flow cytometry (Howard *et al.,* 1994) เพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การตรวจหาเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์มะเร็งในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2

5.2.1 การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

การตรวจสอบอัตราการแบ่งเซลล์ด้วยการย้อมด้วย protein marker ที่จำเพาะถือว่าเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดในการแยกระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งออกจากกัน (Jenner *et al.,*

1996) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ให้ผลเป็นลบต่อ cyclin D1 แต่ให้ผลเป็นบวกต่อ Ki-67 โดยมีการติดสีในระดับเข้มและจำนวนเซลล์ที่ติดสีมีประมาณร้อยละ 26-50 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 แล้วพบว่าให้ผลเป็นบวกทั้ง cyclin D1 และ Ki-67 โดยติดสีเข้มทั้งคู่และมีจำนวนเซลล์ที่ติด cyclin D1 มากกว่าร้อยละ 50 และติด Ki-67 ประมาณร้อยละ 26-50 นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ ให้ผลเป็นลบต่อ cyclin D1 แต่ให้ผลเป็นบวกต่อ Ki-67 โดยมีการติดสีในระดับปานกลางและจำนวนเซลล์ที่ติดสีเท่ากับร้อยละ 26-50

จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีเพียงเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 เท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวกต่อ cyclin D1 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Utikal และคณะในปี 2005 ซึ่งพบการแสดงออกของ cyclin D1 เฉพาะมะเร็งชนิดที่สามารถแพร่กระจายได้ (malignant tumors) และในเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32, WM 266-4, HT 144, RPMI 7951 และ SK MEL 28 จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunocytochemistry ดังนั้นจึงจัดว่า cyclin D1 เป็น protein marker สำหรับเซลล์มะเร็งผิวหนังทุกชนิด (Inohara *et al.,* 1996) นอกจากนี้ยังพบว่ามีระดับการแสดงออกของ cyclin D1 สูงในมะเร็งผิวหนังชนิดต่างๆ และจะสามารถตรวจพบการแสดงออกของ cyclin D1 ได้มากขึ้นเมื่อเซลล์กำลังแบ่งตัว จึงอาจกล่าวได้ว่าการมีระดับของ cyclin D1 ที่มากขึ้นส่งผลให้เซลล์มีความสามารถในการแบ่งตัวได้สูงขึ้นจนสามารถเกิดเป็นมะเร็งได้ (Liang *et al.,* 2000) ทั้งนี้การที่เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติให้ผลเป็นลบต่อ cyclin D1 แสดงให้เป็นว่าเซลล์ทั้ง 4 ชนิดไม่ได้มีลักษณะเป็นเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเคลื่อนที่แพร่กระจายจึงไม่พบการแสดงออกของ cyclin D1

ในส่วนของ Ki-67 นั้น สามารถตรวจพบได้ในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวโดยเฉพาะในระยะ S ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ โดยระดับการแสดงออกที่มากขึ้นจะบ่งบอกถึงระดับความเป็นมะเร็งที่มากขึ้นและจะมีศักยภาพในการแบ่งตัวสูงขึ้นด้วย (Chassevent et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ Ki-67 ที่สูงกว่าปกติในเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ (Hep2) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งส่วนหัวและลำคอ (Detroid 562) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี immunocytochemistry และ real-time PCR (Jemino et al., 2007) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 มีระดับการติดสีของ cyclin D1 และ Ki-67 ในระดับเข้มมาก แสดงว่าเซลล์มีศักยภาพในการแบ่งตัวสูงกว่าเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อสาย AMC-K46 และ AC-F2 ถึงแม้ว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำทั้งสองนี้จะให้ผลเป็นลบต่อ cyclin D1 แต่ก็ยังมีระดับการติดสีของ Ki-67 มากกว่าเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีอัตราการแบ่งตัวสูงกว่าเซลล์ปกติและใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ก็อาจจะมีความไม่ชัดเจนในเรื่องของความแม่นยำอันเนื่องจากสาเหตุหลายประการ (Burry, 2000) เช่นถ้าเซลล์มีการสร้างโปรตีนในปริมาณน้อยและมีจำนวนเซลล์จำกัด จะทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาของ antibody เกิดขึ้นน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยกระบวนการตามปกติ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบด้วย นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีการเหล่านี้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาต่อในโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำมากขึ้น

5.2.2 ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม stem cell related genes ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2

ถึงแม้ว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 จะให้ผลเป็นลบต่อ protein marker ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน (Sangngam, 2007) แต่อาจจะยังคงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัยไว้ในกลุ่มประชากรของเซลล์ เนื่องจากทั้ง AMC-K46 และ AC-F2 เป็นเซลล์ที่พัฒนาได้จากเซลล์น้ำคร่ำ ซึ่งได้มีรายงานว่าพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดของตัวเต็มวัยในเซลล์น้ำคร่ำด้วย (Copi *et al.*, 2007)

เนื่องจากผลจากการศึกษาต้นกำเนิดของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอก จึงคาดว่าเซลล์ส่วนใหญ่ที่ล่องลอยอยู่ในน้ำคร่ำน่าจะเป็นเซลล์ที่หลุดออกมาจากผิวหนังของทารก ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังที่อาจพบในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำสองเชื้อสายนี้ ซึ่งได้แก่ยีน *ITGA6* และ *ITGB1* โดยจากการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีนควบคุมคือ *GAPDH* พบว่าเซลล์เชื้อสาย AMC-K46 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* ต่ำ และไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *ITGB1* ได้ ส่วนในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* ต่ำ และไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *ITGB1* ได้เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* และ *ITGB1* ที่พบในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำทั้งสองนี้แตกต่างจากระดับการแสดงออกของยีนที่พบในเซลล์น้ำคร่ำปกติ ($p \leq 0.05$) ที่มีระดับการแสดงออกของ *ITGA6* และ *ITGB1* สูง ทั้งนี้ ระดับการแสดงออกของยีน *ITGB1* ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 อาจมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีการดังกล่าว จึงทำการยืนยันผลที่ได้อีกครั้งด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* และ *ITGB1* ต่ำ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ ($p \leq 0.05$) ที่มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* และ *ITGB1* สูง

โดยทั่วไปแล้วจะพบระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* และ *ITGB1* สูงในเซลล์ keratinocyte (Jones and Watt, 1993) และเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังทั้งในสภาพ *in vitro* และ *in vivo* (Jones *et al.,* 1995) โดยยีนนี้จะมีหน้าที่ในการสร้างสารลามินินเพื่อช่วยในการยึดเกาะและการเคลื่อนตัวของเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนัง (Gu *et al.,* 2003) และยังเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างผิวหนังด้วย (Hertle *et al.,* 1991) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์น้ำคร่ำปกติที่นำมาตรวจสอบนั้นมีคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังอยู่ เนื่องจากมีระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองตัวนี้สูงและเป็นเซลล์ที่ได้มาจากกระบวนการดูดเจาะน้ำคร่ำจากทารกในครรภ์ที่มีอายุ 15-19 สัปดาห์ (Kaviani *et al.,* 2003) ซึ่งในน้ำคร่ำนั้นจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มาจากส่วนต่างๆของทารก รวมทั้งเซลล์ผิวหนังของทารกด้วย (Tsai *et al.,* 2004) ดังนั้นเซลล์จะยังคงลักษณะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเอาไว้ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Zhou และคณะในปี 2004 พบว่าในเซลล์ผิวหนังของทารกนั้นประกอบไปด้วยเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนัง 2 ชนิด ได้แก่ keratinocyte และ epidermal stem cells ซึ่งสามารถแยกเซลล์เหล่านี้ออกมาเพาะเลี้ยงได้และมีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* และ *ITGB1* สูง ดังนั้นจึงจัดว่ายีนทั้ง 2 ตัวนี้เป็น gene marker ที่จำเพาะต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนัง (Li *et al.,* 1998) ทั้งนี้ หากขาดการแสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์น้ำคร่ำหรือในเซลล์ของทารก จะส่งผลให้สมองของทารกทำงานผิดปกติ ผิวหนังพุพอง หลุดลอก และตายในที่สุด (Georges-Labouesse *et al.,* 1996)

ส่วนในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ไม่พบลักษณะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังอยู่เลย เนื่องจากมีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* และ *ITGB1* ต่ำกว่า *GAPDH* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์ผ่านการเพาะเลี้ยงมาแล้วมากกว่า 100 รุ่นและมีการกลายพันธุ์ไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จนส่งผลให้มีความผิดปกติทางโครโมโซมและสูญเสียคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Sangngam, 2007) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาเซลล์น้ำคร่ำมนุษย์ที่ถูกเพาะเลี้ยงมาแล้ว 36 รุ่น และมีจำนวนโครโมโซมปกติ จะพบการแสดงออกของยีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย ได้แก่ *EN-1, c-RET, PTX3* และ *NURR1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทของสมองส่วนกลาง (McLaughlin *et al.,* 2006)

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ศึกษาลักษณะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบเกิดเองในมนุษย์ ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานการศึกษาไม่ว่าจะเป็นในมนุษย์หรือสัตว์ และเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนกว่านี้ ควรเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมาศึกษาให้มากขึ้น

5.2.3 ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม cancer related genes ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR พบว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 มีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* และ *TGF-β1* ต่ำ แต่มีระดับการแสดงออกของยีน *hTERT* สูง ซึ่งได้ผลต่างจากวิธี real-time PCR โดยพบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* และ *hTERT* สูง แต่มีระดับการแสดงออกของ *TGF-β1* ต่ำ ส่วนเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 เมื่อศึกษาด้วยวิธี semi-quantitative reverse transcriotase PCR พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* สูง แต่มีระดับการแสดงออกของยีน *TGF-β1* และ *hTERT* ต่ำ ส่วนในการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* กับ *hTERT* สูง แต่ *TGF-β1* ต่ำ ซึ่งถึงแม้ว่าผลการทดลองด้วยการใช้สองเทคนิคควบคู่กันนั้น จะให้ผลที่แตกต่างกันทั้งในเซลล์น้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก จ) พบว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำทั้งสองมีระดับการแสดงออกของยีน *SKI*, *TGF-β1* และ *hTERT* ไม่แตกต่างจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟารินค์ Hep2 ($p \leq 0.05$) ส่วนในเซลล์น้ำคร่ำปกติที่พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *TGF-β1* และ *hTERT* สูง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์น้ำคร่ำปกติเป็นเซลล์ที่ได้จากทารกซึ่งยังคงมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เทโลเมอเรสเพื่อใช้ในการแบ่งตัวได้ โดยจากการนำเซลล์น้ำคร่ำมาเพาะเลี้ยงจะพบการแสดงออกของยีน *hTERT* และพบการสร้างเอนไซม์เทโลเมอเรสในเซลล์รุ่นที่ 5 จนถึงรุ่นที่ 21 เท่านั้น (Kim *et al.,* 2007) นอกจากนี้ ยังมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายงานว่าพบการแสดงออกของยีนนี้ในเซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดและเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความสามารถในการแบ่งตัวได้ไม่หยุด (Shay and Bacchetti, 1997; Kim *et al.,* 1994) ซึ่งเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 ต่างก็มีคุณสมบัติดังที่กล่าวมานี้ เพราะมีการแสดงออกของยีน *hTERT* สูง และมีลักษณะของเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการแบ่งตัวได้ไม่หยุด (Cong *et al.,* 2002)

นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์น้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* สูง แต่ *TGF-β1* ต่ำ ซึ่งยีนทั้งสองตัวนี้ เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นมะเร็งผิวหนังที่ทำงานตรงข้ามกัน โดยจะพบระดับการแสดงออกของยีน *SKI* สูง ในเซลล์ที่เป็นมะเร็งผิวหนัง melanomas ชนิดที่แพร่กระจายได้ (Reed *et al.,* 2001) ทั้งนี้ระดับการแสดงออกของ *SKI* ที่สูงขึ้น จะสามารถยับยั้งการทำงานหรือกดการแสดงออกของยีน *TGF-β1* ได้ (Chen *et al.,* 2003) โดยทั่วไปแล้ว *TGF-β1* มีหน้าที่ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Francis *et al.,* 2000) นอกจากนี้ยังไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanomas ด้วย (Rodeck *et al.,* 1994) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า หากเซลล์มีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* สูงแล้ว จะต้องมีระดับการแสดงออกของยีน *TGF-β1* ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 ส่วนในเซลล์น้ำคร่ำปกติ กลับพบว่าให้ผลตรงกันข้ามคือ มีระดับการแสดงออกของยีน *TGF-β1* สูงกว่ายีน *SKI* ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน *SKI* มีคุณสมบัติเป็น oncogene ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้น จึงไม่พบในเซลล์ปกติ และระดับการแสดงออกที่สูงของ *TGF-β1* นั้น อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ซึ่งพบได้ในเซลล์ปกติหลายชนิด เช่น เซลล์ผิวหนัง (melanocytes) และเซลล์ของระบบประสาท เป็นต้น (Stavroulaki *et al.,* 2008; Ito *et al.,* 2006) นอกจากนี้ *TGF-β1* ยังช่วยรักษาสมดุลของเซลล์ไว้ด้วยการทำงานตรงข้ามกับ *hTERT* (ช่วยให้เซลล์แบ่งตัว) ทำให้เซลล์ยังคงสภาพเป็นเซลล์ปกติได้

ถึงแม้ว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 จะผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานซึ่งแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติที่ผ่านการเพาะเลี้ยงได้ไม่เกิน 1-2 สัปดาห์ อีกทั้งในยังใช้สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน โดยเซลล์เชื้อสายทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด DMEM ส่วนเซลล์น้ำคร่ำปกติจะถูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพาะเลี้ยงในอาหารชนิด RPMI 1640 ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีส่วนประกอบพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับเซลล์แตกต่างกัน โดยปกติแล้วจะใช้ DMEM ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เกาะเนื่องจากมีการส่งเสริมให้เซลล์เกิดการสร้างโมเลกุลที่ช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุเลี้ยงได้ดีกว่าการใช้ RPMI 1640 ในการเพาะเลี้ยง (Perng *et al.,* 1997) เนื่องจาก RPMI 1640 จะเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ลอย (suspension cells) และยังช่วยให้เซลล์เกิดการแพร่กระจายได้ดีกว่าจากการศึกษาในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanomas (Prezioso *et al.,* 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารทั้งสองชนิดนี้ยังไม่ก่อให้เกิดความแตกต่างทางคุณลักษณะของเซลล์มะเร็งระบบประสาท (astrocytomas) ไม่ว่าจะเป็นรูปร่างหรือการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ (De la Hasa *et al.,* 2005) ทั้งนี้สารประกอบต่างๆ ในซีรัมที่ใช้ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ก็ไม่ส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงต่อระดับการแสดงออกของยีนได้ เนื่องจากผ่านกระบวนการ heat-inactivation ที่อุณหภูมิ 56 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาใช้ ดังนั้นสารกระตุ้นการเจริญต่างๆ ในซีรัมจึงเสียสภาพไป และยังช่วยกำจัดปัญหาของความผิดพลาดของผลจากการจากการใช้ซีรัมที่แตกต่างกันได้ (Sato et al., 2003) ส่วนการเติมสารบางชนิด เช่น AmnioMAX^{TM} พบว่าเป็นเพียงสารกระตุ้นที่ใช้ในเซลล์น้ำคร่ำเพื่อให้เซลล์มีการเจริญที่ดี (healthy) และมีการแบ่งตัวได้มากพอสำหรับการนำไปวินิจฉัยในระดับโครโมโซมและการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ ดังนั้นจึงไม่ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงใดๆ ภายในเซลล์น้ำคร่ำ ไม่ว่าจะเป็นระดับการแสดงออกของยีนและปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ (Hirota *et al.,* 1989; Knutsen, 1990; Biddle *et al.,* 1992)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีรูปแบบในการแสดงออกของยีนคล้ายกับเซลล์มะเร็งเชื้อสายผิวหนัง C32 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟารินก์ Hep2 โดยมีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* และ *hTERT* สูง แต่ *TGF-β1* ต่ำ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ ($p \leq 0.05$) จึงอาจกล่าวได้ว่า เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำทั้งสองมีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved