



ผลของสารซิมวาสเตดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี 2 และ -9 ในเซลล์ไลน์มะเร็งเอชเอสซี 4 และ เซลล์ไลน์มะเร็งซีซีแอล 25

ริลา ชัยสุภรัตน์ ทบ.¹

ผกาวัลย์ มุสิกพงศ์ วท.บ.²

พลุตา ธีญญะกิจไพศาล ทบ. Ph.D.³

¹ ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารซิมวาสเตดิน ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ในเซลล์ไลน์มะเร็งเอชเอสซี-4 และ เซลล์ไลน์มะเร็งซีซีแอล-25

วัสดุและวิธีการ เซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดจำนวนเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที เอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้หลังการทดสอบ จะถูกตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีเจลาตินไฮโมกราฟี ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One way ANOVA ($\alpha < 0.05$)

ผลการศึกษา สารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์ไลน์มะเร็งซีซีแอล-25 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์มีผลยับยั้งระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารซิมวาสเตดินไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ในเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4

สรุป ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดินที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งเอชเอสซี-4 และ เซลล์ไลน์มะเร็งซีซีแอล-25 อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ สารซิมวาสเตดินมีผลยับยั้งระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(ว กบด อุฬาฯ 2547;27:59-67)

คำสำคัญ : สารซิมวาสเตดิน การทดสอบความเป็นพิษ เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เจลาตินไฮโมกราฟี

บทนำ

มะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลกและของประเทศไทย ถึงแม้ว่าความรู้ทางด้านการแพทย์ในการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการผ่าตัด ฉายรังสี และเคมีบำบัด ทำให้การรักษาได้ผลในระดับหนึ่ง แต่อุปสรรคสำคัญต่อการรักษาของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งคือความสามารถในการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์มะเร็ง การดื้อต่อการฉายรังสีและเคมีบำบัด รวมทั้งการแพร่กระจายลุกลามของมะเร็ง ทำให้เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของผู้ป่วย¹⁻³

เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เป็นเอนไซม์กลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinases : MMPs) ประกอบด้วยเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 (MMP-2) และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 (MMP-9) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยสลายคอลลาเจนชนิด IV ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อใต้ฐานเซลล์⁴ ได้มีการรายงานความสัมพันธ์ระหว่างระดับการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 กับความสามารถในการลุกลามและการแพร่กระจายของมะเร็ง²⁻³ โดยพบว่าเซลล์มะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาในรอยโรคที่มีการแพร่กระจายจะมีระดับเอนไซม์ทั้งสองสูงกว่ารอยโรคที่ไม่แพร่กระจาย⁵⁻⁷ ดังนั้นการค้นพบสารที่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ในเซลล์มะเร็งจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็ง

สแตติน (statin) เป็นกลุ่มยาที่ใช้ในการรักษาและป้องกันผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) เนื่องจากระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง โดยมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เฮกซ์ไฮโดรเมทิลกลูตาไธโอนโคเอรีดักเตส (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการเปลี่ยนอะเซทิลโคเอเป็นเมวาโลเนต (mevalonate) มาใช้ในการสร้างสารคอเลสเตอรอล⁸ ทำให้เซลล์ในร่างกายต้องใช้คอเลสเตอรอลในกระแสเลือด และส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง นอกจากผลโดยตรงของสารสแตตินในการลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สารสแตตินยังสามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีการสะสมตะกอนบนผนังหลอดเลือด (atherosclerosis) เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันเฉียบพลัน⁹⁻¹⁰ โดยสแตตินจะไปยับยั้งการ

สร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ของเซลล์แมโครฟาจ (macrophage) จึงช่วยป้องกันการแตกของก้อนตะกอนและการเกิดก้อน thrombus ได้¹¹⁻¹²

ได้มีการรายงานผลของสารกลุ่มสแตตินในการยับยั้งการเกิดและการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมและมะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูทดลอง¹³⁻¹⁵ เมื่อรวมกับความสามารถของสารกลุ่มสแตตินในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ดังนั้นสารสแตตินจึงเป็นสารที่น่าสนใจเพื่อนำมาศึกษาผลที่มีต่อเซลล์มะเร็ง โดยการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารซิมวาสแตติน (simvastatin) ซึ่งเป็นยาในกลุ่มสแตตินที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ไลน์ (cell line) ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ เซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 (HSC-4, Japanese Cancer Research Bank: JCRB0624) และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 (WISH, ATCC number: CCL-25) เซลล์จะถูกนำมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร (60 mm culture dish, Nunc, Denmark) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย น้ำยาดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM ; Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% fetal bovine serum), แอลกลูตามีนความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-glutamine), เพนนิซิลินจีความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin-G), สเตรปโตมัยซินซัลเฟตความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 µg/ml streptomycin sulfate) และแอมโฟเทอริซินบีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (20 µg/ml amphotericin B) เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเต็มจานเพาะเลี้ยงเซลล์จะทำการซัปล์เจอร์ (subculture) โดยใช้เอนไซม์ทริปซินอีดีทีโอความเข้มข้นร้อยละ 0.25 (0.25% trypsin-EDTA) แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ อาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดได้จาก GibcoBRL (NY, USA)

การทดสอบเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารซิมวาสเตติน

เซลล์ถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate, Nunc, Denmark) ที่ความหนาแน่น 100,000 เซลล์/มิลลิลิตร นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดปราศจากซีรั่ม 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 ชั่วโมงเพื่อล้างซีรั่มออก แล้วจึงเริ่มทำการทดสอบโดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดปราศจากซีรั่มที่มีสารซิมวาสเตติน (N21436, Aapin Chemical Limited, Abington, UK) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ จนครบเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาทำการวิเคราะห์ผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ การศึกษาครั้งนี้เซลล์จะถูกทดสอบซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

วิธีทดสอบเอ็มทีที (MTT assay)

การวิเคราะห์ที่ใช้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Freshney¹⁶ กล่าวโดยย่อคือ ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดสอบในสภาวะที่มีสารซิมวาสเตติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดปราศจากฟีนอลเรด (DMEM without phenol red) ที่มีสารละลายเอ็มทีที (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเข้าตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเอ็มทีทีและใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) เพื่อละลายผลึกสีม่วงของเอ็มทีทีฟอร์มาซาน (MTT formazan) ได้เป็นสารละลายสีม่วง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} = \left[\frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}} \right] \times 100$$

นำข้อมูลจากการคำนวณไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส (SPSS; statistical package for the social sciences) หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ

วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกทางเดียว (one-way analysis of variance) และแบบทดสอบของเซฟเฟ (Scheffe' multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ด้วยวิธีเจลาตินไซโมกราฟี (gelatin zymography)

วิธีวัดระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ด้วยวิธีเจลาตินไซโมกราฟี ดัดแปลงมาจาก Kusano และคณะ¹⁷ โดยย่อคือ เอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้หลังการทดสอบ จะถูกแยกตามมวลโมเลกุลด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) ในสภาวะ non-reducing โดยใช้อะคริลามายด์เจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (SDS-PAGE) และมีความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ภายหลังจากการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว นำเจลมาล้างด้วยสารละลายไตรตอนเอ็กซ์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (2.5% triton X-100) เพื่อกำจัดเอสดีเอสออก จากนั้นนำเจลไปแช่ในบัฟเฟอร์ (0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 50mM Tris HCl pH 7.5, 0.1% Brij35) เพื่อปรับสภาพให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ แล้วนำเข้าตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรท จากนั้นย้อมเจลด้วยคูแมสซีบีริลเลียนบลูอาร์ 250 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (0.5% coomassie brilliant blue R250, Sigma, MO, USA) แล้วทำการล้างสีส่วนเกิน (destain) จะปรากฏแถบโปรตีนเจลาตินน้ำเงิน ซึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบสีด้วยเดนซิโตมิเตอร์ (GS-700 imaging densitometer) และคำนวณด้วยโปรแกรม Molecular Analyst Software version 1.5 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

เนื่องจากวิธีเจลาตินไซโมกราฟี เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ที่อยู่ในรูปก่อนทำงาน (proactive form) และพร้อมทำงาน (active form) ที่อยู่ในแผ่นเจล สามารถย่อยเจลาตินที่ผสมอยู่ในเนื้อเจลได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 (enzyme activity) คำนวณจากอัตราส่วนระหว่างระดับเอนไซม์ในรูปพร้อมทำงานต่อเอนไซม์ในรูปก่อนทำงาน

ผลการศึกษา

สารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25

จากการวิเคราะห์ผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทดสอบเอ็มทีทีและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยเซลล์จะถูกทดสอบกับสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คิดเป็นร้อยละ 73.11 ± 27.03 และ 60.76 ± 20.96 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (กราฟรูปที่ 1)

ส่วนเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 สารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 64.81 ± 34.7 และ 63.49 ± 41.1 ตามลำดับ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (กราฟรูปที่ 1)

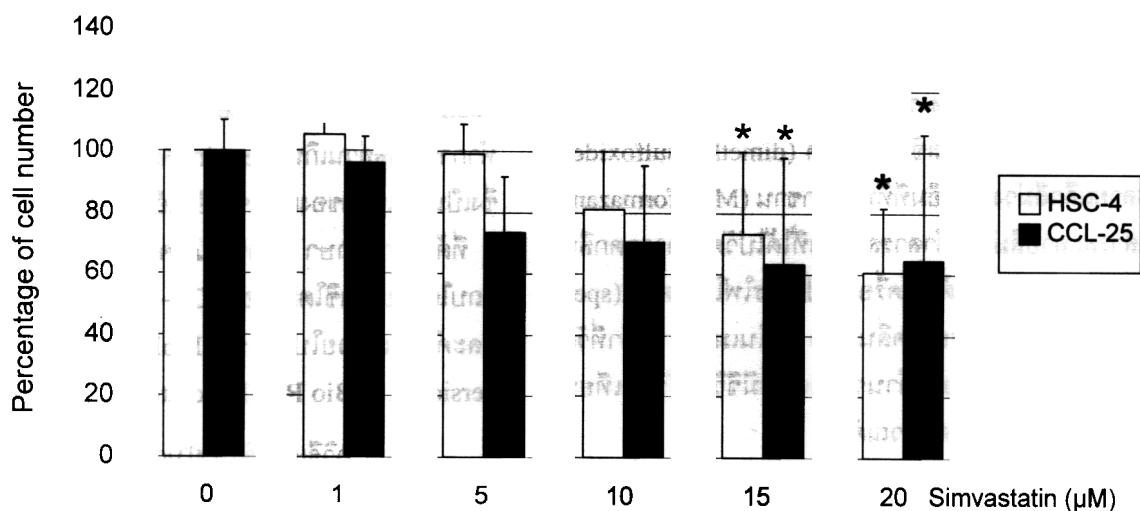
เมื่อพิจารณาจากผลที่ได้ในกราฟรูปที่ 1 ดังนั้นระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารซิมวาสเตตินที่ใช้ในการทดลองเพื่อวิเคราะห์

ระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ด้วยวิธีเจลาตินไซโมกราฟฟี โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 คือที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

ผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ในเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25

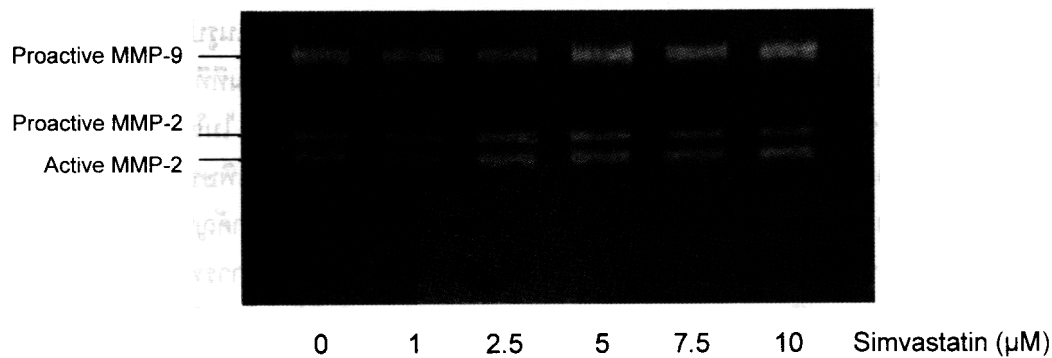
จากวิธีเจลาตินไซโมกราฟฟี เซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 สร้างทั้งเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 โดยเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 พบอยู่ในรูปแบบก่อนทำงานและพร้อมทำงาน ส่วนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 อยู่ในรูปแบบก่อนทำงานเท่านั้น (รูปที่ 2) ขณะที่เซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 พบเฉพาะเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่อยู่ในรูปก่อนทำงานและพร้อมทำงานเท่านั้น (รูปที่ 3 ก)

ในเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 พบว่าสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$, รูปที่ 2) ส่วนเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 พบว่าสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีผลลดระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, รูปที่ 3 ข)



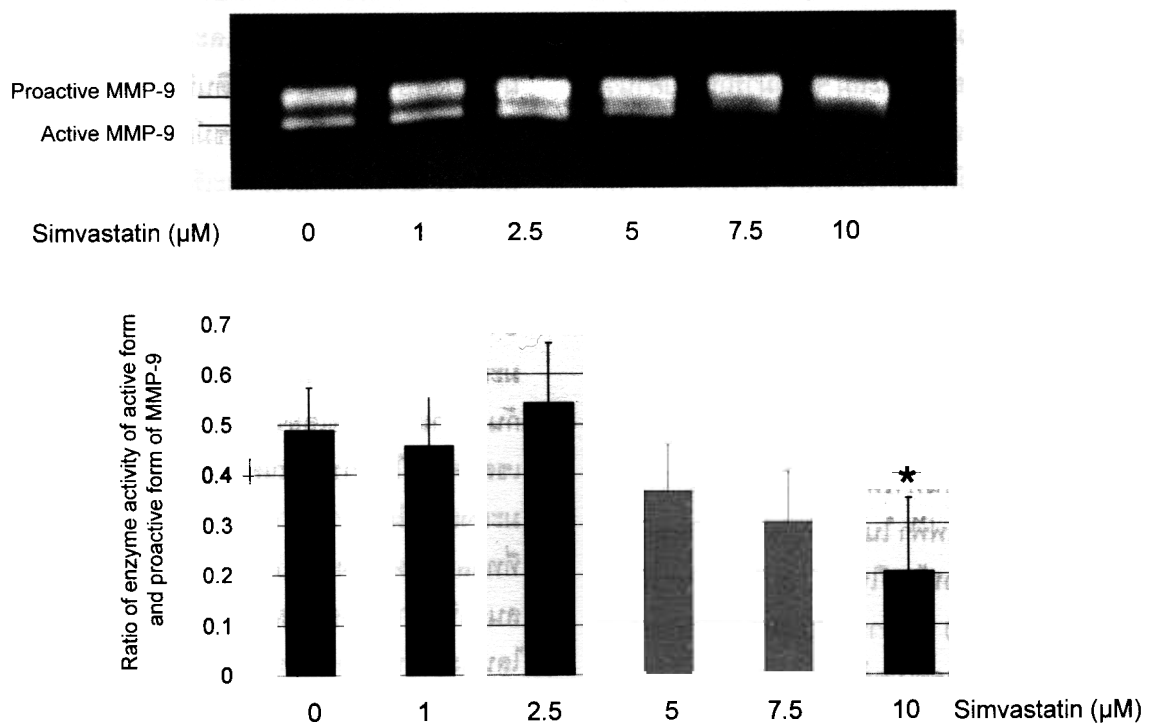
รูปที่ 1 ผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินตามความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $p < 0.05$, $n = 12$)

Figure 1 The effect of simvastatin on the proliferation of HSC-4 and CCL-25 via the MTT assay. Cells were treated with the increasing concentrations of simvastatin for 24 hours. Data showed in mean $\pm$ S.D. (* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n = 12$)



รูปที่ 2 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงผลของสารซิมวาสเตตินต่อการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งเฮซเอสซี-4 ที่ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตติน ตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Figure 2 Gelatin zymography showed the effect of simvastatin on the gelatinolytic activity of MMP 2 and MMP-9 in HSC -4. Cells were treated with the increasing concentrations of simvastatin for 24 hours.



รูปที่ 3 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงผลของสารซิมวาสเตตินต่อการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25

- ก. ระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 จากอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้หลังการทดสอบ ด้วยสารซิมวาสเตติน ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในรูปพร้อมทำงานต่อรูปก่อนทำงาน และความเข้มข้นของสารซิมวาสเตติน ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง, * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Figure 3. Gelatin zymography showed the effect of simvastatin on the MMP-9 gelatinolytic activity in CCL-25.

- A. The MMP-9 gelatinolytic activities from conditioned media. Cells were treated with the increasing concentrations of simvastatin for 24 hours.
- B. Graph presented the relationship between ratio of MMP-9 gelatinolytic activity of active and pro-active forms and the increasing concentrations of simvastatin. Data are depicted as mean $\pm$ S.D. The data are representative of three separate experiments. * significant difference from the control group at $p < 0.05$.

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเป็นพิษหรือผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสารซิมวาสเตดินต่อเซลล์ไลน์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์เฮชเอสซี-4 และเซลล์ซีซีแอล-25 โดยการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที รวมทั้งศึกษาผลของสารซิมวาสเตดินที่มีต่อระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ในเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธีเจลาตินไซโมกราฟี

การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสารเอ็มทีที^{16,18} อาศัยหลักการในการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ที่พบในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของเซลล์ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีที เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง เมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม จะสามารถนำไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ได้ ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก สีม่วงของสารละลายของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซนก็จะมีค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งทำให้วิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้วัดสารทดสอบในแง่ของความเป็นพิษของสารและการเพิ่มจำนวนเซลล์

วิธีเจลาตินไซโมกราฟี เป็นวิธีใช้วัดระดับการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเจลาติเนส¹⁷ ประกอบด้วยเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มนี้ที่สามารถย่อยเจลาตินทำให้เอนไซม์ซึ่งถูกแยกตามมวลโมเลกุลด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้า ในสภาวะ non-reducing และเมื่อมีการปรับสภาพของเอนไซม์ให้อยู่ในสภาพเหมาะสมกับการทำงาน (renaturation) สามารถย่อยเจลาตินที่ผสมอยู่ในเนื้อเจล เกิดเป็นแถบสีของเจลาที่ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue ขณะที่ส่วนอื่นของเจลที่ยังมีเจลาตินอยู่จะย้อมติดสีน้ำเงิน ทำให้วิธีเจลาตินไซโมกราฟีสามารถวัดระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ที่อยู่ในรูปก่อนทำงาน และพร้อมทำงาน โดยระหว่างการปรับสภาพของเอนไซม์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับการทำงานเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ในรูปก่อนทำงาน อาจเกิดการ auto cleavage ด้วยกลไกที่ไม่ทราบชัดเจน¹⁹ ทำให้สามารถย่อยเจลาตินในเนื้อเจลได้เหมือนกับรูปพร้อมทำงาน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 จึงคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างความสามารถในการย่อยสลายเจลาตินที่

ผสมในเนื้อเจลของเอนไซม์ในรูปพร้อมทำงานและก่อนทำงาน จากการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที พบว่าสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือมีค่าความเป็นพิษของเซลล์ไลน์มะเร็งเฮชเอสซี-4 และซีซีแอล-25 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่าสารกลุ่มสเตตินได้ถูกนำมาศึกษาในแง่ของสารยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง โดยยับยั้งการแบ่งตัวในระยะ G¹-S ผ่านทาง p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1}, Rho small GTPase และ geranylgeranyl phosphoprotein และกระตุ้นการเกิด apoptosis²⁰⁻²⁵

นอกเหนือจากความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินที่มีต่อเซลล์มะเร็งเฮชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 กลุ่มผู้วิจัยยังพบว่าสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีผลลดการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 แต่ไม่มีผลในเซลล์มะเร็งเฮชเอสซี-4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งเฮชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 มีกลไกควบคุมการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งซึ่งมาจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต้นกำเนิดของเซลล์ที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์เฮชเอสซี-4 ได้จากมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์คาร์ซิโนมาบริเวณลิ้น²⁶ และเซลล์ซีซีแอล-25 ได้จากมะเร็งเยื่อหุ้มบริเวณปากมดลูก²⁷ จึงทำให้การตอบสนองต่อสารที่ทดสอบแตกต่างกันไป เหมือนกับการรายงานผลของการตอบสนองที่แตกต่างของเซลล์ไลน์มะเร็งเมลาโนมา B16 และเซลล์ไลน์มะเร็งไทโรมา EL4 ต่อสารอินเตอร์เฟอรอนแกรมมา²⁸

ความสามารถของสารซิมวาสเตตินในการลดระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 สอดคล้องกับผลของสารซิมวาสเตตินที่ทดสอบในเซลล์สร้างกระดูก เซลล์แมคโครฟาส และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด^{11,12,29-31} ถึงแม้การศึกษาครั้งนี้จะไม่สามารถบอกถึงกลไกของสารซิมวาสเตตินในการยับยั้งการหลังเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งได้ แต่จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่าสารสเตตินสามารถยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอลซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ vesicle membrane ในการขนส่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ อีกทั้งสารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการทำงานของ

ของโปรตีน Ras ซึ่งเป็น small GTP-binding protein ทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งสารออกนอกเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และรูปร่างของเซลล์ ดังนั้นสารซิมวาสเตตินจึงอาจมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในการขนส่งเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ออกนอกเซลล์ หรือผ่านทางโปรตีน Ras ก็ได้^{21,31} แต่อย่างไรก็ดี แนวความคิดนี้ต้องทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์ต่อไป

สรุป

งานวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงผลของสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 และเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 และสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีผลลดระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์มะเร็งซีซีแอล-25 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการนำสารซิมวาสเตตินมาใช้ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง หรือควบคุมการแพร่กระจายของมะเร็งผ่านทางเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 และ -9 ควรที่จะมีการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการในแง่ต่าง ๆ ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดี สุราฤทธิ์ ภาควิชาสรีรและชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็งเอชเอสซี-4 ขอขอบพระคุณ Associate Professor Jack Windson, Dental school, Indiana University ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ซีซีแอล-25 สำหรับใช้ในงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ผศ.ทพญ. ดร. วิสาชะ ลิ้มวงศ์ และ ผศ. ทพญ. ดอลลี เมธธาธิป ที่ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและอนุญาตให้ใช้อุปกรณ์ในงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนส่งเสริมการวิจัยของเงินกองทุนเพื่อการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2546 และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2545

เอกสารอ้างอิง

- Bohle AS, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 1999;384:133-40.
- Johansson N, Ahonen M, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci*. 2000;20;57:5-15.
- John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7:14-23.
- Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press, Inc. New York, 2000.
- Impola U, Uitto V, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H, Isaka K, Saarialho-Kere U. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metallo elastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol*. 2004; 202: 14-22.
- Tanioka Y, Yoshida T, Yagawa T, Saiki Y, Takeo S, Harada T, Okazawa T, Yanai H, Okita K. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. *Br J Cancer*. 2003;89:2116-21.
- Dunne AA, Sesterhenn A, Gerisch A, Teymoortash A, Kuropkat C, Werner JA. Expression of MMP-2, -9 and -13 in cell lines and fresh biopsies of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res*. 2003;23:2233-9.
- Farnier M, Davignon J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *Am J Cardiol* 1998;82:3J-10J.
- Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1-10.
- Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol* 2002;86:5-18.
- Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 8:1671-8.
- Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, et al. An HMG-CoA

- reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;103:276-83.
13. Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. Statins can inhibit proliferation of human breast cancer cells in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003;111:47-8.
 14. Stirewalt DL, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE. Mevastatin can increase toxicity in primary AMLs exposed to standard therapeutic agents, but statin efficacy is not simply associated with ras hotspot mutations or overexpression. *Leuk Res*. 2003 ;27:133-45.
 15. Li HY, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE. Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood*. 2003;101:3628-34.
 16. Freshney RI. *Culture of animal cells : A manual of basic technique*. 3th edition. New York: Wiley-Liss, Inc., 1994.
 17. Kusano K, Miyaoura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9 and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvariae : association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998; 139:1338-45.
 18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*. 1983;65:55-63.
 19. Lantz MS, Ciborowski P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol*. 1994;235:563-94.
 20. Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB. Synchronization of tumor and normal cells from G₁ to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*. 1991;51:3602-9.
 21. Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ;99:8301-5.
 22. Weiss RH, Ramirez A, Joo A. Short-term pravastatin mediates growth inhibition and apoptosis, independently of Ras, via the signaling proteins p27Kip1 and P13 kinase. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1880-90.
 23. Bouterfa HL, Sattelmeyer V, Czub S, Vordermark D, Roosen K, Tonn JC. Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res*. 2000;20:2761-71.
 24. Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, Egido J. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis*. 2002;161:17-26.
 25. El-Ani D, Zimlichman R. Simvastatin induces apoptosis of cultured rat cardiomyocytes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2001;12(4):325-38.
 26. Japanese Cancer Research Bank (JCRB), Japan. (<http://www.cellbank.nihs.go.jp>)
 27. American Type Culture Collection (ATCC), USA. (<http://www.atcc.org>).
 28. Maekawa R, Kitagawa T, Hojo K, Wada T, Sato K. Distinct antitumor mechanisms of recombinant murine interferon-gamma against two murine tumor models. *J Interferon Res*. 1988;8:227-39.
 29. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins Inhibit Secretion of Metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:769-775.
 30. Thunyakitpisal P. Effect of simvastatin on the protein and mRNAs levels of enzyme matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in osteoblasts [Annual report]. Rachadapisek-Sompoj Endowment, Chulalongkorn University, 2001.
 31. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1712-9.

Effect of simvastatin on the proliferation and enzyme activity of MMP-2 and -9 in cancer cell lines HSC-4 and CCL-25

Risa Chaisuparat D.D.S.¹

Phakawan Musikapong B.Sc²

Pasutha Thunyakitpisal D.D.S., Ph.D³

¹ Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

² Oral Biology Research Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

³ Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective : To study the effect of simvastatin on the proliferation and enzyme activity of MMP-2 and -9 in HSC-4 and CCL-25 cancer cell lines

Materials and methods : Cells were treated with simvastatin in the serum-free media for 24 hours. The number of cells were measured by MTT technique. Enzyme activities in the conditioned media were measured by gelatin zymography. The data were analyzed by One way ANOVA ($\alpha < 0.05$).

Results : Simvastatin, at 15 and 20 μ M, significantly decreased the proliferation of HSC-4 and CCL-25 compared with the control group. Simvastatin, at 10 μ M, significantly decreased the MMP-9 activity in CCL-25. Simvastatin did not significantly effect the MMP-2 and MMP-9 activities in HSC-4.

Conclusion : In HSC-4 and CCL-25, the toxicity concentration of simvastatin is 15 and 20 μ M. Simvastatin, at 10 μ M, significantly suppressed MMP-9 activity in CCL-25.

(CU Cent J 2004;27:59-63)

Key words : *gelatin zymography; MMP-9; simvastatin; toxicity test*
