การติดตามผลของอินเตอร์ฟีรอนต่อเซลล์มะเร็งตับด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นางสาววารุณี ด่านสีทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2537

ISBN 974-631-053-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16884012

EFFECTS OF INTERFERON ON HEPATOMA CELL LINES OBSERVED BY ELECTRON MICROSCOPY

MISS WARUNEE DANSITHONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate school

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-053-4

Thesis Title EFFECTS OF INTERFERON ON HEPATOMA CELL LINES OBSERVED BY ELECTRON MICROSCOPY

By Miss Warunee Dansithong

Programme Biotechnology

Thesis Advisor Assistant Professor Kingkarn Laohathai, M.D., Ph.D

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan
..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

K. Laohathai
..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Kingkarn Laohathai, M.D., Ph.D.

Siripen Vethchagarun
..... Thesis co-advisor

(Siripen Vethchagarun, M.Sc.)

Vimolmas Lipipun
..... Member

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

..... Member

(Chitraporn Karnasuta, M.D., Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วารุณี ด่านสีทอง : การติดตามผลของอินเตอร์ฟีรอนต่อเซลล์มะเร็งตับ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (EFFECTS OF INTERFERON ON HEPATOMA CELL LINES OBSERVED BY ELECTRON MICROSCOPY) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.พญ.กิ่งกาญจน์ เลาหทัย. อ.ที่ปรึกษาร่วม : นางสาวศิริเพ็ญ เวชชการัณย์. 141 หน้า ISBN 974-631-053-4

การทำลายเซลล์มะเร็งตับของอินเตอร์ฟีรอน พิสูจน์ว่าอินเตอร์ฟีรอนชนิดแอลฟาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเซลล์มะเร็งตับ ชนิด S102 ได้จริง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ให้ยา ที่ความเข้มข้น 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 8 วัน อินเตอร์ฟีรอนชนิดแอลฟาสามารถทำลายเซลล์มะเร็งตับจนลดลงเหลือเพียงร้อยละ 3 เซลล์มะเร็งตับกลุ่มที่ดื้อต่ออินเตอร์ฟีรอนชนิดแอลฟาสามารถกลับมาเพิ่มจำนวนใหม่อย่างช้าๆ แต่อินเตอร์ฟีรอนยังสามารถกดการเจริญเติบโตของเซลล์ในกลุ่มนี้ต่อไปได้อย่างดี

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งตับในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ไมโตคอนเดรียเป็นออร์กาเนลล์ชนิดแรก ที่ได้รับอิทธิพลของอินเตอร์ฟีรอนชนิดแอลฟา ในเวลาเพียง 6 ชั่วโมง จำนวนเอ็นโดปลาสมิคเรตติคิวลัมชนิดไม่เรียบ และไรโบโซมอิสระเพิ่มขึ้นในเวลา 1 วันหลังจากได้รับอินเตอร์ฟีรอน อิเล็กตรอนทรานสลูเซนแกรนูลภายในไซโตพลาสมและ inclusion body-like particle ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบได้ในเวลาเดียวกัน จึงคาดว่าการเปลี่ยนแปลงทั้งสองนี้น่าจะเป็นลักษณะเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสพบว่า โครมาตินเกาะแบบ heterochromatin ซึ่งมีลักษณะคล้ายการเกิด apoptosis ในระยะแรก ต่อมาภายหลังนิวเคลียสนี้ได้บิดตัวเป็นแท่ง แบบที่เรียกว่า segmented nucleus

งานวิจัยนี้พิสูจน์ว่า อินเตอร์ฟีรอนชนิดแอลฟาสามารถทำลายเซลล์มะเร็งตับบางชนิดได้ในระดับที่น่าพอใจ (ร้อยละ 97) สำหรับกลุ่มเซลล์ที่ดื้อต่ออินเตอร์ฟีรอนชนิดแอลฟา (ร้อยละ 3) สามารถควบคุมได้ ถ้าให้อินเตอร์ฟีรอนอย่างต่อเนื่อง

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... 10 ธ.ค. 38

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C526644 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: HEPATOCELLULAR CARCINOMA/INTERFERON/IMMUNOELECTRON MICROSCOPY
WARUNEE DANSITHONG : EFFECTS OF INTERFERON ON HEPATOMA CELL LINES OBSERVED BY ELECTRON MICROSCOPY. THESIS ADVISOR : ASSIS. PROF. KINGKARN LAOHATHAI, M.D., Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : MISS SIRIPEN VETHCHAGARUN, M.Sc., 141 pp. ISBN 974-631-053-4

The antitumor effect of human lymphoblastiod interferon-α (IFN-α) was tested on three cultured human hepatoma cell lines, S102, R12 and HepG2. An IFN-α inhibited in a time- and dose-dependent manner to the proliferation of hepatoma cells, the most potent against S102 cells. The IFN-α at concentration 1,000 IU/ml showed cytocidal effect against S102 hepatoma cells with remaining only 3% viable cells on day eighth after the treatment. These IFN-α resisted cells recovered after the withdrawal of IFN-α, however, the growth of IFN-α resisted cell was also being inhibited by being continuously cultured in IFN-α medium for 20 days.

Morphological studies showed that IFN-α-mediated effects were associated with occurence of inclusion body-like particle which under the ultrastructural analysis appeared in form of hetergenous non-membrane bounded electron translucent structure and segmented nucleus. The mitochondria were the most sensitive organells, which swollen mitochondria were seen in both IFN-α sensitive and resisted cells. The RER and free ribosomes increased in number together with the accumulation of glycogen. Subsequently, nuclear changes consisted of segmented nucleus with scattered chromatin.

The results from this study suggested that IFN-α was effective to S102 hepatoma cells with continuous administration.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere and deepest gratitude to my advisor, Dr. Kingkarn Laohathai, for her valuable advice, encouragement and supervision throughout the course of my study and the preparation of this thesis. Grateful appreciation also goes to my co-advisor, Miss Siripen Vethchagarun, Scientific and Technological Reserch Equipment Centre, Chulalongkorn University for her valuable advice, help, knowledge and experience on electron microscopic technique.

I am grateful to Dr. Vimolmas Lipipun, Dr. Chitraporn Karnasuta, Dr. Sirirat Rengpipat for serving as my committee and for their valuble discussions and suggestions. Special thanks is also extended to Dr.Somporn Sawandison, Department of pathology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for her valuable advice in immunofluorescence technique.

I also wish to express my special thanks to Miss Duangkae Nontsri, Mrs. Songjun Poothong and also staff at Institue of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, whose names can not be fully listed for their helps and cheerfulness.

I would like to thank University Development Commissions (U.D.C.) Scholarship for financial support during my study.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my beloved father, mother for their infinite love, care and understanding throughout my life.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
ABSTRACT (THAI)		iv
ABSTRACT (ENGLISH)		v
CONTENTS		vii
LIST OF TABLES		viii
LIST OF FIGURES		ix
LIST OF ABBREVIATIONS		xi
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	BACKGROUND	8
	2.1 Hepatocellular carcinoma	8
	2.2 Interferons	25
III	MATERIALS AND METHODS	40
IV	RESULTS	58
V	DISCUSSION	102
VI	CONCLUSION	109
	REFERENCES	110
	APPENDIX	131
	AUTHOR BIBLIOGRAPHY	141

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	The common malignancy in Thai people.....	7
2	Age-adjusted incidence rates of liver cancer.....	11
3	Correlation between prevalence of primary liver cancer and HBsAg carrier rate.....	12
4	Histological types of HCC.....	16
5	Partial list of IFN-inducible protein.....	31
6	Activity of α-interferon against various malignancies in Phase II studies.....	39
7	Comparison the antitumor effect of IFN-α on three hepatoma cell lines.....	64
8	The fixative for preserving the surface antigen of hepatoma cell lines.....	68
9	The effect of IFN-α on S102 hepatoma cell in various incubation times of IFN treatment.....	73

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1	Schematic representation of human and murine IFN-ϑ receptor.....	29
2	Effect of IFN-α on the growth of S102.....	60
3	Effect of IFN-α on the growth of $HepG_2$.....	61
4	Effect of IFN-α on the growth of R_{12}	62
5	Effect of IFN-α on the growth of L929, fibroblast cell line.....	63
6	Effect of IFN-α on the viability of S102 hepatoma cell line.....	65
7	The efficacy in identifying the cell surface antigen.....	69
8	The cell multiplication patterns of various incubation times of IFN-α treatment.....	74
9-11	Electron micrograph of untreated S102 hepatoma cell.....	83-84
12	Electron micrograph of gold labelling of untreated S102 hepatoma cell.....	84
13-14	Electron micrograph of 6 hours IFN-α treated S102 hepatoma cell.....	85
15-18	Electron micrograph of 1 day IFN-α treated S102 hepatoma cell.....	86-87

FIGURE PAGE

19-24 Electron micrograph of 3 days IFN-α treated S102 hepatoma cell..... 88-90

25-26 Electron micrograph of gold labelling of 3 days IFN-α treated S102 cell..... 91

27-32 Electron micrograph of 4 days IFN-α treated S102 hepatoma cell..... 92-94

33-37 Electron micrograph of 8 days IFN-α treated S102 hepatoma cell..... 95-97

38-39 Electron micrograph of untreated HepG2 hepatoma cell..... 98

40-41 Electron micrograph of 3 days IFN-α treated HepG2 hepatoma cell..... 99

42-43 Electron micrograph of untreated L929 fibroblast cell..... 100

44-45 Electron micrograph of IFN-α treated L929 fibroblast cell..... 101

ABBREVIATION

Ab	=	antibody
Ag	=	antigen
BSA	=	bovine serum albumin
°C	=	degree celsius
cm	=	centrimeter
ELISA	=	ezyme-linked immunosorbent assay
EM	=	electron microscope
et al.	=	Et aliii
FCS	=	fetal calf serum
gm	=	gram
hr	=	hour
IU	=	international unit
L	=	liter
MAb	=	monoclonal antibody
ml	=	mililiter
mm	=	milimeter
mg	=	miligram
M	=	molarity
MW	=	molecular weight
µl	=	microliter
µg	=	microgram
ng	=	nanogram

nm	=	nanometer
no.	=	number
N	=	normality
/	=	per
%	=	percent (parts per 100); percentage
pH	=	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
rpm	=	revolution per minute
UV	=	ultraviolet light