



อภิธานนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการเตรียมแอนติเจนชนิดครบส่วนในการกระตุ้นเซลล์
เดนไดรติกเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

The development of whole tumor antigen for generation of
dendritic cell-based-cancer vaccine against cholangiocarcinoma

ผศ.ดร.อรัญญา จิระวิริยะกุล

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน... 28 กพ. 2565

เลขทะเบียน... 1049036

เลขเรียกหนังสือ... 2 PC

271

.C5

03888

2564

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2563

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้ที่เป็นแรงบันดาลใจในการทำงาน และเป็นพลังใจในยามที่เผชิญปัญหาและอุปสรรคทุกอย่าง

ขอขอบคุณกัลยาณมิตรที่ดีทุกท่านที่สนับสนุน เกื้อหนุนการทำงานด้วยความเป็นมิตรและจริงใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้มอบทุนวิจัย ทำให้มีโอกาสได้ทำงานวิจัยในสิ่งที่รักและสนใจ และนำมาซึ่งความก้าวหน้าทางวิชาการซึ่งจะนำไปพัฒนางานวิจัยและการเรียนการสอนต่อไป



ผศ.ดร.อรัญญา จิระวิริยะกุล

Executive Summary

โรคมะเร็ง (cancer) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศไทย และจำนวนผู้ป่วยมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอด 20 ปีที่ผ่านมา

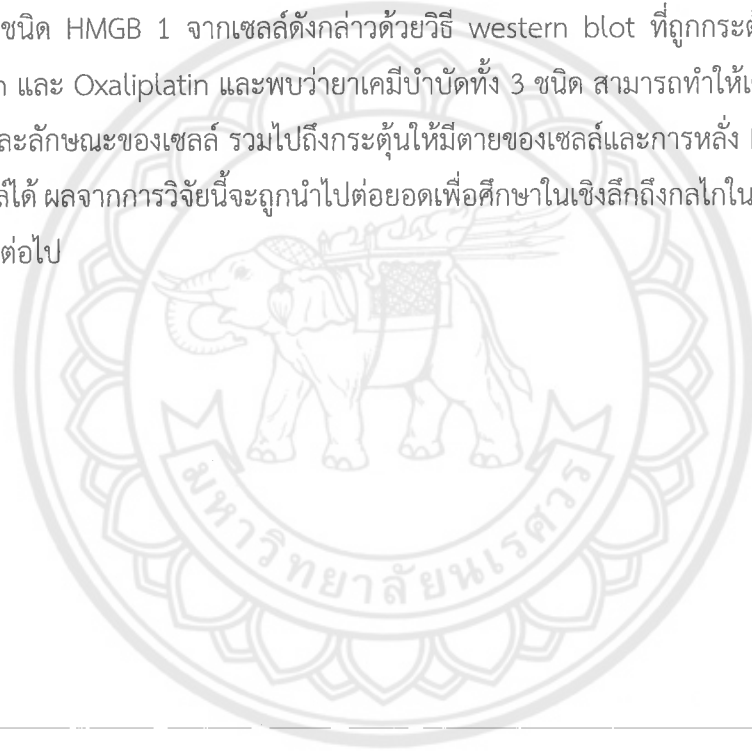
Damage-associated molecular patterns (DAMPs) เป็นสารชีวโมเลกุลที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์หรือพบได้ในเซลล์หลายชนิด เมื่อเซลล์นั้นได้รับความเครียด มีการบาดเจ็บ หรือการตาย เช่น การตายแบบ apoptosis จากผลของการได้รับรังสี จากการรักษาด้วยยา จากความเครียดของเซลล์หรือภาวะที่มีการติดเชื้อ ซึ่งจะถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นและสามารถแบ่งออกได้ตามตำแหน่งที่พบ DAMPs ภายในเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น HMGB1, HMGN1, Histone พบที่นิวเคลียส ATP, Calreticulin พบที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม Formyl peptides พบที่ไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ยังมี DAMPs อีกหลายชนิดที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ภายหลังได้รับการกระตุ้น เช่น ATP, Annexin A1, HMGB1 และการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า DAMPs ที่มีการแสดงออกนั้นมีบทบาทหลายประการ เช่น ควบคุมการสร้างและกำจัดโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ การขนส่งสารภายในเซลล์ และควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ โปรตีนเหล่านี้มักเกี่ยวข้องกับ การตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ และมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

วิธีการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันด้วยยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) การรักษาด้วยฮอร์โมน (Hormonal therapy) รังสีรักษา (Radiation therapy) และการผ่าตัด (Surgical exision) ล้วนสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งได้เป็น 3 แบบคือแบบ apoptosis, necrosis และ autophagy ซึ่งหลังการตายดังกล่าวจะทำให้เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ DAMPs ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าโมเลกุลดังกล่าวทำหน้าที่เป็น immunogenic cell death ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันเช่น เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cells) เซลล์ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte cells) และเซลล์เอ็นเค (NK cells) ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นการกำจัดทำลายเซลล์มะเร็งในที่สุด

ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ต้องการเตรียมแอนติเจนครบส่วนที่มีการแสดงออกของโมเลกุล DAMPs ด้วยยาเคมีบำบัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและกำจัดทำลายเซลล์มะเร็งของเซลล์เดนไดรติก ที่มีการกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดครบส่วนดังกล่าว ซึ่งงานวิจัยนี้จะทำให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่จะนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาการรักษามะเร็งด้วยเซลล์บำบัดหรือภูมิคุ้มกันบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งชาวไทย

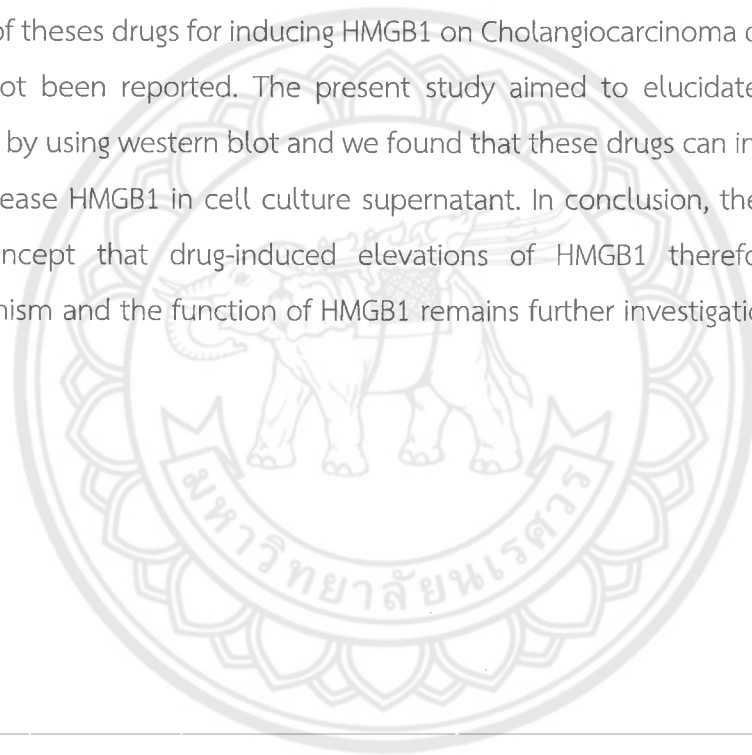
บทคัดย่อ

Damage associated molecular patterns (DAMPs) เป็นโมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์เมื่อมีสภาวะปกติ และจะถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บหรือมีการตายจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือการได้รับยาเคมีบำบัด จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า Gemcitabine Cisplatin และ Oxaliplatin สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด และทำให้เกิดการหลั่ง HMGB1 ซึ่งมีบทบาททั้งส่งเสริมและยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับยาเคมีบำบัดเหล่านี้ต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายและการแสดงออกของ HMGB1 จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ตรวจหาการแสดงออกของ DAMPs ชนิด HMGB 1 จากเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธี western blot ที่ถูกกระตุ้นจาก Gemcitabine Cisplatin และ Oxaliplatin และพบว่ายาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิด สามารถทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และลักษณะของเซลล์ รวมไปถึงกระตุ้นให้มิตายของเซลล์และการหลั่ง HMGB 1 ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ ผลจากการวิจัยนี้จะถูกนำไปต่อยอดเพื่อศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกในการเกิดและหน้าที่ของ HMGB1 ต่อไป



Abstract

Damage associated molecular patterns (DAMPs) are endogenous molecule that are released by cell damage or cell death caused by activating cell, immune response and chemotherapeutic drugs. Previous studies found that chemotherapeutic drugs, such as Gemcitabine Cisplatin and Oxaliplatin can cause cell death and release HMGB1 from many types of cancer. It has also been shown that the same HMGB1 could play a benefit role in anti-cancer therapy and on the other hand they could contribute to progression of cancer and promote resistance to anti-cancer treatment. However, the effect of theses drugs for inducing HMGB1 on Cholangiocarcinoma cell line (KKU-213L5) have not been reported. The present study aimed to elucidate the expression of HMGB1 by using western blot and we found that these drugs can induce cell apoptosis and release HMGB1 in cell culture supernatant. In conclusion, these findings support the concept that drug-induced elevations of HMGB1 therefore the underlying mechanism and the function of HMGB1 remains further investigation.



สารบัญ

บทที่	หน้า
บทที่ 1 บทคัดย่อ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	2
บทที่ 2 ที่มาและความสำคัญ.....	3
2.1 มะเร็งท่อน้ำดี.....	3
2.2 การรักษาโรคมะเร็ง.....	5
2.2.1 การรักษาด้วยการผ่าตัด (Surgery).....	5
2.2.1.1 การผ่าตัดแบบเปิด (Open surgery).....	5
2.2.1.2 การผ่าตัดส่องกล้อง (Minimally Invasive Surgery).....	5
2.2.2 รังสีรักษา (Radiation therapy).....	5
2.2.2.1 การรักษาด้วยรังสีจากภายนอก (External Beam Radiation Therapy).....	6
2.2.3 ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy).....	6
2.2.3.1 ยาเจมไซตาบีน (Gemcitabine).....	6
2.2.3.2 ยาซิสพลาติน (Cisplatin).....	7
2.2.3.3 ยาออกซาลิแพลทิน (Oxaliplatin).....	7
2.2.4 ภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy).....	8
2.2.4.1 ยับยั้งการทำงานที่อิมมูนเช็คพอยต์ (Immune checkpoint inhibitors).....	8
2.2.4.2 การรักษาด้วยการถ่ายโอนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (T-cell transfer therapy).....	8
2.2.4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies).....	9
2.2.4.4 วัคซีนโรคมะเร็ง (Cancer vaccines).....	9
2.2.4.5 สารปรับปรุงภูมิคุ้มกัน (Immunomodulators).....	9
2.2.5 การรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (Targeted therapy).....	9
2.2.5.1 ยาที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (Small molecule drugs).....	9
2.2.5.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies).....	9

บทที่	หน้า
2.2.6 การรักษาด้วยวิธีฮอร์โมน (Hormone Therapy).....	9
2.2.7 การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cell Transplants).....	10
2.2.8 การแพทย์แม่นยำ (Precision medicine).....	10
2.2.9 การตรวจตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biological marker หรือ Biomarker).....	10
2.3 Damage-associated molecular patterns DAMPs	10
2.4 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์	13
2.5 วิธีการตรวจสอบการแสดงออกและปริมาณของ DAMPs	13
2.6 บทบาทของ DAMPs ต่อการเกิดมะเร็ง	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	18
3.1 รูปแบบวิธีวิจัย.....	18
3.2 เครื่องมือในการวิจัย	18
3.2.1 ครุภัณฑ์.....	18
3.2.2 อุปกรณ์.....	19
3.2.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ น้ำยาและสารเคมี.....	20
3.3 วิธีการดำเนินงาน	21
3.3.1 วิธีการทดสอบ.....	22
3.3.1.1 การละลายเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี.....	22
3.3.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี.....	22
3.3.1.3 การนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	22
3.3.1.4 การหาค่า IC ₅₀ ด้วยวิธี MTT assay.....	23
3.3.1.5 การกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดตาม ความเข้มข้นของค่า inhibition concentration (IC) ที่เหมาะสม และหาความเข้มข้น โปรตีนด้วยวิธี Bradford assay	24
3.3.1.6 การตรวจการแสดงออกของ DAMPs ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีภายหลัง การกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดด้วยวิธี Western blot.....	24
3.3.1.7 การกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดหลาย ชนิด	25

บทที่	หน้า
3.3.1.8 การควบคุมคุณภาพ.....	25
3.3.1.9 สถิติที่ใช้ทดสอบ	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5	26
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์มะเร็งด้วยหลักการ MTT assay.....	27
4.3 ผลของการกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin	29
4.4 ผลของการวัดความเข้มข้นโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ที่กระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ด้วยวิธี Bradford assay	31
4.5 ผลการตรวจการแสดงออกของ DAMPs (HMGB1) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ภายหลังจากการกระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ด้วยวิธีwestern blot จากการตรวจสอบการแสดงออกของ HMGB1 เมื่อกระตุ้นให้เกิดการตายในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ด้วยวิธี western blot พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ HMGB1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa ใน cell supernatant ของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับยาเคมีชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ที่ความเข้มข้น 250,000, 170 และ 640 μ M ตามลำดับ และยังพบการแสดงออกของ HMGB1 ใน cell supernatant เซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ DMSO 3.53%	32
บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	33
บทที่ 6 สรุปผลวิจัย	36
เอกสารอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก	45

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตาราง 1 ความเข้มข้นของยา Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ที่กระตุ้นให้เซลล์ มะเร็งชนิดต่างๆหลั่ง DAMPs ชนิดHMGB1.....	17
ตาราง 2 ตัวอย่างตารางผลการทดลอง.....	23
ตาราง 3 ค่า IC25 IC50 และ IC75 ของยาเคมีบำบัด Gemcitabine Cisplatin และOxaliplatin..	28



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพ 1 ประเภทของมะเร็งท่อน้ำดี.....	4
ภาพ 2 DAMPs ถูกหลั่งออกมาเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์.....	11
ภาพ 3 บทบาทของ HMGB1.....	12
ภาพ 4 แผนภูมิวิธีการดำเนินงาน.....	21
ภาพ 5 แสดงบริเวณ counting chamber ในการใช้นับจำนวนเซลล์.....	22
ภาพ 6 แสดงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า.....	26
ภาพ 7 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-213L5 เทียบกับความเข้มข้น ของยาเคมีบำบัด Gemcitabine.....	27
ภาพ 8 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-213L5 เทียบกับความเข้มข้น ของยาเคมีบำบัด Cisplatin.....	28
ภาพ 9 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-213L5 เทียบกับความเข้มข้น ของยาเคมีบำบัด Oxaliplatin.....	28
ภาพ 10 แสดงผลของการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 (ภาพ 10A- 10C) เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine ความเข้มข้นที่ IC ₅₀ คือ 250,000 μ M และยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin และ Oxaliplatin ความเข้มข้นที่ IC ₇₅ คือ 170 และ 640 μ M ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า.....	30
ภาพ 11 แสดงผลของการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 (ภาพ 11A-11B) ด้วย DMSO และ DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า.....	30
ภาพ 12 แสดงกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 1,200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 และ 0 μ g/ml.....	31
ภาพ 13 แสดงผลการตรวจการแสดงออกของโปรตีน HMGB1 (น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa) ใน cell supernatant ด้วยวิธี Western blot ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-213L5) ที่เลี้ยง ร่วมกับยาเคมีบำบัด Gemcitabine (Gem), Cisplatin (Cis) และ Oxaliplatin (Oxa) ที่ความเข้มข้น 250,000, 170 และ 640 μ M ตามลำดับ ส่วนที่เป็น control เซลล์จะเลี้ยง ร่วมกับ DMEM (C.M.) และ DMSO (C.D.)	32

สัญลักษณ์และคำย่อ

ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CCA	Cholangiocarcinoma
CRT	Calreticulin
DAMPs	Damage associated molecular patterns
dCCA	Distal cholangiocarcinoma
dCK	Deoxycytidine kinase
dFdC	2',2'-difluoro-2-deoxycytidine
dFdCDP	2',2'-difluoro-2-deoxycytidine diphosphate
dFdCTP	2',2'-difluoro-2-deoxycytidine triphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleotide
ER	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal bovine serum
FPR	Formyl peptide receptor
HMGB1	High mobility group box 1
hNTs	Human nucleoside transporters
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IC ₇₅	75% inhibitory concentration
iCCA	Intrahepatic cholangiocarcinoma
pCCA	Perihilar cholangiocarcinoma
PCR	Polymerase chain reaction
PRRs	Pattern recognition receptors
PSC	Primary sclerosing cholangitis
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RNA	Ribonucleotides
RT-PCR	Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction

SDS	Sodium dodecyl sulfate
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TBS	Tris buffer saline
TBST	Tris buffer saline Tween 20
TLRs	Toll-like receptors



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) เกิดจากความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี เป็นมะเร็งที่พบได้ร้อยละ 3-5 ในทางเดินอาหาร (2) และพบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในแถบทวีปเอเชีย (3) และในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งสาเหตุที่สำคัญเกิดจากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis* การติดพยาธินี้เกิดจากความนิยมในการบริโภค ปลาน้ำจืดที่ไม่ปรุงสุก ซึ่งเป็นที่อยู่ที่อยู่ (host) ของพยาธิในระยะ Metacercariae พยาธิในระยะนี้เมื่อออกจาก cyst จะสามารถซ่อนไขผนังลำไส้เล็กส่วน duodenum ของมนุษย์เข้าไปเจริญเป็นตัวเต็มวัย และวางไข่ในระบบทางเดินน้ำดีทำให้เกิดการอักเสบและอุดตันในทางเดินน้ำดีจนเยื่อบุผนังภายใน พัฒนาเป็นมะเร็ง (4) ซึ่งแนวโน้มของโรคมะเร็งนี้มีอัตราการเพิ่มขึ้นในทุกๆปี การรักษามะเร็งท่อน้ำดี ที่เกิดภายในตับที่ให้ผลการรักษาที่ดีที่สุด คือ การผ่าตัดในระยะเริ่มต้นของโรคมะเร็งซึ่งมีอัตราการรอด ในช่วง 5 ปี ประมาณร้อยละ 22 – 44 แต่ส่วนใหญ่ผู้ป่วยมักได้รับการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะ แพร่กระจาย (metastasis) ซึ่งไม่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัดจึงต้องรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) ทำให้มีอัตราการรอดในช่วง 5 ปี ลดลง (5) และยาเคมีบำบัดที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin (6) นอกจากนี้มีการใช้ยาาร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ในการรักษา ได้แก่ Gemcitabine ร่วมกับ Cisplatin (7) ซึ่งยา Gemcitabine มีกลไกในการทำให้ เซลล์มะเร็งตายโดยการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ที่ทำหน้าที่ ในการต่อสายดีเอ็นเอ (deoxyribonucleotide, DNA) และนอกจากนี้ยังไปยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนไรโบนิวคลีโอ ไทด์ (ribonucleotides, RNA) ให้กลายเป็น DNA (8) ส่วนยา Cisplatin และ Oxaliplatin มีกลไก ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกันโดยใช้ส่วนของแพลทินัม (platinum) ไปจับกับ DNA ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการเชื่อมต่อภายในสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติไป (intrastrand DNA cross-link) และรบกวนการสร้างสายดีเอ็นเอ (9, 10) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการตายของเซลล์มะเร็งที่ เกิดจากการได้รับยาเคมีบำบัดแบ่งออกเป็น 5 แบบ ได้แก่ apoptosis, necrosis, autophagy, senescence และ mitotic catastrophe (11) และรูปแบบการตายจะมีความสัมพันธ์กับยาที่ใช้ใน การรักษา เช่น ยา Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin จะทำให้เซลล์มะเร็งดับอ่อน มะเร็ง ปอด และมะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดการตายแบบ apoptosis ตามลำดับ (12-14)

Damage associated molecular patterns (DAMPs) เป็นโมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์เมื่อมีสภาวะปกติ และจะหลั่งออกมาเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บหรือมีการตายของเซลล์จากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือการได้รับยาเคมีบำบัด โดยทั่วไปแล้ว DAMPs มีหลายชนิดและถูกสร้างจากบริเวณต่างๆภายในเซลล์ เช่น ในนิวเคลียสมี HMGB1, histones ในไมโทคอนเดรียมี ATP, DNA, Formyl peptides ใน endoplasmic reticulum (ER) มี ATP, Calreticulin และไนไซโตพลาสซึมมี ATP, F-Actin (15) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า DAMPs เหล่านี้สามารถไปส่งเสริมการแพร่กระจายของมะเร็งได้โดยกระตุ้นผ่านทาง specific pattern recognition receptors (PRRs) ของเซลล์ภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะส่งผลให้เกิด immunosuppression , angiogenesis, proliferation และ inflammation ทำให้มีการพัฒนาและแพร่กระจายของมะเร็ง (16) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดและปริมาณของยาเคมีบำบัดที่แตกต่างกันส่งผลถึงการแสดงออกของ DAMPs และอาจส่งผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยด้วย (17-19)

ดังนั้นการศึกษาถึงผลของยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อการแสดงออกของ DAMPs จึงเป็นสิ่งท้าทายและน่าสนใจซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการเลือกใช้ยาและพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

ศึกษาปริมาณและการแสดงออกของ DAMPs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บและตายด้วยยาเคมีบำบัด

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ตรวจสอบการแสดงออกและปริมาณของ DAMPs ชนิด High mobility group box 1 (HMGB1) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ชนิด KKU-213L5 หลังจากกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บและตายด้วยยาเคมีบำบัด 3 ชนิด ได้แก่ Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin รวมถึงการใช้ยาเคมีบำบัดร่วมกัน ด้วยวิธี western blot

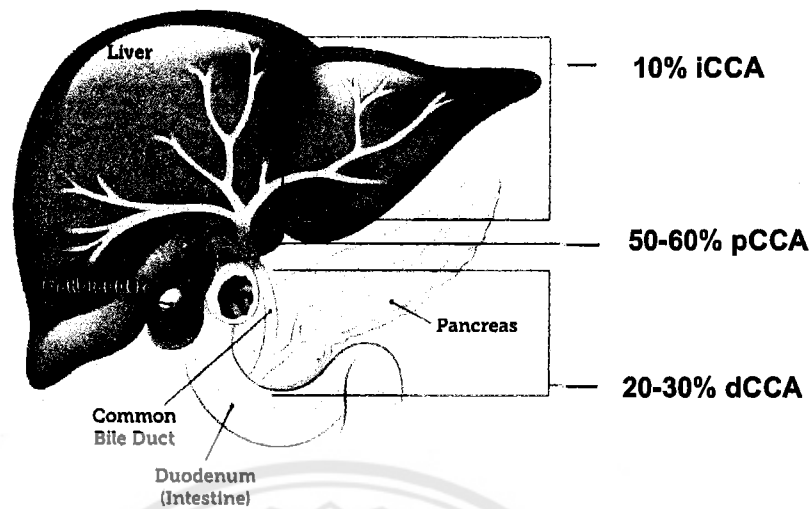
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 มะเร็งท่อน้ำดี

Cholangiocarcinoma (CCA) หรือ มะเร็งท่อน้ำดี เป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงเกิดจากความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี (20) บริเวณท่อน้ำดีซึ่งเป็นท่อที่มีความยาว 4-5 นิ้ว ทำหน้าที่ในการระบายของเสียซึ่งก็คือ น้ำดีจากตับไปสู่ลำไส้เล็กตอนต้น (duodenum) ท่อน้ำดีประกอบด้วย ถุงน้ำดี (gallbladder) และท่อน้ำดีเล็ก (ductules) จำนวนมาก แต่ละส่วนจะเรียกแตกต่างกัน โดยมีชื่อเรียกรวมกันว่า “ระบบทางเดินน้ำดี” (biliary system) ซึ่งเริ่มจากท่อน้ำดีจำนวนมากที่เก็บน้ำดีจากเซลล์ตับ ท่อเล็กๆเหล่านั้นจะรวมกันเป็นท่อขนาดใหญ่ กลายเป็นท่อน้ำดีที่ออกมาจากทางด้านซ้ายและด้านขวา ท่อน้ำดีที่อยู่ภายในตับเรียกว่า intrahepatic bile duct ซึ่งเป็นท่อที่มีส่วนที่อยู่ภายในตับ และเชื่อมต่อกับท่อน้ำดีใหญ่ที่ตับ (common hepatic duct) บริเวณท่อน้ำดีที่ออกจากตับ (hilum) ส่วนท่อน้ำดีรวม (common bile duct) คือ บริเวณถุงน้ำดีเชื่อมต่อกับท่อขนาดเล็กที่เรียกว่า cystic duct และอยู่ห่างออกไปประมาณหนึ่งในสามตามความยาวของท่อน้ำดี โดยท่อนี้จะเชื่อมกับลำไส้เล็กส่วนต้น (21)

นอกจากนี้มะเร็งท่อน้ำดียังเป็นมะเร็งที่พบได้ประมาณ 3-5% ของมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยขึ้นอยู่กับบริเวณที่เกิดมะเร็ง ได้แก่

- 1) Intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA) มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับเกิดขึ้นที่บริเวณแขนงท่อน้ำดีขนาดเล็กที่อยู่ภายในตับ บางครั้งอาจทำให้เกิดความสับสนว่าเป็นมะเร็งตับ
- 2) Perihilar cholangiocarcinoma (pCCA) มะเร็งท่อน้ำดีบริเวณท่อน้ำดีที่ออกจากตับเกิดขึ้นที่ภายนอกตับในบริเวณท่อน้ำดีด้านซ้ายและด้านขวามารวมที่ด้านนอกของตับ
- 3) Distal cholangiocarcinoma (dCCA) มะเร็งท่อน้ำดีส่วนปลาย เกิดขึ้นที่ ท่อน้ำดีภายนอกตับในบริเวณส่วนปลายของท่อน้ำดีที่เชื่อมกับลำไส้เล็กส่วนต้น (10-15) มะเร็งชนิด pCCA พบประมาณ 50-60% ของมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมดซึ่งถือว่ามะเร็งชนิดนี้พบมากที่สุด รองลงมาคือมะเร็งชนิด dCCA พบประมาณ 20-30% และพบน้อยที่สุดคือ มะเร็งชนิด iCCA พบประมาณ 10% (22)



ภาพ 1 ประเภทของมะเร็งท่อน้ำดี (19)

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีจากทั่วโลกที่มีอุบัติการณ์ และการเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้น เช่น ในประเทศอังกฤษจำนวนผู้เสียชีวิตจากมะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มสูงขึ้นจาก 1,720 ราย ในปี 2010 เพิ่มขึ้นเป็น 2,161 ราย ในปี 2013 (23) คล้ายกับกรณีที่พบที่สหรัฐอเมริกาพบอัตราของโรค iCCA เพิ่มขึ้นถึง 165% ในระยะเวลา 30 ปี จากปี 1970-1990 ซึ่งผู้ป่วยเพิ่มมาจาก 0.32 คน เป็น 0.85 คนต่อประชากร 100,000 คน (24) ความชุกของโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่พบในประเทศพัฒนาแล้วแถบตะวันตกอาจพบได้บ้าง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรค Primary sclerosing cholangitis (PSC) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบของระบบทางเดินน้ำดีทำให้เกิดพังผืด ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของคนในแถบตะวันตกที่จะทำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีตามมาได้ แต่ก็ยังเป็นเพียงแค่ 10% ของอุบัติการณ์ที่เกิดที่บ่งชี้ว่าโรค PSC เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เสี่ยงต่อโรคมะเร็งท่อน้ำดีจากอีกหลายปัจจัย และอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการรายงานมากที่สุดพบในแถบภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 85 คนต่อประชากร 100,000 คน (25) และสาเหตุสำคัญคือ พยาธิใบไม้ตับ ที่พบเฉพาะประเทศที่แม่น้ำโขงไหลผ่าน จะไหลมาจากมณฑลยูนนาน ประเทศจีนมาจนถึงทางตอนใต้ของประเทศเวียดนาม (26) พยาธิใบไม้ตับที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่คือชนิด *Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis* ที่พบในแหล่งน้ำของหมู่บ้านแถบลุ่มแม่น้ำโขงและ 90%-95% พบพยาธิชนิดนี้ในปลาตะเพียน ปลาที่ถูกรับได้จะนำมารับประทานแบบดิบซึ่งเป็นวัฒนธรรมท้องถิ่นที่สืบทอดกันมายาวนาน (27) “ก้อยปลา และ ปลาส้ม” ถือเป็นอาหารประจำถิ่นของคนที่ย้ายอยู่ตลอดแนวยาวของแม่น้ำกว่า 4,350 กิโลเมตร การตกปลาเป็นแหล่งอาหารหลักและเป็นวิถีชีวิตของ

คนเหล่านั้น ด้วยปลาที่มีราคาถูกและเป็นแหล่งโปรตีนชั้นเยี่ยมของผู้ที่อาศัยอยู่แถบแม่น้ำโขงกว่า ล้านคน (28) และประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นเป็นผู้ที่มีฐานะยากจนรายได้เฉลี่ยต่อวันคือน้อยกว่า 1 ดอลลาร์ (29) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับนำไปสู่การเสียชีวิตจากโรคมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีทำให้จำนวนของผู้เสียชีวิตรวมทั้งเพศชายและเพศหญิงสูงถึง 28,000 คนต่อปี จำนวนผู้เสียชีวิตที่สูงที่สุดของมะเร็งตับที่พบร้อยละ 70 เป็นอุบัติเหตุที่เกิดขึ้นใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (30)

2.2 การรักษาโรคมะเร็ง

2.2.1 การรักษาด้วยการผ่าตัด (Surgery)

เป็นวิธีการรักษาโดยการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งออก ซึ่งหลังจากการผ่าตัดจะทำให้มีอาการเจ็บและต้องใช้เวลาในการรักษาแผลที่เกิดขึ้น ซึ่งการผ่าตัดสามารถแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ การผ่าตัดแบบเปิด (Open surgery) และการผ่าตัดส่องกล้อง (Minimally Invasive Surgery)

2.2.1.1 การผ่าตัดแบบเปิด (Open surgery)

เป็นการผ่าตัดโดยเปิดแผลให้มีขนาดใหญ่เพื่อที่จะผ่าตัดเอาเนื้อมะเร็งออกมา ซึ่งวิธีนี้จะมีส่วนของเนื้อเยื่อปกติและบางส่วนของต่อมน้ำเหลืองออกมามีด้วย

2.2.1.2 การผ่าตัดส่องกล้อง (Minimally Invasive Surgery)

เป็นเทคโนโลยีในการผ่าตัดโดยการสอดท่อที่มีกล้อง (laparoscopy) เข้าไปในแผลที่เปิดไว้เพียงเล็กน้อยซึ่งท่อนี้จะช่วยให้มองเห็นภาพข้างในและใช้อุปกรณ์เฉพาะสอดเข้าไปตัดก้อนมะเร็งออกมา วิธีนี้จะทำให้เกิดแผลที่มีขนาดเล็กและใช้เวลาในการรักษาน้อยลง (31)

2.2.2 รังสีรักษา (Radiation therapy)

เป็นการรักษาด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรืออนุภาคซึ่งเป็นรังสี ในการรักษาโรคมะเร็งและเนื้องอกจะมีปริมาณของรังสีที่ต่างกัน โดยถ้าเป็นการรักษาโรคมะเร็งจะใช้รังสีที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งหรือชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง แต่เนื้องอกจะใช้รังสีที่มีความเข้มข้นต่ำเพื่อให้เนื้องอกมีขนาดที่เล็กลง ซึ่งรังสีรักษาแบ่งได้ออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ การรักษาด้วยรังสีจากภายนอก (external beam radiation therapy) และรังสีรักษาระยะใกล้ (brachytherapy)

2.2.2.1 การรักษาด้วยรังสีจากภายนอก (External Beam Radiation Therapy)

เป็นการรักษาโรคมะเร็งด้วยการใช้เครื่องเป็นตัวฉายรังสีทำให้แหล่งกำเนิดของรังสีอยู่ห่างจากตัวและสามารถฉายรังสีเฉพาะบริเวณที่เป็นมะเร็งทำให้เนื้อเยื่อปกติที่อยู่ใกล้เคียงได้รับผลการทบน้อย

2.2.2.2 รังสีรักษาระยะใกล้ (Brachytherapy)

คือการใช้สารกัมมันตรังสีใส่เข้าไปภายในตัวผู้ป่วยโดยใส่หรือฝังแร่เข้าไปบริเวณที่ใกล้กับก้อนมะเร็งและเป็นการรักษาเฉพาะส่วนของร่างกายเท่านั้น นิยมใช้ในการรักษามะเร็งบริเวณเต้านมและต่อมลูกหมาก (31)

2.2.3 ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy)

เป็นการรับประทานยาที่มีฤทธิ์ทำลายหรือหยุดยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์แบ่งตัวไม่ได้และตายลงหรือขนาดเล็กลงจนสามารถผ่าตัดออกภายหลังได้ บางครั้งยาเหล่านี้จะมีผลกับเซลล์ปกติของร่างกายทำให้ถูกทำลาย (31) ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีก็มีการนำยาเคมีบำบัดมาใช้ เช่น เจมไซตาบีน (Gemcitabine), ซิสพลาติน (Cisplatin) และออกซาลิพาทิน (Oxaliplatin) (6)

2.2.3.1 ยาเจมไซตาบีน (Gemcitabine)

เป็นยาในกลุ่มที่โครงสร้างทางเคมีคล้ายดีออกซีไซทิดีน (deoxycytidine analog)

1. การดูดซึมยา

ยา Gemcitabine จะถูกนำเข้ามาในเซลล์ผ่านทางโปรตีนบนผิวที่เรียกว่า human nucleoside transporters (hNTs) และถูกเปลี่ยนให้เป็น 2',2'-difluoro-2-deoxycytidine (dFdC) ซึ่งเป็นยา Gemcitabine ในรูปที่พร้อมทำงาน จากนั้นจะถูกเติมหมู่ฟอสฟอริลทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้ เอนไซม์ deoxycytidine kinase (dCK) เอนไซม์ pyrimidine nucleoside monophosphate kinase (UMP-CMP kinase) และ เอนไซม์ nucleoside diphosphate kinase A monophosphate (dFdCMP) ตามลำดับ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจาก 2',2'-difluoro-2-deoxycytidine(dFdC) กลายเป็น triphosphate (dFdCTP) และเป็นสารที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง (8)

2. กลไกการทำงาน

ยา Gemcitabine อยู่ในรูปของ dFdCTP จะมีหน้าที่ไปยับยั้งการสร้าง deoxyribonucleic acid (DNA) โดย dFdCTP จะเข้าไปจับตรงสาย DNA ส่วนที่ปลายทำให้ nucleotide หดเข้าไปหากัน เพื่อป้องกันการต่อ ribonucleic acid (RNA) ให้ยาวขึ้น และยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase เรียกขั้นตอนนี้ว่า mask chain termination และนอกจากนี้ diphosphate (dFdCDP) สามารถยับยั้งการสร้าง DNA ได้ทางอ้อมโดยการยับยั้งเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน RNA ไปเป็น DNA ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างและซ่อมแซม ส่งผลมีเซลล์มะเร็งตาย (8)

2.2.3.2 ยาซิสพลาติน (Cisplatin)

เป็นยารักษาโรคมะเร็งที่อยู่ในกลุ่ม platinum analogs ซึ่งมีส่วนประกอบของแพลทินัม (platinum)

1. การดูดซึมยา

ยา Cisplatin จะเข้าเซลล์โดยผ่านพอสโพลีปิดที่มี 2 ชั้น เพื่อเข้าไปในเซลล์เป้าหมายด้วยการแพร่แบบไม่ใช้พลังงานซึ่งเป็นกระบวนการที่ขึ้นอยู่กับความชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำของโมเลกุล โดยจะแพร่จากที่มีความเข้มข้นสูงไปที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือผ่านตัวขนส่งไอออนของสารอินทรีย์ เช่น copper transporters (CTP1) (32)

2. กลไกการทำงาน

เมื่อยา Cisplatin เข้าสู่เซลล์ส่วนของคลอไรด์ (chloride) จะถูกแทนที่ด้วยโมเลกุลของน้ำ ทำให้มีคุณสมบัติเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ นิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) เช่น sulfhydryl groups ที่อยู่บนโปรตีน ซึ่งยา Cisplatin จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับจับไนโตรเจน (N7) ของพิวรีน (purine) ในส่วน DNA ทำให้มีการทำลาย DNA ที่อยู่ในเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เป็นผลให้เซลล์มะเร็งตาย (9)

2.2.3.3 ยาออกซาลิแพลทิน (Oxaliplatin)

เป็นยารักษาโรคมะเร็งที่อยู่ในกลุ่ม platinum analogs ที่มีส่วนประกอบของ แพลทินัม (platinum) เหมือนยา Cisplatin แต่มีความแตกต่างตรงที่ amine group ของยา Cisplatin จะถูกแทนที่ด้วย diaminocyclohexane (dach) (33)

1. การดูดซึมยา

ยาจะเข้าเซลล์โดยผ่าน Phospholipid bilayer เข้าไปในเซลล์เป้าหมายผ่านทางตัวขนส่งไอออนของสารอินทรีย์ เช่น copper transporters (CTR1) และ organic cation transporters 1-2 (OCT1-2) (34)

2. กลไกการทำงานของยา

ออกฤทธิ์โดยแพลทินัมไปเข้าไปทำปฏิกิริยากับไนโตรเจน (N7) ของกวานีน (guanine) ในส่วนของ DNA ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการเชื่อมต่อภายในสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติไป (intrastrand DNA cross-link) ทำให้มีการทำลาย DNA ที่อยู่ในเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งการสร้าง mRNA เป็นผลให้เซลล์มะเร็งตาย

2.2.4 ภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy)

เป็นวิธีการรักษาโรคมะเร็งโดยอาศัยหลักการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้สารที่ทำมาจากสิ่งมีชีวิตและสารที่ได้นี้จะส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้พร้อมต่อต้านเซลล์มะเร็งได้ดีมากขึ้น ซึ่งภูมิคุ้มกันบำบัดแบ่งออกได้เป็น 5 วิธี ได้แก่

2.2.4.1 ยับยั้งการทำงานที่อิมมูนเช็คพอยต์ (Immune checkpoint inhibitors)

โดยการให้ยาไปยับยั้งระบบควบคุมและสั่งการที่อยู่บนเซลล์ภูมิคุ้มกันทำให้เซลล์ตอบสนองอย่างรุนแรงต่อเนื้องอกและถ้าเซลล์ภูมิคุ้มกันในร่างกายถูกยับยั้งจะให้มีการตอบสนองอย่างรุนแรงต่อเซลล์มะเร็ง (31)

2.2.4.2 การรักษาด้วยการถ่ายโอนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (T-cell transfer therapy)

เป็นการรักษาโดยการเพิ่มความสามารถตามธรรมชาติของ T lymphocyte cell ที่อยู่ในร่างกายในการตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น โดยสกัดเซลล์ภูมิคุ้มกันออกมาจากก้อนมะเร็ง จากนั้นทำการเลือกเซลล์ภูมิคุ้มกันหรือปรับปรุงเซลล์ภูมิคุ้มกันในห้องปฏิบัติการให้มีการตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งของตนเองได้ดีขึ้นจึงนำเซลล์ภูมิคุ้มกันกลับไปในร่างกายผ่านหลอดเลือดดำ (31)

2.2.4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

เป็นการออกแบบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งที่เป็นเป้าหมายโดยโมโนโคลนแอนติบอดีนี้จะไปจับอยู่บนผิวของเซลล์มะเร็งและจะกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันเข้ามาจับและทำลายเซลล์มะเร็ง (31)

2.2.4.4 วัคซีนโรคมะเร็ง (Cancer vaccines)

เป็นการเพิ่มความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีมากขึ้น (31)

2.2.4.5 สารปรับปรุงภูมิคุ้มกัน (Immunomodulators)

เป็นสารที่จะกระตุ้นให้ภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น ซึ่งสารนี้เป็นได้ทั้งสารชีวภาพและไม่ใช่สารชีวภาพ (31)

2.2.5 การรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (Targeted therapy)

เป็นการรักษามะเร็งแบบหนึ่งที่ยกย่องเป็นพิเศษว่าจำเพาะกับมะเร็งนั้นๆ โดยการใช้ยาหรือสารไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการเจริญเติบโต การแบ่งตัว และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งการรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ยาที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (small molecule drugs) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies)

2.2.5.1 ยาที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (Small molecule drugs)

เป็นสารที่มีขนาดเล็กและสามารถเข้าไปจับกับเป้าหมายที่อยู่ในเซลล์ได้

2.2.5.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

เป็นโปรตีนที่สร้างจากในห้องปฏิบัติการ และถูกออกแบบให้เกาะกับเป้าหมายที่จำเพาะบนเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางชนิดจะไปจับอยู่บนผิวของเซลล์มะเร็งและจะกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันเข้ามาจับและทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น (31)

2.2.6 การรักษาด้วยวิธีฮอร์โมน (Hormone Therapy)

เป็นการรักษาโดยการลดระดับของฮอร์โมนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหรือใช้ยาที่เข้าไปขัดขวางการส่งสัญญาณของฮอร์โมนในเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตหรือช้าลง ซึ่งวิธีการนี้ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม (31)

2.2.7 การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cell Transplants)

เป็นวิธีการฟื้นฟูเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระบบเลือดหรือผู้ที่ได้รับยาเคมีบำบัดหรือรังสีบำบัดปริมาณสูงในผู้ป่วยมะเร็งบางชนิด ซึ่งการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากตนเอง (autologous), เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากผู้อื่น (allogeneic), และเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากฝาแฝด (syngeneic) (31)

2.2.8 การแพทย์แม่นยำ (Precision medicine)

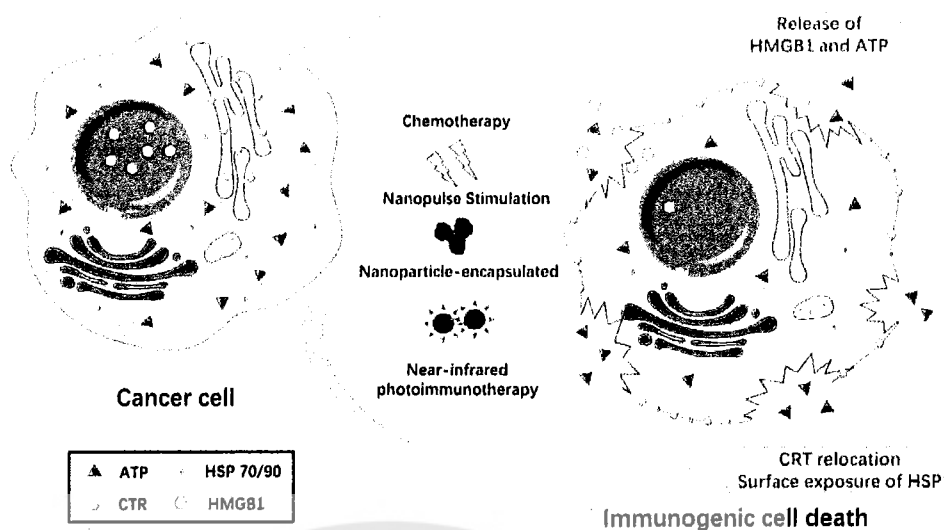
เป็นแนวทางการรักษาใหม่ที่จะช่วยให้แพทย์เลือกวิธีการรักษาทางการแพทย์ที่จำเพาะกับโรคมะเร็งของแต่ละบุคคลโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมนำไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูลกลางที่สามารถระบุกลไกการเกิดมะเร็งที่แตกต่างของแต่ละบุคคล จากนั้นจึงนำไปเลือกยาหรือวิธีการรักษาที่เหมาะสมกับบุคคลนั้นที่สุดและเกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุด (31)

2.2.9 การตรวจตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biological marker หรือ Biomarker)

เป็นวิธีการค้นหาฮัยน โปรตีน หรือสารที่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับมะเร็งได้ เนื่องจากสารบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งแต่ละคนจะมีรูปแบบที่ต่างกันและบางชนิดมีผลต่อการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งการตรวจหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพอาจเป็นตัวช่วยในการรักษามะเร็งที่จำเพาะกับมะเร็งของแต่ละบุคคล นอกจากนี้ยังมีสารบ่งชี้ทางชีวภาพสามารถช่วยในการวินิจฉัยและการดำเนินของโรคมะเร็งได้ (31)

2.3 Damage-associated molecular patterns DAMPs

DAMPs คือ โมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์เมื่อมีสภาวะปกติ และจะหลั่งออกมาเมื่อมีการกระตุ้นให้ได้รับการบาดเจ็บหรือมีการตายของเซลล์ (15) ซึ่งรูปแบบการตายของเซลล์มีหลายแบบ เช่น apoptosis, necrosis และ autophagy (35) ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันผ่านทางารติดเชื้อ การรักษามะเร็ง เช่น การฉายรังสี หรือการใช้ยาเคมีบำบัด (16) โดยทั่วไปแล้ว DAMPs มีหลายชนิดและได้มาจากตำแหน่งต่างๆของเซลล์ เช่น ในนิวเคลียสมี HMGB1 และ histones, ในไมโทคอนเดรียมี ATP, DNA และ Formyl peptides, ใน endoplasmic reticulum (ER) มี ATP และ Calreticulin, ในไซโทพลาสซึมมี ATP และ F-Actin (15) (36)

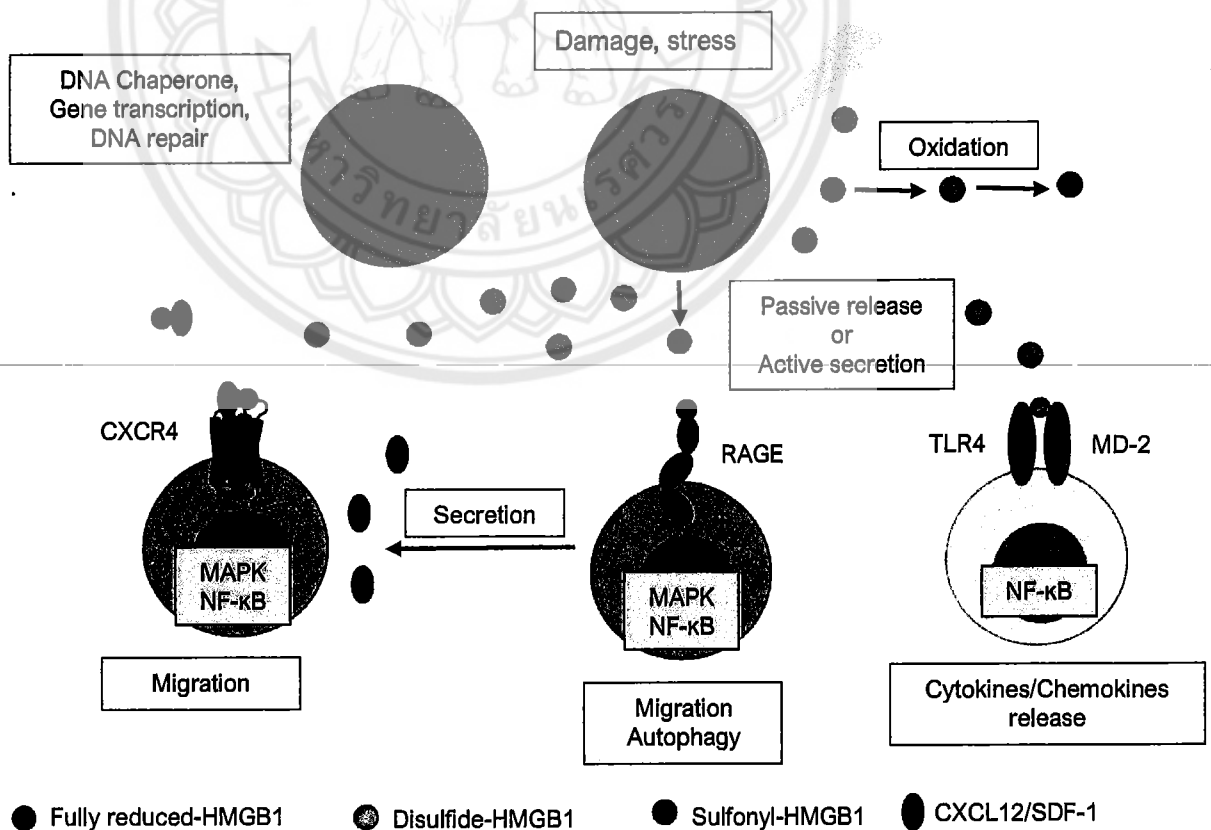


ภาพ 2 DAMPs ถูกปล่อยออกมาเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์

เมื่อมีการหลั่ง DAMPs ออกมาจากเซลล์ที่บาดเจ็บหรือตาย จะมีโมเลกุลตัวรับตัวหนึ่งที่จดจำ DAMPs แต่ละชนิดอย่างจำเพาะและช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เรียกว่า specific pattern recognition receptors (PRRs) จะอยู่บนผิวของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ซึ่ง PRRs มีหลายชนิดได้แก่ Toll-like receptors (TLRs), formyl peptide receptor (FPR), C-type lectins และ receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ตัวรับเหล่านี้จะไปกระตุ้นกระบวนการอักเสบในหลายแนวทาง เช่น NF- κ B, p38, NF- κ B ERK, inflammasome assembly เกิดการหลั่ง cytokines ต่างๆ เช่น IL-1 β , IL-18, IL-1, TNF และ IFN γ ก่อให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ DAMPs ยังมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดมะเร็งหลายชนิดและยังเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการอักเสบ และการพัฒนามะเร็ง (37-40)

DAMPs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่บาดเจ็บหรือตาย เช่น uric acid, HMGB1, S100 proteins, IL-1 α และ adenosine สามารถกระตุ้นการเจริญของมะเร็งได้ผ่านทางกลไกและเซลล์เป้าหมายที่แตกต่างกัน เช่น adenosine และ HMGB1 ทำให้เกิด immunosuppression, HMGB1 และ IL-1 α ทำให้เกิด angiogenesis, uric acid, HMGB1, S100 proteins และ adenosine ทำให้เกิด proliferation นอกจากนี้ ATP, IL-1 α , S100 proteins, HMGB1 และ uric acid ทำให้เกิด inflammation โดยมี natural killer cell (NK cell), myeloid-derived suppressor cell (MDSC), dendritic cell (DC), endothelial cell (EC) เป็นสื่อกลางและทำให้เกิดการพัฒนาของมะเร็ง (35)

High mobility group box 1 (HMGB1) เป็น non-histone nuclear protein จะอยู่ในนิวเคลียสมีหน้าที่เป็น DNA binding ที่ส่งเสริมโครงสร้างของ chromatin และเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA และความเสถียรของจีโนม (35) HMGB1 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์จะส่งสัญญาณอันตรายไปยังเซลล์รอบข้างกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและปรับตัวได้ โดยการโต้ตอบกับตัวรับหลายตัว (41) ได้แก่ การส่งสัญญาณ HMGB1 ผ่าน RAGE โดยกระตุ้นผ่าน NF-κB pathway, ตลอดจนการส่งสัญญาณผ่าน JNK และ p38 (42) นอกจากนี้การกระตุ้นผ่าน NF-κB pathway แล้วยังมีการกระตุ้นผ่านทาง ERK MAP kinase pathway ซึ่งมีความสำคัญกับการย้าย เซลล์การเพิ่มจำนวน และการบุกรุกของมะเร็ง HMGB1/RAGE axis โดยหลักแล้วจะเกี่ยวกับการรวมตัวของเซลล์ การทำให้เกิด autophagy และโมเลกุลยึดเกาะ เช่น VCAM-1 and ICAM-1 (43) นอกจากนี้จะมีการหลั่ง chemokines โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CXCL12 นอกจากนี้ CXCL12 ยังจับกับตัวรับชักนำให้เกิด cell migration (44) และ disulfide HMGB1 ที่อยู่ใน extracellular compartment จะจับกับ TLR4/MD-2 complex กระตุ้นให้หลั่ง chemokines และ cytokines (45) (1)



ภาพ 3 บทบาทของ HMGB1 (1)

2.4 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์

เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line หรือ subclone) คือ เซลล์ที่เลี้ยงต่อจาก primary culture โดยนำเซลล์บางส่วนมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์หรือเรียกว่า subculture จากการทำ subculture จะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้สูงสุด ทำให้มีความสม่ำเสมอของยีนและฟีโนไทป์ ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ Finite cell line และ Continuous cell line (46)

1. Finite cell line เป็นเซลล์ปกติที่มีการเพิ่มจำนวนจำกัด ซึ่งเวลาที่จะสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนจะถูกกำหนดโดยพันธุกรรม

2. Continuous cell line เป็นเซลล์ที่ไม่มีวันตาย ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นเองตามธรรมชาติ จากสารเคมี และจากการติดเชื้อไวรัส ทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง

ในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้มาจากผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยการนำเอาเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนและเมื่อมีจำนวนเพิ่มขึ้น การย้ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีบางส่วนมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่จะได้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (46) ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาต่างๆ เช่น ผลของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษา (47)

2.5 วิธีการตรวจสอบการแสดงออกและปริมาณของ DAMPs

การตรวจการแสดงออกและปริมาณของ DAMPs สามารถทำได้หลากหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีที่เลือกใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของ DAMPs ที่สนใจ โดย DAMPs แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ DAMPs ที่เป็นสารพันธุกรรม และ DAMPs ที่เป็นโปรตีน

DAMPs ที่เป็นสารพันธุกรรม เช่น DNA และ RNA สามารถตรวจสอบการแสดงออกและปริมาณด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR), Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Gene sequencing (48, 49)

DAMPs ที่เป็นโปรตีน เช่น HMGB1, HSP, ATP และ Calreticulin สามารถตรวจสอบการแสดงออกและปริมาณด้วยวิธี Western blot, flow cytometry, liquid chromatography, luminescence-based assays และ ELISA (50-54)

2.6 บทบาทของ DAMPs ต่อการเกิดมะเร็ง

ในปี ค.ศ. 2007 Apetoh L และคณะ ทำการศึกษา Toll-like receptor 4 ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต่อยาเคมีบำบัดและรังสีรักษาในการต้านมะเร็ง พบว่า มีการหลั่งของ HMGB1 ออกมาจากเซลล์มะเร็งที่ตายหลังจากได้รับยาเคมีบำบัดหรือการฉายรังสี จากนั้น HMGB1 จะเข้าไปจับกับ Toll-like receptor 4 (TLR4) ที่อยู่บน DCs และส่งสัญญาณผ่าน MyD88 ในการประมวลและนำเสนอแอนติเจนจากเซลล์มะเร็งที่ตาย ซึ่งผู้ป่วยมะเร็งเต้านมหลังจากรักษาด้วยยาเคมีบำบัดหรือรังสีจะมีการสูญเสียการทำงานของ TLR4 allele มากกว่าคนที่มี TLR4 allele ปกติ ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางคลินิกของระบบภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งที่ตายแล้ว (55)

ในปี ค.ศ. 2014 Pasi F และคณะ ทำการศึกษาผลของการรักษาแบบเดี่ยวหรือแบบผสมผสานระหว่างการฉายรังสีและการให้ยาเคมีบำบัดในการแสดงออกของสัญญาณการอยู่รอดและอันตรายที่แสดงออกมาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็ง Glioblastoma พบว่า การรักษาโดยการฉายรังสีทำให้ HSP70 เคลื่อนย้ายจากไซโตพลาสซึมออกมานอกเซลล์ และ HMGB1 เคลื่อนย้ายจากในนิวเคลียสออกมานอกเซลล์ หลังจากนั้นทำการยืนยันว่า HSP70 และ HMGB1 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็ง Glioblastoma หลังจากถูกทำลายด้วยการฉายรังสี นอกจากนี้พบว่ายา temozolomide มีประสิทธิภาพในการลดการกระตุ้นสัญญาณของ HMGB1 และ HSP70 ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาแบบผสมผสาน (56)

ในปี ค.ศ. 2014 Nadin SB และคณะ ทำการศึกษาการพยากรณ์โรคที่เกี่ยวข้องกับ Heat shock proteins A (HSPA) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ใช้ยา anthracycline รักษาพร้อมด้วย โดยใช้ immunohistochemistry ในการศึกษาการแสดงออกของ Heat shock proteins 1 (HSPB1) และ HSP70 (HSP) ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมของผู้ป่วยก่อนและหลังให้ยาเคมี พบว่า มีการแสดงออกของ HSPB1 และ HSP70 เพิ่มสูงขึ้นใน invasive cells หลังจากได้รับยา DOX/EPI แต่ไม่ได้ส่งผลต่อการแสดงออกของ HSPs ในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ HSPs ในนิวเคลียสของ lymphocytes ที่แทรกอยู่ในชิ้นเนื้อเซลล์มะเร็งสูงขึ้นแต่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกหรือพยาธิวิทยาในการตอบสนองต่อการรักษา อย่างไรก็ตามพบว่า มีการแสดงออกของ HSP70 ในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมเพิ่มสูงขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด Disease-free survival (DFS) ที่มากขึ้น (57)

ในปี ค.ศ. 2017 Timmermans K และคณะ ทำการศึกษา DAMPs ที่หลั่งออกมาหลังจากรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและไม่ทำให้เกิด Immunoparalysis หรือภูมิคุ้มกันไม่ตอบสนองในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ามีการแสดงออกของ Immunoparalysis marker ในผู้ป่วย หลังจากนั้นนำผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดหรือโรคไขกระดูกเสื่อมมาเจาะเก็บพลาสมาเพื่อตรวจหาระดับ cytokine, DAMPs และ Immunoparalysis marker ทั้งก่อนและหลังให้ยาเคมีบำบัดมาเทียบกัน พบว่ามีการแสดงออกของ nuclear DNA และ mitochondrial DNA เพิ่มสูงขึ้นหลังจากให้ยาเคมีบำบัดไม่นาน ส่วนระดับ cytokine ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับยาเคมีบำบัด จากนั้นศึกษาความสามารถในการสร้าง leukocyte cytokine และการแสดงออกของ Human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) พบว่ามีการแสดงออกคล้ายคลึงกันในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและกลุ่มควบคุม จากที่กล่าวมาทำให้ทราบว่าการศึกษาด้วยยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะทำให้มีการหลั่ง DAMPs ออกมาในระยะต้นไม่กระตุ้นให้เกิด Immunoparalysis (17)

ในปี ค.ศ. 2018 Anunobi R และคณะ ทำการศึกษากลไกของ DNA ที่หลั่งออกมาในการส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักหลังจากรักษาด้วยยาเคมีบำบัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ยาเคมีบำบัดทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis และมีการหลั่ง DNA ออกมานอกเซลล์ ซึ่ง DNA ที่หลั่งออกมาจะมีผลยับยั้งการเกิด apoptosis แต่ส่งเสริมการเกิด autophagy เมื่อลดการแสดงออกของ TLR-9 บนเซลล์มะเร็งกลับส่งผลให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นและเกิด autophagy ลดลง ทำให้ทราบว่า DNA ที่หลั่งออกมาส่งเสริมการอยู่รอดของมะเร็งโดยการกระตุ้นให้เกิด autophagy ผ่านทาง Toll-like receptor-9 (TLR-9) ที่อยู่บนเซลล์มะเร็ง (18)

ในปี ค.ศ. 2018 Leijte GP และคณะ ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ DAMPs ที่เพิ่มขึ้นในพลาสมาของผู้ป่วย ที่มีส่วนทำให้ภูมิคุ้มกันต่ำลง และมีการติดเชื้อหลังจากผ่าตัดในผู้ป่วยที่รักษาด้วย Cytoreductive Surgery (CRS) ร่วมกับ Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) พบว่า มีการแสดงออกของ DAMPs ในพลาสมา และระดับของ cytokine เพิ่มสูงขึ้นหลังจากรักษาด้วย CRS ร่วมกับ HIPEC นอกจากนี้ DAMPs ที่หลั่งออกมายังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกดการทำงานของภูมิคุ้มกันโดยลดการแสดงออกของ HLA-DR และ pro-inflammatory cytokine ถึง 0.5 เท่า เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐาน โดยเฉพาะ HMGB1 ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่ติดเชื้อหลังการผ่าตัด ดังนั้นผู้ป่วยที่รักษาด้วย CRS ร่วมกับ HIPEC ส่งผลให้ DAMPs หลั่งออกมากดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ HMGB1 ในพลาสมายังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อหลังการผ่าตัดของผู้ป่วย (58)

ในปี ค.ศ. 2019 Jiraviriyakul A. และคณะ ทำการศึกษาสารสกัด Honokiol ในการส่งเสริม cytotoxic T lymphocyte เพื่อทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ dendritic cells (DC) ร่วมกับ DAMPs พบว่า สารสกัด Honokiol สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการตายแบบ apoptosis และมีการหลั่ง DAMPs ออกมาเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ เมื่อทดสอบ DC กับเซลล์มะเร็งที่ตายจากการใช้ สารสกัด Honokiol พบว่า HMGB1 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ตายสามารถกระตุ้น DC ผ่าน toll-like receptor 4 (TLR4) ไปกระตุ้น T lymphocyte ให้เพิ่มจำนวนและสร้าง type I cytokine ได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้น เซลล์มะเร็งที่ตายจากการใช้สารสกัด Honokiol สามารถส่งเสริม DC ให้ไปกระตุ้น T lymphocyte ให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งที่ตายจากการไม่ใช้สารสกัด Honokiol (59)

ในปี ค.ศ. 2020 Zhang X และคณะ ทำการศึกษามูลของการรักษาด้วยยา Gemcitabine ความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และ natural killer cell (NK cell) ที่จำเพาะต่อมะเร็งปอด จากการศึกษาพบว่า การรักษาด้วยยา Gemcitabine ความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อมะเร็งปอด โดยส่งผลให้เพิ่มการแสดงออกของ calreticulin, HMGB1 และ NKG2D ligands เพิ่มมากขึ้น และนอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีการแสดงออกของ interferon- γ เพิ่มขึ้นและกระตุ้น NK cell ในหนู ทำให้การรักษาด้วยยา Gemcitabine ความเข้มข้นต่ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (19)

ตาราง 1 ความเข้มข้นของยา Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ที่กระตุ้นให้
เซลล์มะเร็งชนิดต่างๆหลั่ง DAMPs ชนิด HMGB1 (19, 60-68)

ชนิดเซลล์ เพาะเลี้ยง	ปริมาณเซลล์ที่ ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้น Gemcitabine	ความเข้มข้น Cisplatin	ความเข้มข้น Oxaliplatin	เวลา (ชั่วโมง)	วิธีการตรวจวัด HMGB1	อ้างอิง
Human lung cancer cell line A549	2x10 ⁵ cell/well 24 well plates	0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 µM	5 µM		24, 48	Immunofluo- rescence	(19)
Human bladder carcinoma cell T24 and BIU-87	5x10 ³ cell/well 96 well plates	0.037, 0.379, 3.799, 37.993, 379.939 µM	-	-	24	Western blot	(60)
Human prostate cancer cell line PC-3	-	7.598, 15.197, 30.394, 60.788, 121.579, 243.152 µM	-	-	48	Western blot	(61)
Human ovarian cancer cell line SKOV3, A2780, OVCAR3 and SKOV3/N130	5x10 ³ cell/well 96 well plates	-	40 µM	-	24	Western blot	(62)
Human CRT cell line SW480	3x10 ⁵ cell/ml	-	-	1,258 µM	6, 12, 18, 24, 30, 36, 42	ELISA	(63)
Cervical carcinoma HeLa cell and SiHa cell	2x10 ⁴ cell/ml 96 well plates	-	33.327 µM	-	24, 48, 72	Western blot	(64)
human HCC cell line SMMC-7721, HL-7702	-	-	2.5, 5, 10, 20, 40 µM	-	24	Immuno- blotting	(65)
Human CRC cell lines, HT29 and HCT116	5x10 ⁴ cell/well 96 well plates	-	-	35 µM	24	Western blot	(66)
Human colon cell CT26	2x10 ⁵ cell/well 12 well plates	-	-	5,10,25,50, 100,200,400, 800 µM	24	ELISA	(67)
Colon cancer DLD-1 cell line	-	-	-	0,2.5,5,12.5, 25 µM	24	Western blot	(68)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 รูปแบบวิธีวิจัย

การวิจัยพื้นฐาน

3.2 เครื่องมือในการวิจัย

3.2.1 ครุภัณฑ์

- 1) กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น CKX31
- 2) เครื่องชั่งน้ำหนัก (electronic balance) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น 30002CF
- 3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ Hettich zentrifugen รุ่น Rotofix 32
- 4) เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ theEZODO รุ่น PP-206
- 5) เครื่อง ELISA plate reader ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Enspire
- 6) ตู้แช่เย็น -20 °C (freezer) ยี่ห้อ SANYO
- 7) ตู้บ่มเพาะเซลล์ (5% CO₂ incubator) ยี่ห้อ SHEL LAB รุ่น 2323-2
- 8) ตู้ปลอดเชื้อ (biological safety cabinet class II) ยี่ห้อ NUAIRE
- 9) ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ (refrigerator) ยี่ห้อ SANYO
- 10) ตู้อบ (hot air cabinet) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UM500
- 11) ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ยี่ห้อ TAYLOR-WHARTON รุ่น XT20
- 12) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ STURDY รุ่น SA-300VL
- 13) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Julabo รุ่น SW23
- 14) Molecular Image® ChemiDoc™ XRS + Imaging System ยี่ห้อ Bio-Rad
- 15) SDS-PAGE apparatus ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น mini protean® Tetra cell
- 16) Wet/Tank Blotting System ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น mini Transblot® cell

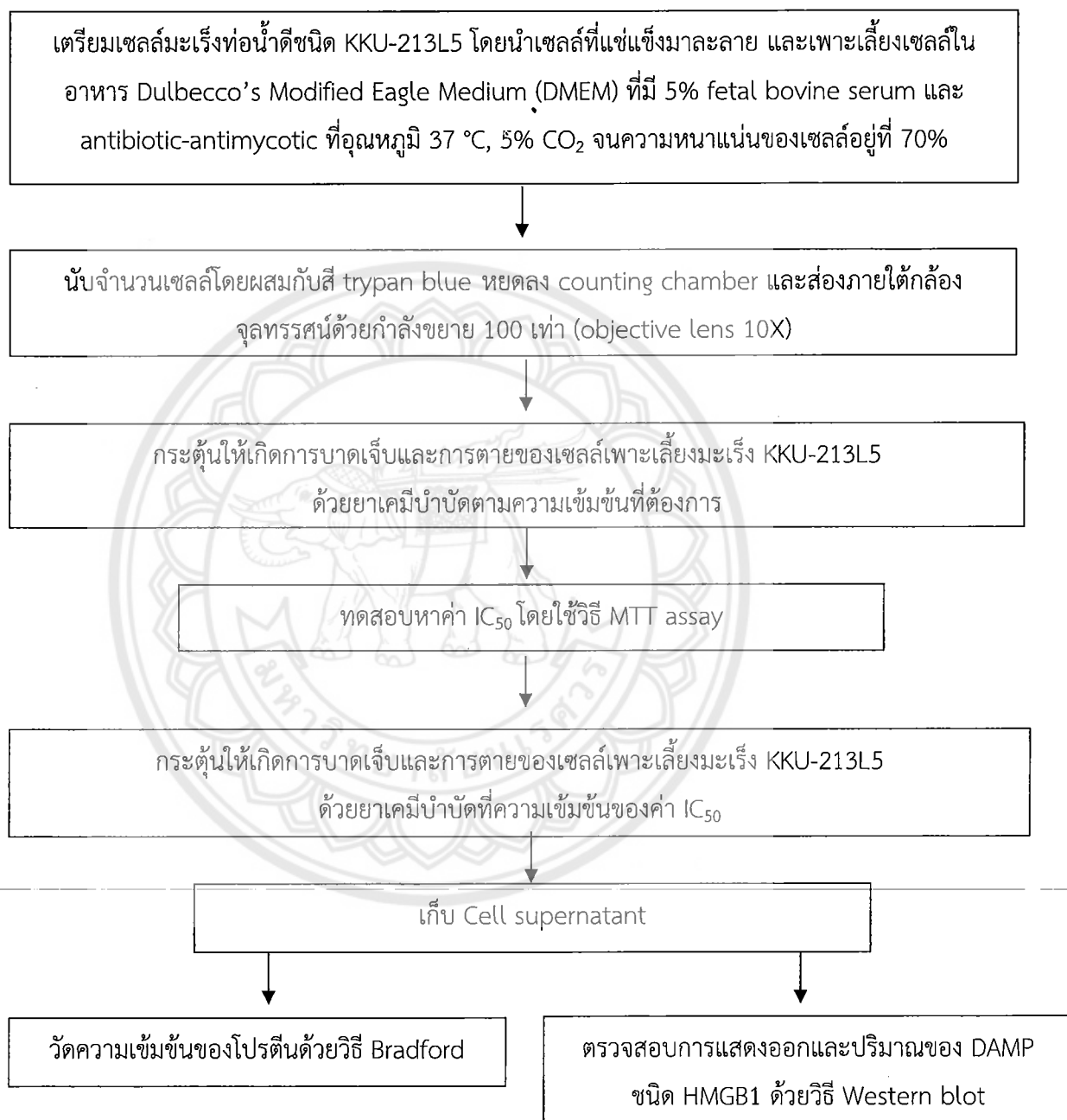
3.2.2 อุปกรณ์

- 1) Aluminum foil
- 2) Autopipette
- 3) Beaker
- 4) Cell culture dish
- 5) Cell culture flask 75 cm³
- 6) Cell culture plate 6-well
- 7) Cell culture plate 96-well
- 8) Centrifuge tube 15 ml, 50 ml
- 9) Centrifugal concentrator
- 10) Cling film
- 11) Counting chamber (hemocytometer)
- 12) Cryotube 1.5 ml
- 13) Cryotube box
- 14) Cylinder 1,000 ml
- 15) Erlenmeyer flask
- 16) Forceps
- 17) Latex disposable powder powdered gloves
- 18) Microcentrifuge tube
- 19) Pasteur pipette
- 20) Permanent pen
- 21) Pipette boy
- 22) Polyvinylidene fluoride (PVDF)
- 23) Rack
- 24) Serological pipette 1 ml, 5 ml, 10 ml
- 25) Stericup
- 26) Sterile autopipette
- 27) Sterile Duran
- 28) Tissue paper
- 29) Ultra-2 ml centrifugal filter (3K) บริษัท Amicon®
- 30) Waste container

3.2.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ น้ำยาและสารเคมี

- 1) 70% (v/v) Ethyl alcohol
- 2) Antibiotic-Antimycotic 100X (25 µg/ml Amphotericin B, 10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin) บริษัท Gibco®
- 3) Anti-HMGB1 (rabbit polyclonal IgG) บริษัท Elabscience®
- 4) Anti-rabbit IgG, HRP linked antibody บริษัท Cell Signaling Technology®
- 5) Blocking buffer (5% skimmed milk)
- 6) Bradford reagent บริษัท Bio-Rad
- 7) Chemotherapy drugs : Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin
- 8) Deionized water
- 9) Dimethyl Sulfoxide (DMSO) บริษัท Amresco®
- 10) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complete media บริษัท Gibco®
- 11) Fetal bovine serum บริษัท Gibco®
- 12) Hydrochloric acid
- 13) 4X Leammli sample buffer บริษัท Bio-Rad
- 14) Luminata™ Crescendo Western HPR substrate บริษัท Millipore™
- 15) Methyl alcohol
- 16) MTT reagent
- 17) Sodium bicarbonate
- 18) Sodium hydroxide
- 19) Phosphate Buffered saline (PBS) tablets บริษัท AMRESCO®
- 20) Tris buffer saline with Tween 20 (TEST)
- 21) Tris-glycine SDS running buffer
- 22) 1X Trypsin
- 23) Trypan blue

3.3 วิธีการดำเนินงาน



ภาพ 4 แผนภูมิวิธีการดำเนินงาน

3.3.1 วิธีการทดสอบ

3.3.1.1 การละลายเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

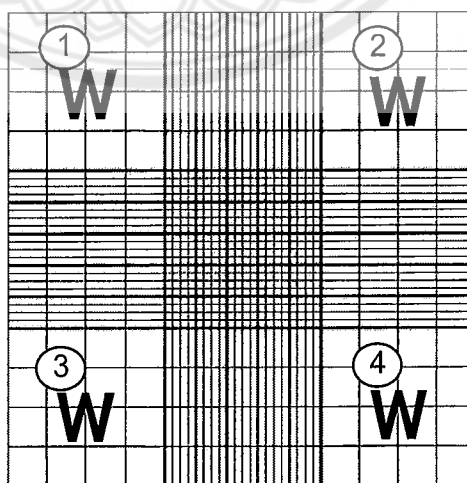
นำเซลล์ KKU-213L5 ที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวไปละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ให้เหลือก้อนน้ำแข็งเล็กน้อย จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดออกมาใส่ใน centrifuge tube ที่มีอาหารเลี้ยง •Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) เซลล์ 10 ml และนำไปปั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออกจนหมด และ re-suspend ด้วยการเคาะเบาๆ เติม DMEM 5 ml จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ใน cell culture flask ขนาด 75 cm³ เพื่อทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.3.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ KKU-213L5 ใน DMEM ที่มี 5% fetal bovine serum และเติม antibiotic-antimycotic ซึ่งประกอบด้วย Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin 100 units/ml และ Amphotericin B 0.25 µg/ml ปริมาตร 10 ml โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂

3.3.1.3 การนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

สำหรับการนับเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจากวิธีการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.1.2 จะทำการนับโดยนำเซลล์ที่เหลือจากการ subculture 20 µl ผสมกับสี trypan blue 20 µl (อัตราส่วน 1:1) จากนั้นหยดลง counting chamber (hemocytometer) (ภาพ 4) ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า (objective lens 10X) เพื่อทำการนับจำนวนเซลล์ในบริเวณที่ใช้ในการนับเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 4 ช่อง



ภาพ 5 แสดงบริเวณ counting chamber ในการใช้นับจำนวนเซลล์

โดยคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากสูตร

$$\text{Cell number (cells/ } \mu\text{l)} = \frac{\text{Total cell count} \times \text{dilution}}{0.1 \times 1 \times 1 \times 4}$$

3.3.1.4 การหาค่า IC₅₀ ด้วยวิธี MTT assay

นำเซลล์ KKU-213L5 ที่มีความหนาแน่น 5,000 เซลล์/หลุม ปริมาณ 100 μl ใส่ลงไป ใน 96-well plate และ บ่มที่ตู้เพาะเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ จากนั้น เติมน้ำยา Gemcitabine (625, 1,250, 2,500, 5,000, 10,000 μM), Cisplatin (25, 50, 100, 200, 400 μM) และ Oxaliplatin (100, 200, 400, 800, 1,600 μM) ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 μl ลงไปในแต่ละหลุมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อมาดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดออกแล้วเติมน้ำยา MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ใน DMSO ปริมาณ 100 μl และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดน้ำยา MTT ออกแล้วเติม DMSO 200 μl ปิดฝาและเขย่าด้วยเครื่อง 15 นาที เพื่อละลาย formazan crystals ที่เกิดขึ้นจะได้สารละลายที่มีสีม่วง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตจะ คำนวณจากสมการ

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Chemotherapy (Abs540)}}{\text{Control (Abs540)}} \times 100$$

ตัวอย่างตารางผลการทดลองการหาค่า IC₅₀ ด้วยวิธี MTT assay แสดงดังตารางที่ 2

ตาราง 2 ตัวอย่างตารางผลการทดลอง

ความเข้มข้นยา เคมีบำบัด (μM)	ค่าดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	% Cell viability
	หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3		
ความเข้มข้น 1					
ความเข้มข้น 2					
ความเข้มข้น 3					
ความเข้มข้น 4					
ตัวควบคุมลบ					
ตัวควบคุมDMSO					

3.3.1.5 การกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดตามความเข้มข้นของค่า inhibition concentration (IC) ที่เหมาะสม และหาความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

นำเซลล์ K KU-213L5 ที่มีความหนาแน่น 150,000 เซลล์/หลุม ปริมาณ 1,500 μ l ใส่ลงไปใน 6-well plate และบ่มที่ตู้เพาะเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมยา Gemcitabine ที่ความเข้มข้น 250,000 μ l (IC_{75} ที่ 24 ชั่วโมง) ยา Cisplatin ที่ความเข้มข้น 170 μ l (IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง) และยา Oxaliplatin ที่ความเข้มข้น 640 μ l (IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง) ที่ได้จากการทำข้อ 3.3.1.4 เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ K KU-213L5 ด้วย PBS จากนั้นเติม DMEM ปริมาณ 1,500 μ l และบ่มต่อ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดน้ำส่วนบนเก็บไว้และแบ่งส่วนหนึ่งมาทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford ด้วยน้ำยา Bradford's reagent ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ในน้ำยากับโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน ฮิสทีดีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน โดยการผสม Bradford's reagent หลุมละ 200 μ l กับตัวอย่างโปรตีน หลุมละ 10 μ l ใน 96-well plate และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่มีความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน ซึ่งความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ใช้คือ 1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75 และ 9.375 μ g/mL

3.3.1.6 การตรวจการแสดงออกของ DAMPs ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีภายหลังการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดด้วยวิธี Western blot

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.3.1.5 มาแยกใน 10% polyacrylamide gel ด้วยกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 70 โวลต์ 10 นาที และ 100 โวลต์ โดยใช้ SDS Tris-glycine buffer จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) โดยการทำให้ electroblotting ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 200 โวลต์ โดยใช้ transfer buffer จากนั้นนำ PVDF มา block ด้วย 5% skimmed milk ใน Tris buffer saline (TBS) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับโปรตีน HMGB1 เติม anti-HMGB1 (rabbit polyclonal IgG) ที่ dilution titer 1:1,000 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน แล้วล้างด้วย Tris buffer saline Tween 20 (TBST) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติม anti-rabbit horseradish conjugated IgG ที่ dilution titer 1:1,000 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ นำมาทำปฏิกิริยา Chemiluminescence กับ ECL substrate

ว. AC
271
.C9
03/555
2564

1049036
28 ก.พ. 2565



สำนักหอสมุด

(Luminata™Crescendo western HRP substrate) เป็นเวลา 3 นาที วิเคราะห์ผลโดยวัดค่าความเข้มแสงของแถบ (band intensity) ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่น PVDF ด้วยกล้อง charge-couple device (CCD)

3.3.1.7 การกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดหลายชนิด

นำเซลล์ KKU-213L5 ที่มีความหนาแน่น 5,000 เซลล์/หลุม ปริมาณ 100 μ l ใส่ลงไปใน 96-well plate และ บ่มที่ตู้เพาะเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ จากนั้นบ่มด้วยยาเคมีบำบัดที่ผสมเข้าด้วยกัน (69) ได้แก่ Gemcitabine ความเข้มข้นเท่ากับ IC₇₅ ผสมกับ Cisplatin (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M และ 40 μ M) และ Gemcitabine ความเข้มข้นเท่ากับ IC₇₅ ผสมกับ Oxaliplatin (12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) ปริมาณ 100 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อมาทำการหาค่า IC₅₀ ด้วยวิธี MTT assay และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford รวมถึงตรวจสอบการแสดงออกของ HMGB1 ด้วยวิธี Western blot ตามข้อ 3.3.1.4 – 3.3.1.6

3.3.1.8 การควบคุมคุณภาพ

1. การควบคุมคุณภาพของ MTT assay

ตัวควบคุมคุณภาพ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตรเท่ากับยาเคมีบำบัดที่ความเข้มข้นสูงที่สุดในแต่ละการทดสอบ ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์และบ่มตามเวลาที่ต้องการทดสอบ

2. การควบคุมคุณภาพลบ

ตัวควบคุมคุณภาพลบ เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยที่ไม่ใส่ยาเคมีบำบัด หรือ DMSO

3.3.1.9 สถิติที่ใช้ทดสอบ

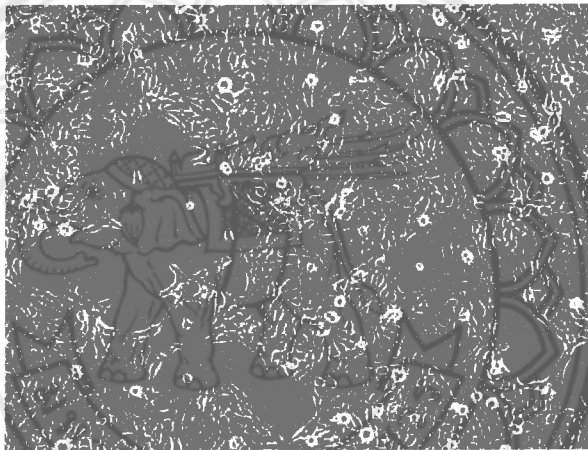
การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) นำข้อมูลการแสดงผลของ DAMPs ชนิด HMGB1 มาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบด้วยสถิติทดสอบ One Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5

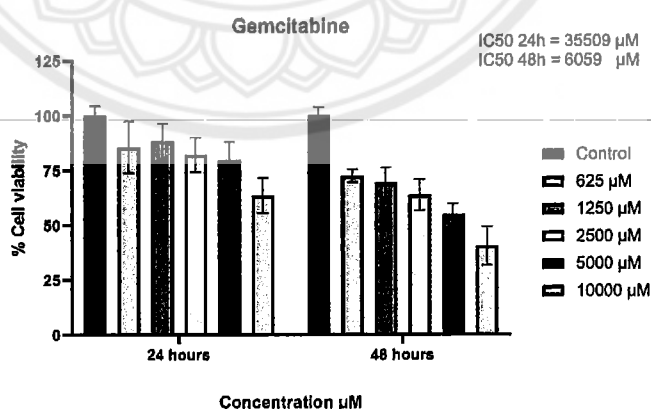
ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma cell lines ; KKU-213L5) เมื่อตรวจสอบเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี มีลักษณะเป็นเซลล์ที่เกาะติด (adherent cell) รูปร่างหลายเหลี่ยม (polyclonal shape) และมีการเจริญแบบเกาะกลุ่ม (ภาพ 6)



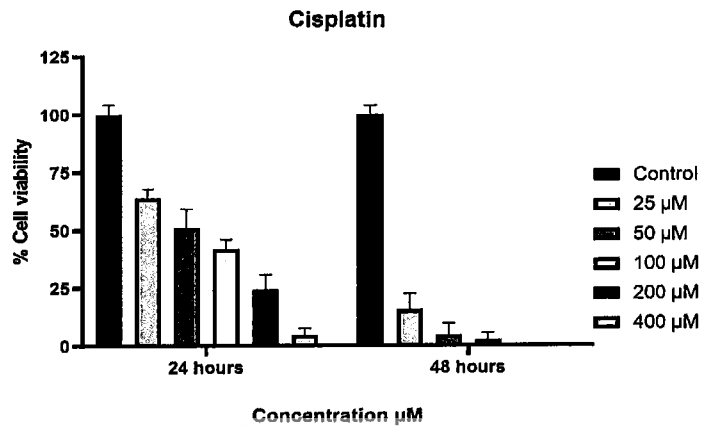
ภาพ 6 แสดงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
กำลังขยาย 200 เท่า

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยหลักการ MTT assay

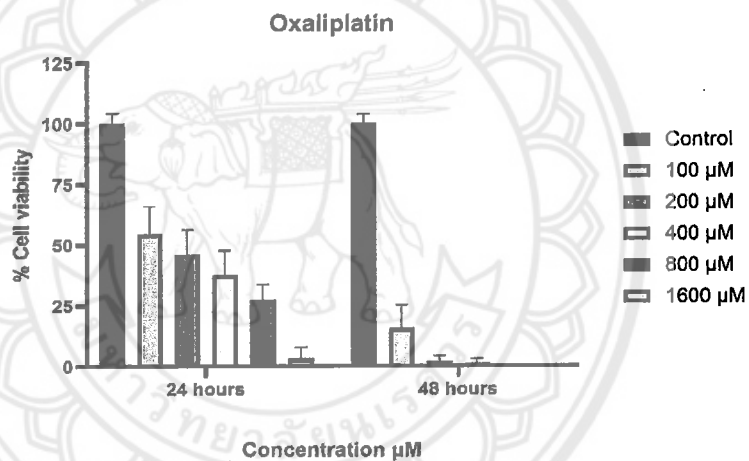
การทดสอบความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยง KKU-213L5 ด้วยหลักการ MTT assay เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} โดยได้บ่มยาเคมีบำบัด Gemcitabine Cisplatin และ Oxaliplatin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ Control DMSO เพื่อคำนวณหา % cell viability จากการศึกษาโดยผู้วิจัยกลุ่มอื่น (Unpublished data) เมื่อทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมที่ KKU-213L5 ด้วยยาเคมีบำบัด Gemcitabine ที่ความเข้มข้น 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 μM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ 24 ชั่วโมงมี % cell viability เซลล์มะเร็งเต้านมที่เท่ากับ 85.65%, 88.50%, 82.08%, 79.83% และ 63.56% ที่ 48 ชั่วโมงมี % cell viability ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เท่ากับ 72.45%, 69.37%, 63.78%, 54.66% และ 40.49% ตามลำดับ (ภาพ 7) เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเต้านมที่ด้วยยาเคมีบำบัด Cisplatin ที่ความเข้มข้น 25 μM 50 μM 100 μM 200 μM 400 μM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ 24 ชั่วโมงมี % cell viability ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เท่ากับ 63.85%, 50.97%, 41.75%, 24.41% และ 4.55% ที่ 48 ชั่วโมง มี % cell viability ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เท่ากับ 15.40%, 4.48%, 2.44%, 0% และ 0% ตามลำดับ (ภาพ 8) เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเต้านมที่ด้วยยาเคมีบำบัด Oxaliplatin ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 800 และ 1,600 μM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ 24 ชั่วโมงมี % cell viability เซลล์มะเร็งเต้านมที่เท่ากับ 54.56%, 46.04%, 37.51%, 27.40% และ 3.10% ที่ 48 ชั่วโมง มี % cell viability ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เท่ากับ 15.55%, 1.98%, 1.20%, 0% และ 0% ตามลำดับ (ภาพ 9) จากนั้นนำค่า % cell viability เหล่านี้มาคำนวณหา IC_{50} นอกจากนี้ยังได้คำนวณหา IC_{25} และ IC_{75} แสดงดังตาราง 3



ภาพ 7 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยง KKU-213L5 เทียบกับความเข้มข้นของยาเคมีบำบัด Gemcitabine



ภาพ 8 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-213L5 เทียบกับความเข้มข้นของยาเคมีบำบัด Cisplatin



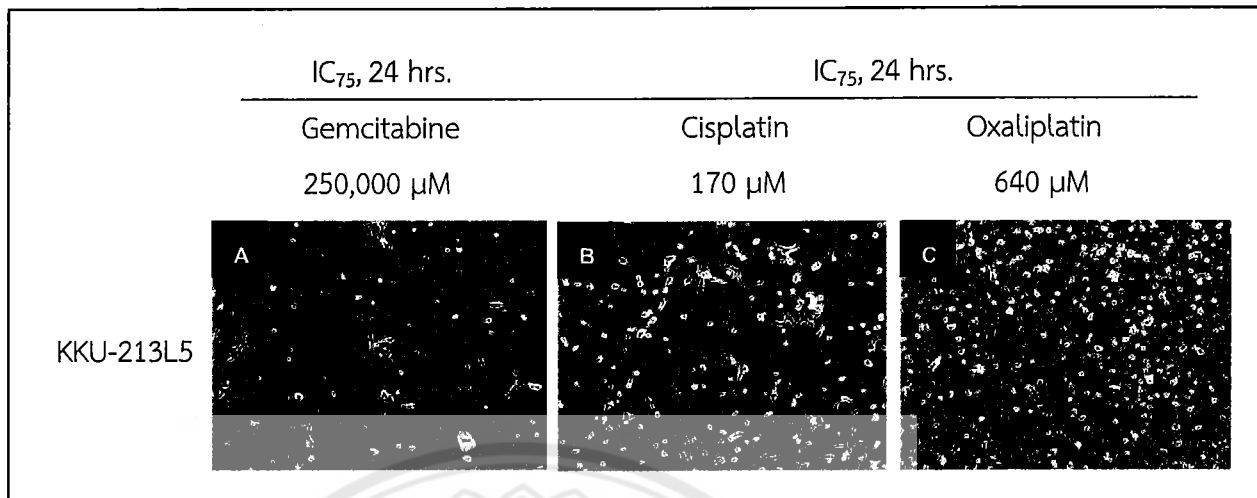
ภาพ 9 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-213L5 เทียบกับความเข้มข้นของยาเคมีบำบัด Oxaliplatin

Chemotherapeutic agents	Concentration (μM)					
	IC25		IC50		IC75	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Gemcitabine	4997.56	670.83	35481.34	6053.41	251908.1	54624.69
Cisplatin	16.58	5.24	53.21	9.66	170.74	17.8

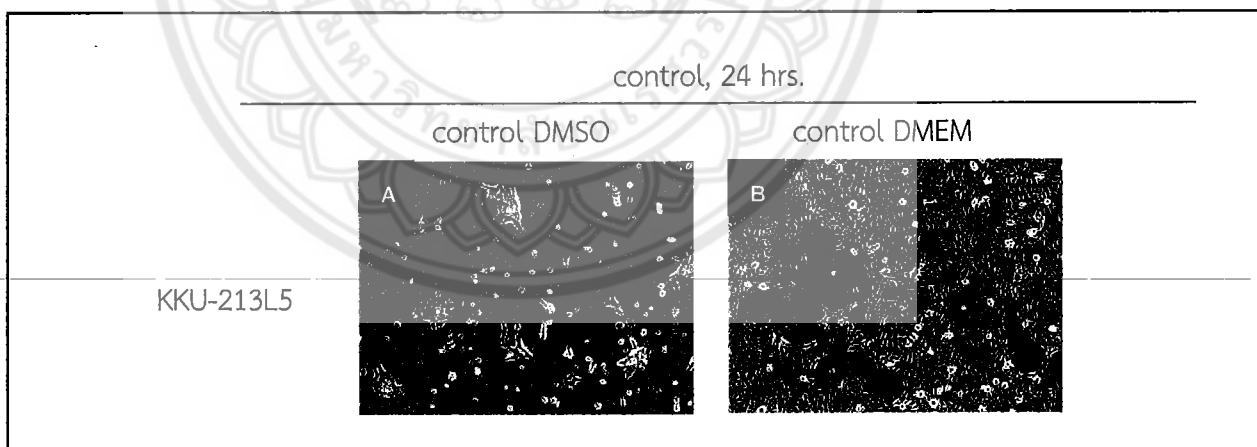
ตาราง 3 ค่า IC₂₅ IC₅₀ และ IC₇₅ ของยาเคมีบำบัด Gemcitabine Cisplatin และ Oxaliplatin

4.3 ผลของการกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213L5 เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin

ในการกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213L5 เกิดการตายแบบ apoptosis ทำโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 5% (v/v) fetal bovine serum โดยใช้ยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin โดยยาเคมีบำบัด Gemcitabine ใช้ IC₅₀ ที่ความเข้มข้น 250,000 (DMSO : 3.53%) μM ส่วนยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin และ Oxaliplatin ใช้ IC₇₅ ที่ความเข้มข้น 170 (DMSO : 0.33%) และ 640 (DMSO : 1.33%) μM ตามลำดับ ตรวจสอบผลด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213L5 มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ Gemcitabine Oxaliplatin และ Cisplatin มีการสูญเสียความสามารถในการเกาะติดของเซลล์ (ภาพ 10A-10C) จากผลดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า ยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ Apoptosis โดยสังเกตได้จากรูปร่างและความสามารถในการเกาะติดของเซลล์ที่เปลี่ยนไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้จากการศึกษาโดยผู้วิจัยกลุ่มอื่น (Unpublished data) ได้ทดสอบการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213L5 โดยใช้เทคนิค Annexin V/PI staining ด้วยวิธี Flow cytometry พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213L5 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยยา Cisplatin ที่ IC₇₅ และ Oxaliplatin ที่ IC₇₅ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการตายแบบ Apoptosis เฉลี่ย 23.64 และ 24.88 % ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่มีการตายแบบ Apoptosis เฉลี่ย 13.46 %



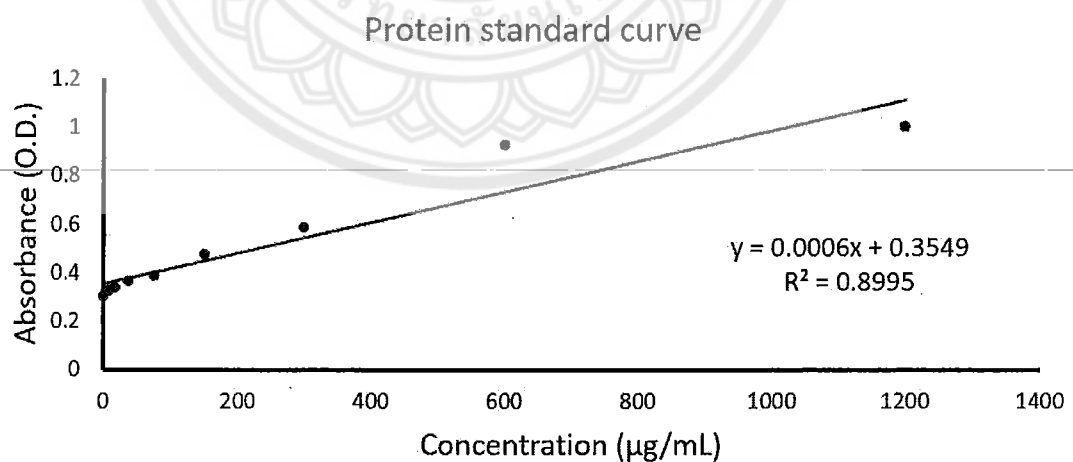
ภาพ 10 แสดงผลของการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 (ภาพ 10A-10C) เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine ความเข้มข้นที่ IC₅₀ คือ 250,000 μ M และยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin และ Oxaliplatin ความเข้มข้นที่ IC₇₅ คือ 170 และ 640 μ M ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า



ภาพ 11 แสดงผลของการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 (ภาพ 11A-11B) ด้วย DMSO และ DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า

4.4 ผลของการวัดความเข้มข้นโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ที่กระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ด้วยวิธี Bradford assay

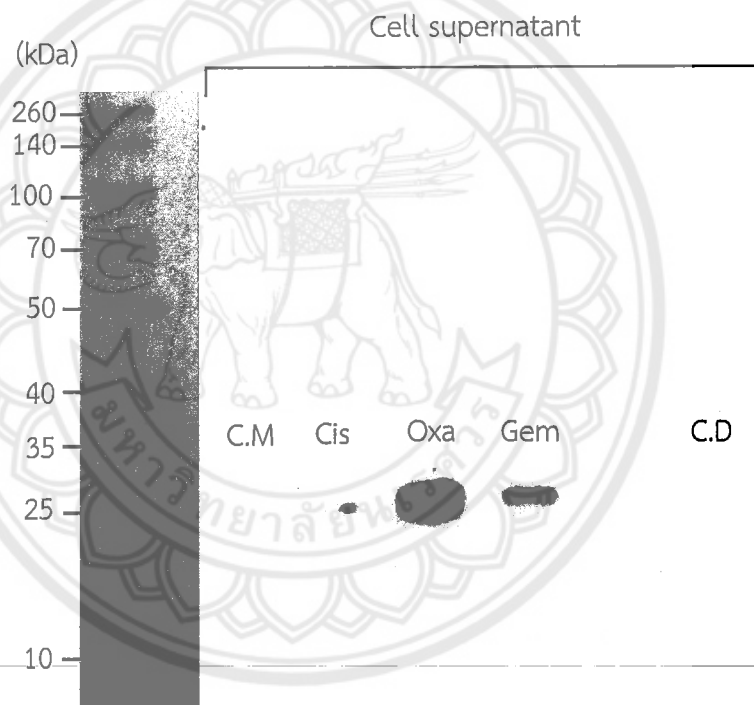
ในการวัดความเข้มข้นโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ที่ทำให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัด ด้วยวิธี Bradford assay พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่เกิดจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin มีค่าเท่ากับ 1.106, 1.150 และ 1.012 ตามลำดับ นอกจากนี้ค่าการดูดกลืนแสงของ control DMSO และ control DMEM มีค่าเท่ากับ 1.141 และ 1.196 ตามลำดับ จากค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดถูกรบกวนด้วยปริมาณโปรตีนของ 5% fetal bovine serum ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM จึงต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิดลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ control DMEM ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิดมีค่าติดลบ ในการทดสอบนี้มีการสร้างกราฟมาตรฐานจาก bovine serum albumin (BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน โดยกำหนดที่ความเข้มข้น 1,200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 และ 0 $\mu\text{g/ml}$ จากกราฟมาตรฐานจะเห็นได้ว่าไม่สามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงติดลบได้ เพราะฉะนั้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ที่กระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin จึงไม่สามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนที่เกิดขึ้นได้



ภาพ 12 แสดงกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 1,200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 และ 0 $\mu\text{g/ml}$

4.5 ผลการตรวจการแสดงออกของ DAMPs (HMGB1) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ภายหลังการกระตุ้นให้เกิดการตายด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ด้วยวิธี western blot

จากการตรวจสอบการแสดงออกของ HMGB1 เมื่อกระตุ้นให้เกิดการตายในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 ด้วยวิธี western blot พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ HMGB1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa ใน cell supernatant ของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับยาเคมีชนิด Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin ที่ความเข้มข้น 250,000, 170 และ 640 μM ตามลำดับ และยังพบการแสดงออกของ HMGB1 ใน cell supernatant เซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ DMSO 3.53%



ภาพ 13 แสดงผลการตรวจการแสดงออกของโปรตีน HMGB1 (น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa) ใน supernatant ด้วยวิธี Western blot ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-213L5) ที่เลี้ยงร่วมกับยาเคมีบำบัด Gemcitabine (Gem), Cisplatin (Cis) และ Oxaliplatin (Oxa) ที่ความเข้มข้น 250,000, 170 และ 640 μM ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ Control DMEM (C.M.) และ Control (DMSO)

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะต้นที่ให้ผลดีที่สุดคือการผ่าตัด แต่ผู้ป่วยมักได้รับการวินิจฉัยในระยะแพร่กระจาย ซึ่งไม่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัดได้จึงต้องให้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (70) นอกจากนี้มีการใช้ยาร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา (8) ซึ่งยา Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin มีกลไกในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการบาดเจ็บและตายที่แตกต่างกัน (9, 11, 33) จากการศึกษาท่อน้ำดีพบว่ายาทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งต่าง ๆ มีการตายแบบ apoptosis และหลั่ง HMGB1 (High mobility group box 1) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ Damage-associated molecular pattern (DAMPs) (60, 62, 63) และ HMGB1 มีบทบาทในการส่งเสริมและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (15) จากการศึกษาโดยผู้วิจัยกลุ่มอื่น (Unpublished data) ซึ่งรายงานค่า IC_{50} ของ Gemcitabine, IC_{75} ของ Cisplatin และ IC_{75} ของ Oxaliplatin ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่า 250,000 170 และ 640 μM ตามลำดับ ซึ่งยา Gemcitabine ที่ใช้ IC_{50} เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าเซลล์ K KU-213L5 ตื้อต่อยา Gemcitabine (71) ทำให้ความเข้มข้นของยา Gemcitabine ที่ IC_{75} ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์มีค่าสูง แต่ลักษณะและปริมาณเซลล์มะเร็งที่ตายไม่ต่างจากเซลล์ที่บ่มด้วย Gemcitabine ที่ IC_{50} ดังนั้นเพื่อลดปริมาณยาเคมีบำบัดที่ต้องใช้ จึงลดความเข้มข้นของ Gemcitabine ลงมาใช้ที่ IC_{50} ส่วนยา Cisplatin และ Oxaliplatin ใช้ความเข้มข้นที่ IC_{75} เนื่องจากลักษณะของเซลล์ที่ IC_{50} มีลักษณะการตายของเซลล์ที่ค่อนข้างน้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นของยา Gemcitabine ที่ IC_{50} ส่วน Cisplatin และ Oxaliplatin ใช้ความเข้มข้นที่ IC_{75} โดยมีการใช้ DMSO ปริมาตรเท่ากับยาเคมีบำบัดที่มีเปอร์เซ็นต์ DMSO ผสมอยู่สูงสุด เพื่อดูว่าความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์และใช้ DMEM ปริมาตรเท่ากับยาเคมีบำบัดที่มีเปอร์เซ็นต์ DMSO ผสมอยู่สูงสุด

จากการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิด และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่คาดว่า มี HMGB1 มาตรวจสอบปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford พบว่าไม่สามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนได้ เนื่องจากพบว่าค่าดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากตัวควบคุมลบมีค่าสูงกว่าค่าดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาเคมีบำบัด ซึ่งคาดว่าเกิดจากการรบกวนของโปรตีนในซีรัมที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถแก้ไขด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ serum-free media ในขั้นตอนที่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อไม่ให้ถูกรบกวนจากโปรตีนในซีรัมและต้องหาสภาพแวดล้อมที่เซลล์ไม่ตายจากการอยู่ใน serum-free media แต่ตายจากผลของยาเคมีบำบัดหรือเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนด้วย Centrifugal filter tube เพื่อให้ความเข้มข้นของ

โปรตีนและสัดส่วนของ HMGB1 เพิ่มขึ้น จะได้เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนเมื่อเซลล์มีการหลั่ง HMGB1 ออกมา (59) นอกจากนี้จากการศึกษาของคุณ Hongliang และคณะ ในปี 2014 ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ HMGB1 ที่ออกจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด SW480 หลังกระตุ้นด้วยยา Oxaliplatin ด้วยวิธี ELISA พบว่า HMGB1 ที่ออกจากเซลล์หลังจากบ่มด้วยยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ng/ml (63) ดังนั้นวิธี ELISA ก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะช่วยหาปริมาณ HMGB1 ได้

การตรวจสอบการแสดงออกของ HMGB1 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่คาดว่าจะมี HMGB1 ด้วยวิธี Western blot พบว่าน้ำเลี้ยงที่เก็บหลังจากกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีให้มีการตายแบบ Apoptosis ด้วยยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิดและตัวควบคุม DMSO พบว่ามีการแสดงออกของ HMGB1 แต่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ในตัวควบคุมกลับไม่มีการแสดงออกของ HMGB1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของคุณ Zhang YX และคณะ ในปี 2017, คุณ Zhang Y และคณะในปี 2012 และคุณ Fang H และคณะในปี 2014 (61-63) ที่พบว่ายา Gemcitabine Cisplatin และ Oxaliplatin สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการหลั่ง HMGB1 ออกมาได้ โดยพบว่าน้ำเลี้ยงที่เก็บหลังจากกระตุ้นด้วยยา Oxaliplatin มีการแสดงออกของ HMGB1 มากที่สุด รองลงมาเป็น Cisplatin และ Gemcitabine ตามลำดับ Gemcitabine จากการศึกษาของคุณ Nunghathai และคณะ ในปี 2020 พบว่า เซลล์ KKU-213L5 ตื้อต่อยา Gemcitabine โดยผ่านกระบวนการ Efflux pump เป็นหลัก (63) ซึ่งตามทฤษฎีแล้วเซลล์ KKU-213L5 จะไม่ตายหรือตายน้อยกว่ายา Gemcitabine ซึ่งเมื่อเทียบกับตัวควบคุม DMSO พบว่าเซลล์มีการตายจาก DMSO ที่ใช้ในการละลายยาและแถบของ HMGB1 ของยา Gemcitabine กับแถบควบคุม DMSO มีความเข้มที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงคาดว่าเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่ Gemcitabine ส่วนใหญ่ตายจากความเป็นพิษของ DMSO และส่วนหนึ่งก็เกิดจากยา Gemcitabine

แต่ทั้งนี้ก็มีการศึกษาของคุณ Bin และคณะ ในปี 2019 พบว่า HMGB1 นอกจากหลั่งออกมาในรูปของ Extracellular HMGB1 ยังสามารถออกมาจากเซลล์ในรูปของ Exosomal HMGB1 และ Exosomal HMGB1 มีส่วนช่วยในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (72) ซึ่งยา Cisplatin และ Gemcitabine อาจกระตุ้นให้มีการหลั่ง HMGB1 ออกมาในรูปของ Exosomal HMGB1 ซึ่งต้องทำให้ถุงของ Exosome แตกก่อนจึงจะสามารถตรวจพบ HMGB1 ได้ ทำให้เมื่อตรวจสอบการแสดงออกด้วย western blot จึงพบว่าการแสดงออกของ HMGB1 น้อยกว่ายา Oxaliplatin ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาผลของยาเคมีบำบัดต่อการแสดงออกของ Exosomal HMGB1 ต่อในอนาคตเพื่อทำให้ผลการวิจัยมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดหลายชนิดร่วมกันไม่สามารถทำได้ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากข้อจำกัดของเวลา แต่จากการศึกษาพบว่า ยา Gemcitabine, Cisplatin และ Oxaliplatin มีกลไกในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบ apoptosis (61-63) ซึ่งเป็นรูปแบบการตายที่สัมพันธ์กับการหลั่ง HMGB1 (55) นอกจากนี้จากศึกษาของคุณ Hongliang และคณะ ในปี 2014 พบว่าเมื่อใช้ยาเคมีบำบัด 2 ชนิด ร่วมกัน ได้แก่ ยา Oxaliplatin กับ fluorouracil กระตุ้นเซลล์มะเร็งมะลำไส้ใหญ่ ชนิด SW480 ทำให้มีปริมาณและการแสดงออกของ HMGB1 มากกว่าการใช้ยา Oxaliplatin เพียงชนิดเดียว (63) ดังนั้นจึงคาดว่าผลของการใช้ยาเคมีบำบัดหลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ Gemcitabine ร่วมกับ Cisplatin และ Gemcitabine ร่วมกับ Oxaliplatin จะกระตุ้นให้ให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis และมีการหลั่ง HMGB1 มากกว่าการใช้ยาเคมีบำบัดชนิดเดียว (single agent) นอกจากนี้จากผลการทดลองที่พบว่ายา Oxaliplatin กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ HMGB1 มากที่สุด รองลงมาเป็น Gemcitabine และ Cisplatin ตามลำดับ ดังนั้นจึงคาดว่าสูตรที่ใช้ยา Gemcitabine ร่วมกับ Oxaliplatin กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ HMGB1 มากที่สุด รองลงมาเป็น Gemcitabine ร่วมกับ Cisplatin ซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า HMGB1 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจะส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวน การแพร่กระจายและการพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (59, 73) ซึ่งถ้าหากยาเคมีบำบัดที่ให้ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ HMGB1 สูงขึ้น อาจส่งเสริมการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี โดยหากแพทย์ทราบว่ายาเคมีบำบัดชนิดใดส่งเสริมให้มีการหลั่ง HMGB1 ก็จะช่วยเป็นแนวทางในการเลือกยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหรือพิจารณาการให้สารที่ช่วยในการยับยั้งการทำงานของ HMGB1 ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานที่กล่าวถึงบทบาทของ HMGB1 ทั้งแง่ในการส่งเสริมและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (15) ดังนั้นการศึกษากลไกในการควบคุมการแสดงออกของ HMGB1 จากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีภายหลังจากการกระตุ้นด้วยยาเคมีบำบัดจึงเป็นหัวข้อสำคัญที่จะทำให้เข้าใจในบทบาทของ HMGB1 และ DAMPs ชนิดอื่นๆต่อการเกิดมะเร็ง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของยาเคมีบำบัดต่อปริมาณและการแสดงออกของ DAMPs ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี Kku-213L5 ด้วย Gemcitabine พบการแสดงออกของ HMGB1 จากน้ำเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว โดยพบว่ายา Oxaliplatin กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ HMGB1 มากที่สุด รองลงมาเป็น Gemcitabine และ Cisplatin ตามลำดับ

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้อาจนำไปสู่แนวทางในการเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเป็นแนวคิดในการศึกษาผลของยาเคมีบำบัดต่อกลไกในการแสดงออกของ HMGB1 และ DAMPs ชนิดอื่นต่อไป



เอกสารอ้างอิง

1. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinsn SD, Khan SA. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2020;72(1):95-103.
2. Alsaleh M, Leftley Z, Barbera TA, Sithithaworn P, Khuntikeo N, Loilome W, et al. Cholangiocarcinoma: a guide for the nonspecialist. *Int J Gen Med.* 2019;12:13-23.
3. Cai WK, Sima H, Chen BD, Yang GS. Risk factors for hilar cholangiocarcinoma: a case-control study in China. *World J Gastroenterol,* 2011;17(2):249-53.
4. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut.* 2012;61(12):1657-69.
5. American cancer society [homepage on the Internet]. Chemotherapy [updated 2018 July 3; cited 2020 May 9]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/bile-duct-cancer/treating/chemotherapy.html>.
6. Valle J WH, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *NEJM.* 2020;362(5):1273-1281.
7. De sousa cavalcante L., Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:8-16.
8. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
9. Alcindor T. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology.* 2011;18:18-25
10. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.*2006;11(4):342-57.
11. Wang X, Li M, Wang J, Yeung CM, Zhang H, Kung HF, et al. The BH3-only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(11):1540-50.

12. Yong-Xian G, Xiao-Huan L, Fan Z, Guo-Fang T. Gemcitabine inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(Supplement):1-4.
13. Al-Bahlani S, Fraser M, Wong AY, Sayan BS, Bergeron R, Melino G, et al. P73 regulates cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism. *Oncogene.* 2011;30(41):4219-30.
14. Krysko O, Love Aaes T, Bachert C, Vandenabeele P, Krysko DV. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2013;4:1-7.
15. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene.* 2016;35(46):5931-41.
16. Timmermans K, Leijte GP, Kox M, Scheffer GJ, Blijlevens NMA, Pickkers PP. Release of Danger-Associated Molecular Patterns following chemotherapy does not induce immunoparalysis in leukemia patients. *Acta Haematol.* 2017;138(1):39-43.
17. Anunobi R, Boone BA, Cheh N, Tang D, Kang R, Loux T, et al. Extracellular DNA promotes colorectal tumor cell survival after cytotoxic chemotherapy. *J Surg Res.* 2018;226:181-91.
18. Zhang X, Wang D, Li Z, Jiao D, Jin L, Cong J, et al. Low-dose gemcitabine treatment enhances immunogenicity and natural killer cell-driven tumor immunity in lung cancer. *Front Immunol.* 2020;11:331-14.
19. Cholangiocarcinoma foundation [homepage on the Internet]. What is cholangiocarcinoma (bile duct cancer)? 2006-2021. [cited 2020 May 20] Available from: <https://cholangiocarcinoma.org/defined/>.
20. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, Zampino MG, Gatta G, Heinemann V. Cholangiocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;69(3):259-70.
21. Public Health England. National cancer intelligence network rare and less common cancers, 2010-2013. Wellington house (London); 2015.
22. Shaib Y, & El-Serag, H. The Epidemiology of Cholangiocarcinoma. *Seminars in liver disease.* 2004;24(2):115-125.
23. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int.* 2019;39(1):19-31.

24. Consiglia M, Bragazzi F, Overi D, Venere R, Carpino G, Gaudio E, et al. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors, *Int. J. Mol. Sci.* 2011;22:5613-16.
25. S Vichasri W, E S Upatham. *Opisthorchis viverrini* : intensity and rates of infection in cyprinoid fish from an endemic focus in Northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1982;13(1):138-41.
26. Ziegler AD, Petney TN, Grundy-Warr C, Andrews RH, Baird IG, Wasson RJ, et al. Dams and disease triggers on the lower Mekong river. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(6):e2166.
27. Mekong river commission [homepage on the Internet]. Water Resources and Poverty Alleviation in the Lower Mekong Basin, [updated 2004 Nov 18; cited 2020 May 25]. Available from: http://archive.iwlearn.net/mrcmekong.org/MRC_news/speeches/18nov04_keynote.htm?fbclid=IwAR1gMdQn4xZ0A55MhQc0nICUofsOdYclpLo_VxBtRGvsCZ7y7x0ICu5wac.
28. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24(3):349-56.
29. Nationalcancer institute [homepage on the Internet]. Types of Cancer Treatment [cited 2020 May 25] Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>
30. Martinho N, Santos TCB, Florindo HF, Silva LC. Cisplatin-membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity. *Front Physiol.* 2018;9:1898-5.
31. Alcindor T. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology.* 2011;18:18-25
32. Buss I, Hamacher A, Sarin N, Kassack MU, Kalayda GV. Relevance of copper transporter 1 and organic cation transporters 1-3 for oxaliplatin uptake and drug resistance in colorectal cancer cells. *Metallomics.* 2018;10(3):414-25.
33. Hou W, Zhang Q, Yan Z, Chen R, Zeh lii HJ, Kang R, et al. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death Dis.* 2013;4:966-2.
34. Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med.* 2019;23(8):4854-65.

35. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol.* 2011;12(8):715-23.
36. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet.* 2001;357(9255):539-45.
37. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:51-72.
38. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity.* 2013;39(1):74-88.
39. Hou W, QZ, ZY, R Chen, HJ Zeh III, RK, ML, D Tang. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death and Disease.* 2013, 2013;4:966-2.
40. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:139-62.
41. R. Kokkola AA, G. Mullinsz, T. Östberg, C.J. Treutigerz, B. Arnold\$, P. Nawroth\$, U. Andersson. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol.* 2005 jan; 61(1):1-9.
42. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003;101(7):2652-60.
43. Schiraldi M, Raucci A, Munoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, et al. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med.* 2012;209(3):551-63.
44. Yang H, Wang H, Ju Z, Ragab AA, Lundback P, Long W, et al. MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *J Exp Med.* 2015;212(1):5-14.
45. Venereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol.* 2015;6:422-5
46. ThermoFisher [homepage on the Internet]. Basic cell culture techniques for consistent results [cited 2020 may 20]. Available from : <https://www.thermofisher.com/th/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.htm?cid=fl-cellculturebasics>.

47. Williams KJ, Picus J, Trinkhaus K, Fournier CC, Suresh R, James JS, et al. Gemcitabine with carboplatin for advanced biliary tract cancers: a phase II single institution study. *HPB (Oxford)*. 2010;12(6):418-26.
48. Liu Y, Yan W, Tohme S, Chen M, Fu Y, Tian D, et al. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J Hepatol*. 2015;63(1):114-21.
49. Sharkey FH, Banat IM, Marchant R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(7):3795-806.
50. Kasikova L, Truxova I, Cremer I, Sautes-Fridman C, Kepp O, Kroemer G, et al. Side-by-side comparison of flow cytometry and immunohistochemistry for detection of calreticulin exposure in the course of immunogenic cell death. *Methods Enzymol*. 2020;632:15-25.
51. Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death & Disease*. 2020;11(11):13-4
52. Rodriguez-Salazar MDC, Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Martinez-Torres AC, Zapata-Benavides P, Lopez-Gonzalez JS, et al. The novel immunomodulator immunepotent CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncol Lett*. 2017;14(1):8-2
53. Wen Q, Liu J, Kang R, Zhou B, Tang D. The release and activity of HMGB1 in ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;510(2):278-83.
54. Wong SL, To J, Santos J, Allam V, Dalton JP, Djordjevic SP, et al. Proteomic analysis of extracellular HMGB1 identifies binding partners and exposes its potential role in airway epithelial cell homeostasis. *J Proteome Res*. 2018;17(1):33-45.
55. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13(9):1050-9.
56. Pasi F, Paolini A, Nano R, Di Liberto R, Capelli E. Effects of single or combined treatments with radiation and chemotherapy on survival and danger signals expression in glioblastoma cell lines. *Biomed Res Int*. 2014;2014:453497.

57. Nadin SB, Sottile ML, Montt-Guevara MM, Gauna GV, Daguerre P, Leuzzi M, et al. Prognostic implication of HSPA (HSP70) in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(4):493-505.
58. Leijte GP, Custers H, Gerretsen J, Heijne A, Roth J, Vogl T, et al. Increased Plasma Levels of Danger-Associated Molecular Patterns Are Associated With Immune Suppression and Postoperative Infections in Patients Undergoing Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:663.
59. Jiraviriyakul A, Songjang W, Kaewthet P, Tanawatkitichai P, Bayan P, Pongcharoen S. Honokiol-enhanced cytotoxic T lymphocyte activity against cholangiocarcinoma cells mediated by dendritic cells pulsed with damage-associated molecular patterns. *World J Gastroenterol*. 2019;25(29):3941-55.
60. Hubin Yin XY, Xin Zhu, Yong Tao, Xin Gou¹, Wen Gu¹, Yan Liu, Xinyuan Li, and Weiyang He, Xiaolong Huang. HMGB1-mediated autophagy attenuates gemcitabine-induced apoptosis in bladder cancer cells involving JNK and ERK activation. *Oncotarget*. 2017;8:71642-3.
61. Zhang YX, Yuan YQ, Zhang XQ, Huang DL, Wei YY, Yang JG. HMGB1-mediated autophagy confers resistance to gemcitabine in hormone-independent prostate cancer cells. *Oncol Lett*. 2017;14(5):6285-90.
62. Zhang Y, Cheng Y, Ren X, Zhang L, Yap KL, Wu H, et al. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response. *Oncogene*. 2012;31(8):1055-64.
63. Fang H, Ang B, Xu X, Huang X, Wu Y, Sun Y, et al. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(2):150-9.
64. Xia J, Yu X, Song X, Li-G, Mao X, Zhang Y. Inhibiting the cytoplasmic location of HMGB1 reverses cisplatin resistance in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep*. 2017;15(1):488-94.
65. Song Y, Zou X, Zhang D, Liu S, Duan Z, Liu L. Self-enforcing HMGB1/NF-kappaB/HIF-1alpha Feedback Loop Promotes Cisplatin Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells. *J Cancer*. 2020;11(13):3893-902.

66. Liu W, Zhang Z, Zhang Y, Chen X, Guo S, Lei Y, et al. HMGB1-mediated autophagy modulates sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin via MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(4):511-7.
67. Huang WS, Lin CT, Chen CN, Chang SF, Chang HI, Lee KC. Metformin increases the cytotoxicity of oxaliplatin in human DLD-1 colorectal cancer cells through down-regulating HMGB1 expression. *J Cell Biochem*. 2018;119(8):6943-52.
68. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*. 2010;29(4):482-91.
69. เอี่ยมแซ สุขประเสริฐ. การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดสำหรับมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่สามารถผ่าตัดได้และระยะแพร่กระจาย. *วารสารศรียศนวิทย์เวชสาร*. 2555;27:351-355
70. Smith JA, Brown J, Martin MC, Ramondetta LM, Wolf JK. An in vitro study of the inhibitory activity of gemcitabine and platinum agents in human endometrial carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol*. 2004;92(1):314-9.
71. Sawasdee N, Thepmalee C, Sujjitjoo J, Yongpitakwattana P, Junking M, Pongvarin N, et al. Gemcitabine enhances cytotoxic activity of effector T-lymphocytes against chemo-resistant cholangiocarcinoma cells. *Int Immunopharmacol*. 2020;78:106006.
72. Li B, Song TN, Wang FR, Yin C, Li Z, Lin JP, et al. Tumor-derived exosomal HMGB1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through inducing PD1(+) TAM expansion. *Oncogenesis*. 2019;8(3):17.
73. Xu YF, Ge FJ, Han B, Yang XQ, Su H, Zhao AC, et al. High-mobility group box 1 expression and lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015;21(11):3256-65.
71. Sawasdee N, Thepmalee C, Sujjitjoo J, Yongpitakwattana P, Junking M, Pongvarin N, et al. Gemcitabine enhances cytotoxic activity of effector T-lymphocytes against chemo-resistant cholangiocarcinoma cells. *Int Immunopharmacol*. 2020;78:106006.
72. Li B, Song TN, Wang FR, Yin C, Li Z, Lin JP, et al. Tumor-derived exosomal HMGB1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through inducing PD1(+) TAM expansion. *Oncogenesis*. 2019;8(3):17.

73. Xu YF, Ge FJ, Han B, Yang XQ, Su H, Zhao AC, et al. High-mobility group box 1 expression and lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21(11):3256-65.





The role of immunogenic cell death in gastrointestinal cancer immunotherapy (Review)

WORAWAT SONGJANG^{1,2}, CHATCHAI NENSAT³, SUTATIP PONGCHAROEN⁴ and ARUNYA JIRAVIRIYAKUL^{1,2}

¹Department of Medical Technology; ²Integrative Biomedical Research Unit (IBRU); ³Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences; ⁴Division of Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Received April 23, 2021; Accepted July 30, 2021

DOI: 10.3892/br.2021.1462

Abstract. Modern cancer immunotherapy techniques are aimed at enhancing the responses of the patients' immune systems to fight against the cancer. The main promising strategies include active vaccination of tumor antigens, passive vaccination with antibodies specific to cancer antigens, adoptive transfer of cancer-specific T cells and manipulation of the patient's immune response by inhibiting immune checkpoints. The application of immunogenic cell death (ICD) inducers has been proven to enhance the immunity of patients undergoing various types of immunotherapy. The dying, stressed or injured cells release or present molecules on the cell surface, which function as either adjuvants or danger signals for detection by the innate immune system. These molecules are now termed 'damage-associated molecular patterns'. The term 'ICD' indicates a type of cell death that triggers an immune response against dead-cell antigens, particularly those derived from cancer cells, and it was initially proposed with regards to the effects of anticancer chemotherapy with conventional

cytotoxic drugs. The aim of the present study was to review and discuss the role and mechanisms of ICD as a promising combined immunotherapy for gastrointestinal tumors.

Contents

1. Introduction
2. GI cancers
3. Immunotherapy in GI cancers
4. Vaccine therapy in GI cancers
5. Cancer vaccination is the target of ICD
6. Checkpoint inhibitor therapies in GI cancers
7. Induction of ICD sensitizes blockade inhibitor therapies
8. Adoptive therapies in GI cancer
9. Implications of ICD and adoptive cell transfer
10. Conclusions

1. Introduction

Modern cancer immunotherapy has been proposed to involve four primary promising strategies: i) Active vaccination of tumor antigens, ii) passive vaccination with antibodies specific to cancer antigens, iii) adoptive transfer of cancer-specific T cells, and iv) manipulation of the patient's immune response by inhibiting immune checkpoints. Additional emerging strategies include other antigen-non-specific interventions, including the applications of oncolytic or immune-enhancing viruses, innate immunity stimulators and immunogenic cell death (ICD) inducers (1). The focus of the present review was to describe the treatments that employ ICD to enhance the immunity of patients with gastrointestinal (GI) cancers.

The daily death of billions of ordinary cells from the human body goes essentially unrecognized by the immune system. This is crucial since the conservation of the entire bodies homeostasis includes the continuous turnover of various cell compartments. As such, the initiation of an immune response against dead-cell antigens would have detrimental outcomes. Conversely, the death of a few cells infected by a microorganism can trigger a potent antigen-specific immune reaction, which is associated with the clearance of the invading pathogen from the body and also enables the establishment of long-term

Correspondence to: Dr Arunya Jiraviriyakul, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, 99 Moo 9 Phitsanulok-Nakhonsawan Road, Tha Pho Subdistrict, Mueang, Phitsanulok 65000, Thailand
E-mail: arunyaj@nu.ac.th

Abbreviations: PC, pancreatic cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; CRC, colorectal cancer; GC, gastric cancer; ICD, immunogenic cell death; HMGB1, high mobility group box 1; CRT, calreticulin; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; DC, dendritic cell; NK cells, natural killer cells; Treg, regulatory T cell; CTL, cytotoxic T lymphocyte; TLR, Toll-like receptor; PD-1, programmed death 1; PD-L1, programmed death ligand 1; CY, cyclophosphamide; FOLFOX, oxaliplatin, 5-FU and leucovorin; FOLFOXIRI, FOLFOX and irinotecan; 5-FU, 5-fluorouracil; HSP, heat shock protein; CBP, calmodulin-binding peptide; NIR-PIT, near-infrared photoimmunotherapy; CTLA-4, CTL-associated protein 4; eIF2a, eukaryotic translation initiation factor 2A

Key words: immunogenic cell death, gastrointestinal cancer, immunotherapy, immune response

immunological memory (2). The first proposal of the 'danger theory' in 1994 by Matzinger (3) was that the immune system can distinguish between dangerous and innocuous endogenous signaling. In her famous essay, Matzinger suggested that 'unprogrammed cell death' could give rise to the unusual release of internal molecules from the cytoplasm, nucleus or membrane to activate dendritic cells (DCs). The dying, stressed or injured cells release or present molecules on the cell surface, which can function as either adjuvants or danger signals for detection by the innate immune system. These molecules are now termed 'damage-associated molecular patterns' (DAMPs) (4). The term 'ICD' was introduced to indicate a type of cell death that triggers an immune response against dead-cell antigens, particularly those derived from cancer cells, including DAMPs. This model was initially proposed with regard to anticancer chemotherapy, in view of clinical proof demonstrating that tumor-specific immune responses reflect the efficacy of anticancer treatments using conventional cytotoxic drugs (5).

Currently, various routinely employed anticancer agents include doxorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantrone, bleomycin, bortezomib, cyclophosphamide (CY) and oxaliplatin. The list also includes certain anticancer agents that are currently under preclinical or clinical development, such as some microtubular inhibitors of the epothilone family. Certain drugs, including digoxin, digitoxin and zoledronic acid, act to convert otherwise non-immunogenic events of cell death into *bona fide* ICD inducers, and may thus be used as adjuvants in combinatorial immunotherapy regimens (6). The known clinically applied or experimental anticancer agents that induce ICD act via one or several of the following mechanisms: Inducing apoptosis, causing a severe focused stress of the endoplasmic reticulum, overcoming loss-of-function mutations that hide danger signals during tumorigenesis and downregulating the cancer-based induction of pro-inflammatory transcription factors (4). In addition, one important consideration is the complex interactions with DAMPs and their receptors, known as the pattern recognition receptors. Attempts have been made to identify and detect multiple DAMPs in order to facilitate the development of next-generation anticancer regimens, which, in addition to killing cancer cells, can simultaneously convert them into a cancer-specific therapeutic vaccine (7).

2. GI cancers

GI cancers are amongst the malignancies most frequently diagnosed in European patients. These include gastric cancer (GC), colorectal cancer (CRC), as well as cancers affecting the liver, particularly hepatocellular carcinoma (HCC), the biliary tract, such as cholangiocarcinoma (CCA), and the pancreas (pancreatic cancer; PC). The frequency with which these conditions are diagnosed presents a significant challenge for public health systems in Europe and worldwide (8).

Different cancers of the GI tract. Most commonly reported in patients in Asia, GC is notable for its particularly poor survival rates. The condition is associated with certain bacterial infections, such as *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection, and the effects of other pathogens, including Epstein-Barr virus (9).

The annual number of new CRC diagnoses falls in the range of 1-2 million cases, placing CRC third in terms of the most frequently occurring cancers, and fourth amongst the most common causes of cancer-related mortality. The main CRC risk factors include age and history of chronic disease, as well as various aspects of patient lifestyles. There are three different pathogenic mechanisms that can lead to the onset of CRC: Microsatellite instability, chromosomal instability and a CpG island methylator phenotype (10,11).

The most common type of liver cancer is HCC, which originates from hepatocytes and accounts for ~4 in 5 liver cancer diagnoses, with an increased prevalence in China and Eastern Africa (12). The onset of HCC is often a consequence of the interaction between genetic characteristics and environmental factors. In particular, patients diagnosed with liver cirrhosis, or infection with the hepatitis B virus (HBV) or the hepatitis C virus (HCV), are more likely to develop HCC, while other risk factors include alcohol abuse, the ingestion of aflatoxin B1 or non-alcoholic steatohepatitis (13,14).

CCA is the second most frequently occurring primary hepatic cancer after HCC. CCA has been most commonly reported across Asia, although in recent years it has become increasingly more widespread in North America and Europe (15,16). CCA originates in the biliary tract and is subdivided by location into three different subtypes, namely perihilar, intrahepatic and distal CCA. Several risk factors, both common and rare, have been associated with CCA, including hepatobiliary parasites, Caroli disease, HBV and HCV infection, and exposure to toxins (17-19).

PC is the 14th most prevalent type of cancer and the seventh largest cause of annual cancer-associated deaths globally. PC risk factors include obesity, alcohol consumption and smoking, as well as *H. pylori* infection (20).

Latest approaches to GI cancer treatment. Several potential treatments are currently being developed for GI cancers. A number of these are targeted approaches that make use of biological properties to achieve their objectives, and can be employed alone or as components of combination or adjuvant treatments. The most widely applied treatments at present include surgery, as a means of resecting solid tumors; radiation therapy, as a means of managing localized solid tumors; chemotherapy, which involves the use of cytotoxic agents to eliminate cancerous cells; and hormonal therapy, which serves as a systematic approach with the aim of targeting all cancerous cells found in the body (21-23).

3. Immunotherapy in GI cancers

Patients diagnosed with GI cancers are typically subjected to a combination of treatments, including surgery, chemotherapy and/or radiation therapy; however, the survival rates remain poor, particularly when the cancer has reached an advanced stage, or in the case of metastatic disease (24,25). For this reason, it is imperative to develop more effective, novel techniques to address the problem, and immunotherapy appears to hold promise for this purpose. To date, a number of cytokines, including IFN- γ or IL-2, have been used to limit the activity of certain types of cancer, such as renal cell carcinoma and melanoma, and a moderate level of inhibitory activity has been reported (26). However,

the development of cancer vaccines has been less successful, with none generating statistically significant responses in test patients (23).

The progress in immunotherapy shows great potential in the context of GI cancers, whereas further therapies involving the administration of immunostimulatory monoclonal antibodies to treat GI malignancies are currently in their developmental phase. Immune checkpoint blockade is the primary type of immunotherapy currently used in GI cancer treatment. It can be anticipated that the vaccination approach will be streamlined with the lessons learned from initial successes, and the most suitable tumor-associated antigens will be identified for targeting. Adoptive cell therapies are now at an advanced stage of development and appear to hold significant promise for GI cancers. An improved understanding of the prevalent suppressive factors in patients with GI cancers may enable the development of superior strategies to limit immune suppression and promote endogenous immunity in patients. It is likely that deeper knowledge of the tumor microenvironment and the field of immunology will lead to the successful development of more efficacious treatments in the near future.

4. Vaccine therapy in GI cancers

Various cancer vaccines have been developed to date by using different technologies, including recombinant microorganisms, recombinant antigen cocktails, oncolytic viruses, DNA and gene therapy-based treatments, and anti-idiotypic antibodies. In addition, personalized vaccines have also been devised, including those based on adoptive cell transfer, or autologous cells and antigens. These may be more complex, and require specialized manufacturing approaches and expertise (27). However, although several trials have been conducted, approval has only been granted for one vaccine, which acts against metastatic castration-resistant prostate cancer. This vaccine is Dendreon's Provenge® (Sipuleucel-T), which was approved by the Food and Drug Administration in 2010 (28,29). Furthermore, two additional cancer vaccines, Vitespen® (30) and Melacine® (31), were approved in Russia and Canada, but not in the United States. These cancer vaccines rely upon the activation and strengthening of antitumor responses that target cancer. The dendritic cell-based cancer vaccine presents antigens and serves a critical role in formulating the immune response. They can also activate B cells, natural killer (NK) cells, as well as naïve and memory T cells, through the presentation of tumor antigens associated with major histocompatibility complex (MHC) molecules. When patients with cancer have higher numbers of DCs penetrating the tumors, this is a sign of reduced lymph node metastases and improved chances of survival (32). A number of approaches have been employed to create vaccines by loading DCs with tumor antigens. These include the use of synthetic peptides pulsed on DCs (33), DCs engineered with plasmid DNA (34), RNA (35) or viruses (36), tumor cell lysates combined with immature DCs (37) and, finally, DCs combined with whole tumor cells through polyethylene glycol or electroporation (38). The technique that uses DCs pulsed with MHC-restricted peptides, which are obtained from antigens known to be associated with tumors, is the most common type of vaccine approach (39-41). However, it can be challenging to use DCs for clinical

purposes, as these cells have a relatively short life span (42). To date, vaccines have shown little effectiveness in preventing GI cancers. The vaccines developed thus far have targeted melanoma-associated antigen (MAGE)-A3 (43), HER2 p369 peptide (44), gastrin-17 diphtheria toxoid (45), URLC10 or VEGFR1 epitopes (46) and heat shock protein (HSP) gp96 (47) in patients with GI cancers. Furthermore, chemotherapy has been tested alongside adjuvant Bacillus Calmette-Guérin (48). In cases of PC, a number of specific antigens serve as targets, including carcinoembryonic antigen (CEA), EGFR, Wilms' tumor 1 and VEGF, whereas GVAX® is a whole-cell vaccine that has been tested in trials in the metastatic, neoadjuvant and adjuvant settings. Positive outcomes have been reported in the metastatic setting when combined with ipilimumab, with a reported survival rate of 27% after 1 year (49).

In the case of HCC, vaccines have shown no efficacy thus far. However, immune responses have been reported in phase I trials involving peptide vaccines (50), DC vaccines and tumor-associated antigens targeting oncolytic viruses, such as AFP (51), GPC-3 (52) and human telomerase reverse transcriptase (53). DC-based vaccines have been included in trials on CCA, whereas a phase II study was conducted in the adjuvant setting in order to target mucin 1 (MUC1) in the biliary tract and in PC via DC vaccination, and the tolerability was reported to be good, although it was not possible to draw definitive conclusions regarding the immune response (54). Further phase II clinical trials involving CRC-specific peptide vaccines were performed with patients diagnosed with HLA-A*2402-positive stage III CRC, with the findings suggesting that an immune response would be generated by the vaccine, leading to higher survival rates (55). For patients with PC, 13-mer mutant ras peptide vaccines were not only shown to be safe, but to also generate the appropriate immune response (56). Additionally, the p53 synthetic long peptide vaccine has been shown to be safe for patients with metastatic CRC in whom specific T-cell responses were induced (57). However, several issues must be addressed if a novel cancer vaccine is to be approved, including commercial, clinical, manufacturing, operational and regulatory concerns. Risk evaluation must also be conducted to make full use of the expertise available. Moreover, a number of clinical studies revealed that some patients may not benefit from the cancer vaccine treatment (primary resistance), and some responders may relapse after a period of response (acquired resistance). For example, PC is associated with the presence of a highly immunosuppressive microenvironment, which is characterized by a dense desmoplastic stroma that impedes blood flow to the area, inhibits drug delivery and suppresses antitumor immune response (58). In CRC and GC, it has been shown that only patients with the subset of mismatch-repair-deficient or microsatellite instability-high tumors are likely to respond to immunotherapy (59,60). Once these issues have been addressed, ICD may prove to be the answer for vaccine development.

5. Cancer vaccination is the target of ICD

DC maturation is a crucial step for immune activation. Once in the lymph nodes, DCs activate T cells via three canonical signals: Binding of T-cell receptors, co-stimulatory receptor

engagement, and the provision of cytokines and chemokines to facilitate T-cell polarization and differentiation. The ICD complementarily activates DCs. High mobility group box 1 (HMGB1) and HSP activate pro-inflammatory DCs through the Toll-like receptor (TLR)2/4-MyD88-NF- κ B signaling pathway (61). Moreover, dying cancer cells also express calreticulin (CRT) on their plasma membrane, which signals to facilitate engulfment by DCs. The exposed CRT on the cell membrane can bind to CD91, the low-density lipoprotein-receptor-related protein 1, which promotes the engulfment of cellular compartments and debris by a mechanism that depends on the Rac family small GTPase 1 (61). Hence, the original concept for using the combination treatment of ICD stimulation and DC-based anticancer vaccines originated from significant evidence that cancer treatments, such as chemotherapy, radiation, phototherapy, phytotherapy and immunotherapy, could elicit danger signals from dying cancer cells. Notably, chemoradiotherapy is known to elevate serum HMGB1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma, and the levels of HMGB1 were found to be positively correlated with patient survival (62). Moreover, oxaliplatin and mitoxantrone induced cancer cell death accompanied by an exposure of CRT and a release of HMGB1, HSP70 and ATP, thereby strongly inducing *in vitro* immune responses of DCs (63,64). Interestingly, it has been demonstrated that pretreatment with the oxaliplatin nanoparticle followed by a rechallenge by tumor inoculation in PC-bearing mice can enhance therapeutic efficacy by increasing the numbers of tumor-infiltrating activated cytotoxic T cells (64). In addition to the use of chemotherapy, botanical cancer therapy has also been introduced. Treatment with *Hemidesmus indicus* was shown to induce CRC cell apoptosis characterized by surface expression of CRT, increased HSP70 expression, and a release of ATP and HMGB1. This immunogenic agent is promising when combined with a DC-based anticancer vaccine (Table I) (65). Recently, our group demonstrated that a potent bioactive compound, honokiol, can induce CCA cell apoptosis, which is associated with the release of HMGB1 and HSP90. Incubation of DCs with CCA cells that were pretreated with honokiol induced DC maturation, and thus enhanced the priming of cytotoxic T cells to kill cancer cells (37). Therefore, the priming of DCs with immunogenic agents may maximize antitumor responses through DC stimulation.

Radiation as a cancer treatment also induces ICD, which may pave the way for anticancer vaccines in such patients. For example, in large orthotopic HCC, synergistic antitumor effects may be obtained when radiation is combined with the administration of IL-12. This has been shown to be associated with the activation of tumor-infiltrating DCs, CD8⁺ T cells and NK cells, as well as the suppression of tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (66). Similar to radiation, phototherapy has been suggested to be a new platform for enhancing the immunogenicity of cancer. Photodynamic and photothermal therapies proficiently promote immunotherapy via the induction of ICD. In addition, phototherapy combined with oxygenation boosters can promote CRC cell apoptosis and induce ICD, thus facilitating DC maturation and inhibiting tumor growth and recurrence in animal models (67). Plasma-treated PBS, which is physical cold atmospheric plasma consisting of reactive oxygen and

nitrogen species, has demonstrated cytotoxic activity against PC cells with immunogenic features. This increases the potential of phagocytosing DCs and DC maturation, which may hold promise for combinations with DC cancer vaccines (68).

Several clinical studies have corroborated the concept that ICD-inducing pretreatment may act as an immunomodulator (Table I). There are ~50 trials currently investigating the benefit of ICD in vaccines against cancer, mostly PC and CRC. A phase I/II trial study, in which 22 patients with HCC have been enrolled, is investigating treatment interventions comprising pre-infusion of CY and vaccination using a multi-peptide-based HCC vaccine (IMA970A) plus CV8102 adjuvant (RNAdjuvant[®]). This trial is investigating whether IMA970A and CV8102 are safe and whether they can trigger an immune response against the tumor under pre-conditioning by induction of ICD (NCT03203005). Moreover, mFOLFOX6, which is a formulation of 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin and oxaliplatin, has been used in combination with nivolumab and vaccination with a CV301 peptide vaccine in patients with advanced CRC (NCT03547999). Another clinical trial including patients with PC used CY followed by vaccination with a GVAX peptide cancer vaccine. However, pretreatment with CY did not improve overall survival or disease-free survival when compared with the uncombined intervention (NCT00727441). Collectively, the majority of preclinical and clinical data have demonstrated that combining the immunogenic potential of ICD with cancer vaccination is a promising approach that could achieve future translational success.

6. Checkpoint inhibitor therapies in GI cancers

The field of immuno-oncology has witnessed significant advances with regard to immune checkpoint inhibitors (ICIs). Immune checkpoints are the mechanisms through which T-cell immune responses are regulated (69). Tumor cells are considered to be able to avoid host immune clearance when T-cell immune responses are downregulated. If immune checkpoints can be targeted, the endogenous response of the immune system to tumors may be used as a means of addressing the risk of disease. A number of antibodies have been shown to be effective against immune checkpoints, and more are under examination (69). These antibodies most commonly serve to target cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), programmed death-1 (PD-1) and programmed death-ligand 1 (PD-L1). CTLA-4 acts as a receptor capable of inhibiting the activation of T cells (70). Accordingly, when CTLA-4 is blocked, the T cells will proliferate and become activated. PD-1 is expressed on T cells and other immune cells, and PD-L1 serves as one of its ligands. PD-1 and PD-L1 binding creates an inhibitory signal affecting T cells; by contrast, if the binding is inhibited, the T cells will become activated, leading to a heightened response from cold tumor (non-inflammatory T-cell) to hot tumor (inflammatory T-cell) immune response (71-73). Another targeted checkpoint receptor protein is the lymphocyte activation gene-3, which may control the activity of T cells through its binding with MHC class II-molecules (74). However, earlier studies examining such checkpoint inhibitors in CRC were not very successful, phase II trials involving the CTLA-4 inhibitor, tremelimumab, in patients diagnosed with metastatic CRC have shown no significant levels of efficacy (75,76).

Table I. List of studies on immunotherapies associated with ICD in gastrointestinal cancers.

Type of therapy	Type of cancer	ICD inducer	Treatment condition	Summary of results	Reference/NCT
DC-based anticancer vaccine	PC	Encapsulated oxaliplatin induced exposure of CRT and release of HMGB1 HSP70 and ATP	Vaccination with oxaliplatin-treated cancer cells and subsequent rechallenge with tumor inoculation	Enhanced the therapeutic efficacy by increasing tumor-infiltrating cytotoxic T cell numbers	(64)
	HCC	Radiation	Combination treatment of radiation and IL-12 in an orthotopic tumor model	Inhibited tumor growth by activation of DCs, tumor-infiltrating CD8 ⁺ T cells and NK cells, and suppression of tumor-infiltrating MDSCs	(66)
	CCA	Honokiol induced release of HMGB1 and HSP90	Culture of DCs with honokiol-treated CCA cells, and subsequently priming with T lymphocytes for cancer cell killing <i>in vitro</i>	Honokiol-treated CCA cells induced DC maturation and type I IFN production and enhanced cancer cell killing by effector T lymphocytes	(37)
	CRC	Phototherapy induced CRT exposure and release of ATP	Combination treatment of phototherapy and oxygenation booster in tumor-bearing mice	Facilitated DC maturation and inhibited tumor growth and recurrence	(67)
	CRC	S-1/CPT-11 chemotherapy	Phase I trial to evaluate the safety and immune response of RNF43-721 peptide vaccine combined with chemotherapy	No results yet	NCT00641615
	HCC	CY	Phase I/II vaccination of multi-peptide-based HCC vaccine plus adjuvant by a single pre-vaccination of low-dose (CY) in patients with very early, early, intermediate stage HCC	No results yet	NCT03203005
	CRC	mFOLFOX6	Phase II trial of perioperative CV301 vaccination in combination with nivolumab and systemic chemotherapy for metastatic CRC	No results yet	NCT03547999
	GC or gastroesophageal cancer	Cisplatin and 5-FU	Phase III trial of G17T immunogen in combination with chemotherapy in patients with metastatic or locally recurrent cancer	No results yet	NCT00020787
	PC	CY	Phase II study by pretreatment with CY before injecting with GVAX peptide cancer vaccine	Overall survival of 34.2, 15.4 and 16.5 months, and disease-free survival of 18.92, 8.54 and 5.56 months for GVAX without CY, GVAX with intravenous CY and GVAX with p.o. CY, respectively	NCT00727441

Table I. Continued.

Type of therapy	Type of cancer	ICD inducer	Treatment condition	Summary of results	Reference/NCT
Immune checkpoint blockade	CRC	Cisplatin and CBP501 induced cell surface exposure of CRT and release of HMGB1	Combination treatment with cisplatin, CBP and anti PD-1 or PD-L1	CBP501 enhanced cisplatin-induced ICD and increased the efficacy of immune checkpoint inhibitors against tumors in mice	(80)
Immune	CRC	PARP and PI3K inhibitors induced exposure of CRT on cell membrane	Nano-formulation of PARP and PI3K inhibitors combine with X-ray irradiation and anti-CTLA-4 immunotherapy	PARP and PI3K inhibitors sensitized efficacy of anti-CTLA-4 by improved tumor control and increased tumor infiltrating lymphocytes	(81)
	CRC	Lurbinectedin induced exposure of CRT, release of ATP, release of HMGB1 and type I IFN responses	Combination treatment of lurbinectedin and immune checkpoint blockade	Strong antitumor response as both prophylaxis and therapy in a cancer-bearing mouse model	(123)
	CRC	NIR-PIT induced release of cellular ATP and HMGB1	CD44-targeted NIR-PIT combined with CTLA4 or PD-1 blockade	Combination of NIR-PIT with antibody blockade showed greater tumor inhibition with prolong survival	(83)
	CRC	Trifluridine/tipiracil plus oxaliplatin induced surface CRT exposure, cIF2 α -dependent endoplasmic reticulum stress, HMGB1 and ATP release	Trifluridine/tipiracil plus Oxaliplatin combined anti PD-1 antibody	Combination treatment enhanced the antitumor efficacy via elimination of type-2 tumor-associated macrophages	(124)
	HCC	Oxaliplatin elicited cell surface exposure of CRT and release of HMGB1	Combination treatment with oxaliplatin and anti-PD-1	Combination therapy with oxaliplatin and anti-PD-1 inhibited tumor growth, activated CD8 ⁺ T-cell expansion and DC maturation	(82)
	CRC	FOLFOXIRI	Phase II, FOLFOXIRI plus bevacizumab with atezolizumab treatment for patients with unresectable metastatic CRC	No results yet	NCT03721653
	CRC	FOLFOX	Phase I/II, FOLFOX combination treatment with durvalumab and tremelimumab in patients with metastatic CRC	No results yet	NCT03202758
	GC	5-FU and cisplatin	Phase II, 5-FU and cisplatin combination treatment with pembrolizumab in patients with advanced GC or gastroesophageal junction cancer	Pembrolizumab + 5-FU + cisplatin showed manageable safety and promising antitumor activity	NCT02335411

Table I. Continued.

Type of therapy	Type of cancer	ICD inducer	Treatment condition	Summary of results	Reference/NCT
T-cell adoptive transfer	CRC	Mitochondria-targeted small molecule, IR-780 induced cell surface exposure of CRT and release of HMGB1 and ATP	Combination treatment of cytotoxic T-cell adoptive transfer with IR-780	Improves the inhibitory effect on tumor growth due to DC maturation and synergistic effector T-cell priming and tumor infiltration	(119)

PC, pancreatic cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; CRC, colorectal cancer; GC, gastric cancer; ICD, immunogenic cell death; HMGB1, high mobility group box 1; CRT, calreticulin; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; DC, dendritic cell; NK cells, natural killer cells; Treg, regulatory T cell; TLR, Toll-like receptor; PD-1, programmed death 1; PD-L1, programmed death ligand 1; CY, cyclophosphamide; FOLFOX, oxaliplatin, 5-FU and leucovorin; FOLFIRI, FOLFOX and irinotecan; 5-FU, 5-fluorouracil; HSP, heat shock protein; CBP, calmodulin-binding peptide; NIR-PIT, near-infrared photodynamic therapy; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; eIF2a, eukaryotic translation initiation factor 2A; PARP, poly adenosine diphosphate-ribose polymerase.

As a consequence of tumor heterogeneity, along with the complexity of immunosuppression, treatment of GC, as has been the case with CRC, has shown little success in the area of immunotherapy, for reasons possibly related to mechanisms that are incompletely understood. Previous findings have revealed that a certain level of checkpoint inhibition can be achieved, often in correlation with enhanced classification and characterization of GC and an improved understanding of its histopathology (48). PC presents the greatest challenge amongst all types of GI cancer in the context of immunotherapy, most likely as a result of inadequate immunogenicity, along with a low mutational burden and a unique vascular and stromal microenvironment. These conditions make it very difficult for the immune cells and molecules to penetrate into the tumors, particularly compared with the conditions in other types of cancer (77). If the microenvironment exhibits immunosuppressive qualities, checkpoint inhibition may represent a suitable goal for HCC immunotherapy, although success has been limited to date in the case of single-agent checkpoint blockade (78).

7. Induction of ICD sensitizes blockade inhibitor therapies

In this decade, antibodies directed against immune checkpoints have been intensely investigated in patients with cancer following the discovery by the Nobel prize winners James P. Allison and Tasuku Honjo, who demonstrated that cancer therapy can be enhanced by the inhibition of negative immune regulation (79). CTLA-4 and PD-1 are the receptors that are commonly found on the surface of activated T cells. The interaction of CTLA-4 and PD-1 with their ligands inhibits activated T cells and converts them into exhausted T cells, which abrogates the antitumor response. The targeting of CTLA-4 and PD-1 molecules has demonstrated durable response rates, increased survival time of responders and a manageable safety profile. Recently, checkpoint inhibition plus chemotherapy has been considered for use in the first-line setting for the treatment of CRC (11). The potential clinical responses may be associated with the induction therapy with ICD inducers and cancer immunotherapy.

It has been reported that calmodulin-binding peptide (CBP)501, a CBP that can induce ICD when combined with cisplatin treatment, can induce cell membrane exposure of CRT and the release of HMGB1. Treatment of CRC-bearing mice with CBP501 and cisplatin, and subsequently with anti PD-1 or PD-L1 antibodies, significantly enhanced the antitumor activity of immune blockade via upregulating the percentage of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells (80). Similarly, in CRC-bearing mouse models, the combination treatment of PARP and PI3K inhibitors induced radio-sensitization and the induction of ICD. Thus, subsequent anti-CTLA-4 treatment strongly inhibited tumor growth and increased the numbers of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) (81). The induction treatment of not only CRC, but also HCC, has been investigated using immunogenic chemotherapy, through oxaliplatin promoting the exposure of CRT and the release of HMGB1. In HCC, oxaliplatin combined with anti PD-1 antibodies achieved marked tumor suppression, activation of CD8⁺ T cells and stimulation of DCs (82). Moreover, radiation and phototherapy are additional examples of immunogenic cancer

therapies that sensitize the immune checkpoint blockade. CD44-targeted near-infrared photoimmunotherapy combined with anti CTLA-4 and PD-1 antibodies was shown to inhibit tumor growth and prolong the survival of CRC-bearing mice via a mechanism associated with the induction of ATP and the release of HMGB1 (83).

The ICD inducer-enhancing immune blockade has been proven in several clinical reports (Table I), but has not been well established in GI cancers. Current phase II trials have been investigating the ICD-inducing effect of 5-FU, leucovorin and oxaliplatin (FOLFOX) and FOLFOX plus irinotecan (FOLFOXIRI) to enhance the efficacy of ICIs. Patients with unresectable metastatic CRC have been treated with either FOLFOX/FOLFOXIRI or anti-PD-L1/CTLA-4 antibodies. After each treatment cycle, the safety, disease progression, death and intolerable toxicity will be continuously recorded (84,85). Furthermore, the use of 5-FU and cisplatin is encouraged owing to their safety and strong enhancement of the antitumor response in advanced GC when combined with pembrolizumab (86).

The insight into the mechanism of ICD-sensitized immune blockade inhibitors is under investigation. Two possible effects have been proposed, depending on the type of ICD inducer. The first effect is the direct consequence of the chemotherapeutic agents proficiently upregulating PD-L1 expression. Those that exert this effect include 5-FU, gemcitabine, cisplatin, oxaliplatin, doxorubicin and paclitaxel (87). This is an important method for increasing the sensitivity to blockade inhibitors. Treatment with FOLFOX can activate the secretion of IFN- γ from PD-1⁺ CD8⁺ T cells, which is associated with the over-expression of PD-L1 on tumor cells. Hence, the combination treatment of FOLFOX with anti PD-1/PD-L1 antibodies has achieved complete cure in CRC-bearing mice, while monotherapy was unsuccessful (88). Similarly, the anthracycline drug, epirubicin, could upregulate PD-L1 expression in HCC, which causes sensitization to immune blockade therapy (89). The other effect would be due to the indirect function of ICD inducer agents via modulating the tumor microenvironment. This may be associated with the depletion of regulatory T cells and MDSCs that potentiates stronger antitumor responses (66). Taken together, these results from preclinical and clinical studies have indicated that the concept of priming treatment with ICD inducer agents prior to checkpoint blockade treatment could elicit a stronger antitumor response.

8. Adoptive therapies in GI cancer

A potential approach to cancer treatment is harnessing the properties of T cells and NK cells to attack tumor cells. NK cells and TILs are of both predictive and prognostic value in GI cancers (90). These properties can be applied through the various modalities of adoptive cell therapies, typically involving the isolation of immune cells obtained from patients diagnosed with cancer, whereupon they can be genetically modified in order to strengthen their capacity to identify and kill cancerous cells. By expanding these isolated cells *ex vivo*, they can then be re-introduced to the patient, in a form of treatment which can theoretically be effective for all patients with cancer who do not demonstrate adequate cancer immunity without assistance, and would therefore be incapable of

responding to ICIs. Adoptive cell therapy as a cancer treatment can involve various strategies, which have either been previously examined in clinical settings, or are undergoing trials to assess their suitability against GI cancers (91). One particular approach of adoptive cell therapy makes use of the immunotherapeutic properties of cytokine-induced killer cells (CIK), which can be obtained through the treatment of peripheral blood lymphocytes using IFN- γ . This is a type of monoclonal antibody that counteracts the CD3 molecule, along with IL-2. CIK cells are predominantly expansions of CD3⁺/CD8⁺/CD56⁻ cells to become terminally differentiated CD56-positive NK cells. These are uniquely able to identify the tumor cells regardless of the presence or absence of antibodies and MHC molecules and, accordingly, have the ability to identify any tumor cells lacking MHC molecules on their surface (92). In addition to T-cell adoptive transfer, NK cell-based immunotherapy has shown promising antitumor effects in a number of studies (93-95). Adoptive transfer is being used to increase the infiltration of NK cells in the tumor site by using NK cells from different origins, such as autologous cells, allogeneic peripheral blood mononuclear cells, umbilical cord blood, human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (90). However, although preclinical data indicate high efficacy of NK cell adoptive transfer in *in vitro* and *in vivo* studies, there is little information on the clinical efficiency of this method. A phase I clinical trial demonstrated that HSP70-induced activation of autologous NK cells was achieved in patients without any treatment-related negative side effects, but no significant clinical response was observed due to the high tumor burden and limited sample size (96). Moreover, adoptive macrophage transfer has recently become a hot research field (97,98). Due to their innate immune function and more prominent penetrating ability, macrophages may kill tumor cells when T-cell therapy fails (99). However, sufficient clinical evidence is urgently needed to support pre-clinical data, particularly in the field of GI cancer treatment.

In order to make adoptive cell therapy more readily applicable and more effective in destroying tumor cells, relatively more recent approaches have sought to introduce antitumor antigen receptors to regular T cells, which may have promising therapeutic applications. It is possible to eliminate the requirement for MHC interaction and co-stimulatory molecules when T cells are engineered to include chimeric antigen receptors (CAR), in which the B-cell receptor-derived and T-cell receptor domains are combined (100,101). To date, the antitumor qualities from the adoptive transfer of CAR-T cells has been evident in the case of advanced hematological malignancies, but in the case of solid tumors the results have been less promising (102,103). It may be possible to explain this as a consequence of the expression of heterogeneous tumor antigens, the immunosuppressive network activity within the microenvironment of the tumor, the T-cell trafficking into solid tumors, which is less than optimal, and the absence of the necessary co-stimulatory signals to achieve CAR-T cell persistence following infusion (100,101). The affinity of HER2-directed CAR-T cells for cancer cells of the GI tract is high, even for cells exhibiting low levels of HER2 expression. Moreover, CAR-T-HER2 cells may offer the potential to inhibit disease recurrence of metastasis. Specific CAR-T-HER2 cells

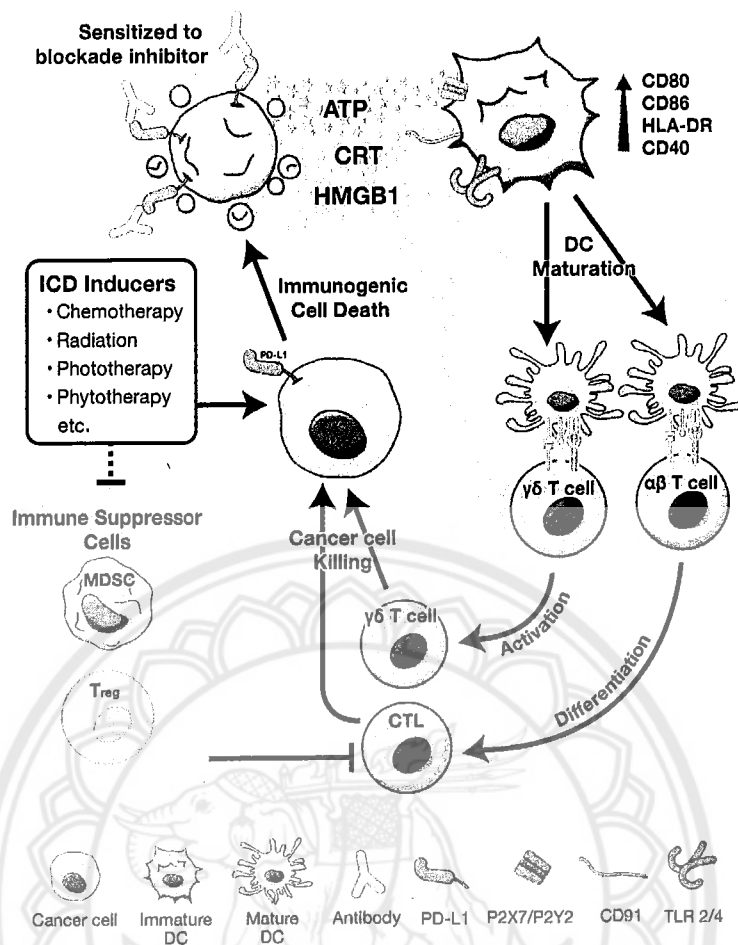


Figure 1. ICD enhances the antitumor immune response. Anticancer therapies, such as chemotherapeutic agents, radiation and phytotherapy, elicit the exposure of CRT on cell membranes and the extracellular release of ATP, HMGB1 and HSP. Interestingly, some types of ICD inducers increase PD-L1 expression, which increases the sensitivity to blockade inhibitor treatment. ICD potentiates DCs through upregulation of costimulatory signals, thereby strengthening adaptive immune system activation. Activation of $\alpha\beta$ T cells results in differentiation to cytotoxic T cells, whereas activation of $\gamma\delta$ T cells is facilitated by either mature antigen-presenting cells or as a direct effect of ICD. These modulate antitumor activity by cytotoxic granules and proinflammatory cytokine production. Moreover, the ICD inducer plays a role in the inhibition of immune suppressor cells. Therefore, ICD may be considered as priming therapy that may be suitably combined with cancer immunotherapy. ICD, immunogenic cell death; HMGB1, high mobility group box 1; CRT, calreticulin; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; DC, dendritic cell; Treg, regulatory T cell; CTL, cytotoxic T lymphocyte; TLR, Toll-like receptor; PD-L1, programmed death ligand 1; HSP, heat shock protein.

have been developed, which are consistently active within the cardiovascular system, and which can accumulate within and inhibit tumors (104). In the context of PC, CAR-T-cell therapy has been the subject of a number of studies. The tumor-specific antigens of PC can be targeted by CAR-T-cell therapy. In particular, antigens that are overexpressed, such as CEA (NCT02349724), mesothelin (NCT02159716), HER2 (NCT02713984) and MUC1 (NCT02587689), are promising targets. In HCC, there have been no complete CAR-T-cell tests, but there is some evidence that the antigens CEA, MUC1 and glypican-3 could be effectively targeted (105,106). For GC, only a few studies have examined CAR-T-cell therapy to date (107,108), but the results are cautiously optimistic when developing CAR-T cells to target 3H11 (109), despite an inability to overcome the biological obstacles presented by solid tumors. A further study based on the overexpression of the folate 1 receptor (FOLR1) in GC compared with healthy tissue showed that FOLR1 CAR-T cells display antitumor properties

by recognizing FOLR1-positive GC cells (110). In the case of hepatobiliary cancer, small-scale trials have reported positive outcomes of immunotherapy, and recent work has assessed the potential of CAR-T cells when treating cancers of the biliary tract (111). The suggested targets include EGFR, mesothelin and HER2, due to their propensity to be overexpressed in the aforementioned malignancies (112-114).

Although adoptive transfer therapy is promising and intensely under review, the major obstacle of this approach in GI cancer treatment is the heterogeneity of solid tumor, particularly in colon and GC. The heterogeneity is caused by genomic instability, which contributes to clonal evolution and immune evasion resulting in immune-resistance and tumor recurrence. Interestingly, combination treatment of cellular adoptive transfer and chemotherapy can improve clinical outcomes and may prevent recurrence in patients with advance GC that may be attributed to the synergistic effect of ICD (115). Moreover, multiclonal elimination of tumor cells could be

improved by using multi-peptide vaccine or broad-array tumor antigen (116,117). Overall, these would be the solution for immune exhaustion in clinical settings of adoptive therapies.

9. Implications of ICD and adoptive cell transfer

The implications of adoptive transfer of cytotoxic T cells or CAR-T cells with ICD has not been extensively studied in the context of GI cancer treatment. However, it has been shown that the antitumor immune response of cytotoxic T cells may lead to immunogenic tumor cell death, improving their own tumor cell-killing capacity (118). Interestingly, treatment with mitochondria-targeted small molecules, including ATP, CRT and HMGB1, can induce upregulation of ICD in both *in vitro* and *in vivo* models. This is surprising, as priming by an ICD inducer effectively suppressed tumor growth and lung metastasis by enhancing the adoptive T-cell therapy against colon cancer in a mouse model (119). Moreover, it has been demonstrated that the mitochondrial DAMPs could play a role as immunomodulators through activation of $\gamma\delta$ -T cells. Mitochondrial DAMPs induced expression of TLR2 and TLR4, which may positively regulate the antitumor response (120,121). TLR/type I IFN/CXCL10 has been proposed as the signaling pathway implicated in the recruitment of CXCR3⁺ T cells and the activation of $\gamma\delta$ -T cells (122). Hence, not only the direct impact from activated antigen-presenting cells, but also T-cell-based anticancer therapy may be targeted when considering ICD (Table I). However, although the implications of T-cell therapy and ICD appear to be very promising, sufficient evidence is currently lacking.

10. Conclusions

ICD plays a key role in enhancing the efficacy of immunotherapy. DC-based anticancer vaccines directly activate and strengthen the co-stimulatory signal through DAMPs to further stimulate the immune response. The treatment outcomes from both the immune checkpoint blockade and adoptive transfer cell therapy may be enhanced by using ICD inducer agents. The mechanisms involving ICD-enhanced immunotherapy in GI cancer treatment are demonstrated in Fig. 1. These findings confirm the effectiveness of induction therapies combined with immunotherapy. Intervention may be implemented at only one or a few cycles at effectively low doses to avoid adverse effects and to obtain optimal ICD induction. Neoadjuvant chemotherapy can induce either cancer cell apoptosis or necrosis, which effectively promotes ICD induction, particularly HMGB1 release. In addition to the HSP family, CRT and S100 protein expression is elicited by chemotherapy and may be the primary DAMP molecules strengthening the efficacy of immunotherapy. However, the use of ICD inducers in immunotherapy for GI cancers has been limited due to a lack of research evidence, accounting for only 5-10% of all clinical trials. Further investigation should yield more positive outcomes regarding the induction of ICD in immunotherapy for GI cancer.

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

The present study was supported by the National Science Research and Innovation Fund (NSRF) (grant nos. R2564B011, R2564B012, R2563C029 and R2564B015) and the Thailand Science Research and Innovations (TSRI) (grant no. BRG6180010).

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

WS wrote the paper. CN designed and created the graphic figure. SP and AJ wrote and edited the paper. All authors have read and approved the final manuscript. Data authentication is not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Rammensee HG: From basic immunology to new therapies for cancer patients. In: Cancer Immunotherapy Meets Oncology. In Honor of Christoph Huber. Britten CM, Kreiter S, Diken M and Rammensee HG (eds). Springer International Publishing, Cham, pp3-11, 2014.
- Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L and Kroemer G: Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 17: 97-111, 2017.
- Matzinger P: Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Rev Immunol* 12: 991-1045, 1994.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P and Vandenabeele P: Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12: 860-875, 2012.
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O and Zitvogel L: Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 31: 51-72, 2013.
- Pol J, Vacchelli E, Aranda F, Castoldi F, Eggermont A, Cremer I, Sautès-Fridman C, Fucikova J, Galon J, Spisek R, *et al*: Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* 4: e1008866, 2015.
- Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy N, *et al*: Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3: e955691, 2014.
- Toomey PG, Vohra NA, Ghansah T, Sarnaik AA and Pilon-Thomas SA: Immunotherapy for gastrointestinal malignancies. *Cancer Control* 20: 32-42, 2013.
- Rawla P and Barsouk A: Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterol Rev* 14: 26-38, 2019.
- Grady WM and Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135: 1079-1099, 2008.
- Morse MA, Hochster H and Benson A: Perspectives on treatment of metastatic colorectal cancer with immune checkpoint inhibitor therapy. *Oncologist* 25: 33-45, 2020.

12. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424, 2018.
13. Mittal S and El-Serag HB: Epidemiology of hepatocellular carcinoma: Consider the population. *J Clin Gastroenterol* 47 (Suppl): S2-S6, 2013.
14. McGlynn KA and London WT: The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: Present and future. *Clin Liver Dis* 15: 223-243, 2011.
15. Kamsa-Ard S, Luvira V, Suwanrungruang K, Kamsa-Ard S, Luvira V, Santong C, Srisuk T, Pugkhem A, Bhudhisawasdi V and Pairojkl C: Cholangiocarcinoma trends, incidence, and relative survival in Khon Kaen, Thailand from 1989 through 2013: A population-based cancer registry study. *J Epidemiol* 29: 197-204, 2019.
16. Bertuccio P, Malvezzi M, Carioli G, Hashim D, Boffetta P, El-Serag HB, La Vecchia C and Negri E: Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 71: 104-114, 2019.
17. Blechacz B: Cholangiocarcinoma: Current knowledge and new developments. *Gut Liver* 11: 13-26, 2017.
18. Banales JM, Marin JGG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, Cardinale V, Carpino G, Andersen JB, Braconi C, *et al*: Cholangiocarcinoma 2020: The next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17: 557-588, 2020.
19. Sripa B and Pairojkl C: Cholangiocarcinoma: Lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 24: 349-356, 2008.
20. Pereira NP and Corrêa JR: Pancreatic cancer: Treatment approaches and trends. *J Cancer Metastasis Treat* 4: 18, 2018.
21. Matsuoka T and Yashiro M: Precision medicine for gastrointestinal cancer: Recent progress and future perspective. *World J Gastrointest Oncol* 12: 1-20, 2020.
22. Abdul-Latif M, Townsend K, Dearman C, Shiu KK and Khan K: Immunotherapy in gastrointestinal cancer: The current scenario and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 88: 102030, 2020.
23. Tannapfel A and Reinacher-Schick A: Immunotherapy in gastrointestinal cancer: Where Do We Stand? *Visc Med* 35: 1-2, 2019.
24. Suntharalingam M, Winter K, Ison DH, Dicker A, Kachnic LA, Chakravarthy AAK, Gaffney DK, Thakrar HV, Horiba MN, Deutsch M, *et al*: The initial report of RTOG 0436: A phase III trial evaluating the addition of cetuximab to paclitaxel, cisplatin, and radiation for patients with esophageal cancer treated without surgery. *J Clin Oncol* 32: LBA6-LBA6, 2014.
25. O'Connell MJ, Colangelo LH, Beart RW, Petrelli NJ, Allegra CJ, Sharif S, Pitot HC, Shields AF, Landry JC, Ryan DP, *et al*: Capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment of rectal cancer: Surgical end points from national surgical adjuvant breast and bowel project trial R-04. *J Clin Oncol* 32: 1927-1934, 2014.
26. Mortara L, Balza E, Bruno A, Poggi A, Orecchia P and Carnemolla B: Anti-cancer therapies employing il-2 cytokine tumor targeting: Contribution of innate, adaptive and immunosuppressive cells in the anti-tumor efficacy. *Front Immunol* 9: 2905, 2018.
27. Hollingsworth RE and Jansen K: Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines* 4: 7, 2019.
28. Cheever MA and Higano CS: PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 17: 3520-3526, 2011.
29. Kudrin A: Overview of cancer vaccines: Considerations for development. *Hum Vaccin Immunother* 8: 1335-1353, 2012.
30. Reitsma DJ and Combet AJ: Challenges in the development of an autologous heat shock protein based anti-tumor vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 8: 1152-1155, 2012.
31. Ozao-Choy J, Lee DJ and Faries MB: Melanoma vaccines: Mixed past, promising future. *Surg Clin North Am* 94: 1017-1030, 2014.
32. Niccolai E, Taddei A, Prisco D and Amedei A: Gastric cancer and the epoch of immunotherapy approaches. *World J Gastroenterol* 21: 5778-5793, 2015.
33. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME and Lyerly HK: A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 5: 1331-1338, 1999.
34. Li J, Valentín A, Beach RK, Alicea C, Felber BK and Pavlakís GN: DNA is an efficient booster of dendritic cell-based vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 11: 1927-1935, 2015.
35. Maeda Y, Yoshimura K, Matsui H, Shindo Y, Tamesa T, Tokumitsu Y, Hashimoto N, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Sakai K, *et al*: Dendritic cells transfected with heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: A phase 1 dose escalation clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 64: 1047-1056, 2015.
36. Song W, Kong HL, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MA and Crystal RG: Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med* 186: 1247-1256, 1997.
37. Jiraviriyakul A, Songjang W, Kaewthet P, Tanawatkitichai P, Bayan P and Pongcharoen S: Honokiol-enhanced cytotoxic T lymphocyte activity against cholangiocarcinoma cells mediated by dendritic cells pulsed with damage-associated molecular patterns. *World J Gastroenterol* 25: 3941-3955, 2019.
38. Gottfried E, Krieg R, Eichelberg C, Andreesen R, Mackensen A and Krause SW: Characterization of cells prepared by dendritic cell-tumor cell fusion. *Cancer Immun* 2: 15, 2002.
39. Kavanagh B, Ko A, Venook A, Margolin K, Zeh H, Lotze M, Schillinger B, Liu W, Lu Y, Mitsky P, *et al*: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J Immunother* 30: 762-772, 2007.
40. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, *et al*: Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10: 828-839, 2004.
41. Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, Khan S, Camps M, Drijfhout JW, Silva AL, Jiskoot W, van Hall T, van Veelen PA, *et al*: Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *Eur J Immunol* 43: 2554-2565, 2013.
42. Medema JP, Schuurhuis DH, Rea D, van Tongeren J, de Jong J, Bres SA, Laban S, Toes RE, Toebes M, Schumacher TN, *et al*: Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: Differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J Exp Med* 194: 657-667, 2001.
43. Zhang QM, He SJ, Shen N, Luo B, Fan R, Fu J, Luo GR, Zhou SF, Xiao SW and Xie XX: Overexpression of MAGE-D4 in colorectal cancer is a potentially prognostic biomarker and immunotherapy target. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 3918-3927, 2014.
44. Kono K, Takahashi A, Sugai H, Fujii H, Choudhury AR, Kiessling R and Matsumoto Y: Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 8: 3394-3400, 2002.
45. Smith AM, Justin T, Michaeli D and Watson SA: Phase I/II study of G17-DT, an Anti-gastrin immunogen, in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 6: 4719-4724, 2000.
46. Higashihara Y, Kato J, Nagahara A, Izumi K, Konishi M, Kodani T, Serizawa N, Osada T and Watanabe S: Phase I clinical trial of peptide vaccination with URLC10 and VEGFR1 epitope peptides in patients with advanced gastric cancer. *Int J Oncol* 44: 662-668, 2014.
47. Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, Rivoltini L, Schiavo M, Regalia E, Mariani L, Camerini T, Marchianò A, Andreola S, *et al*: Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9: 3235-3245, 2003.
48. Dolcetti R, De Re V and Canzonieri V: Immunotherapy for gastric cancer: Time for a Personalized Approach? *Int J Mol Sci* 19: 1602, 2018.
49. Le DT, Lutz E, Uram JN, Sugar EA, Onners B, Solt S, Zheng L, Diaz LA Jr, Donchower RC, Jaffee EM and Laheru DA: Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J Immunother* 36: 382-389, 2013.
50. Ikeda M, Okusaka T, Ohno I, Mitsunaga S, Kondo S, Ueno H, Morizane C, Gemmoto K, Suna H, Ushida Y and Furuse J: Phase I studies of peptide vaccine cocktails derived from GPC3, WDRPUH and NEIL3 for advanced hepatocellular carcinoma. *Immunotherapy* 13: 371-385, 2021.
51. Butterfield LH, Ribas A, Meng WS, Disette VB, Amarnani S, Vu HT, Seja E, Todd K, Glaspy JA, McBride WH and Economou JS: T-cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 9: 5902-5908, 2003.

52. Tsuchiya N, Yoshikawa T, Fujinami N, Saito K, Mizuno S, Sawada Y, Endo I and Nakatsura T: Immunological efficacy of glypican-3 peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncimmunology* 6: e1346764, 2017.
53. Zhang Q, Chen G, Peng L, Wang X, Yang Y, Liu C, Shi W, Su C, Wu H, Liu X, *et al*: Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res* 12: 6523-6531, 2006.
54. Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H, Lee K, Bartlett D, McKolanis JR, Geller BA, Schmotzer A, Potter DP, Whiteside T, *et al*: A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther* 6: 955-964, 2008.
55. Kawamura J, Sugiura F, Sukegawa Y, Yoshioka Y, Hida JJ, Hazama S and Okuno K: Multicenter, phase II clinical trial of peptide vaccination with oral chemotherapy following curative resection for stage III colorectal cancer. *Oncology Lett* 15: 4241-4247, 2018.
56. Rahma OE, Hamilton JM, Wojtowicz M, Dakheel O, Bernstein S, Liewehr DJ, Steinberg SM and Khleif SN: The immunological and clinical effects of mutated ras peptide vaccine in combination with IL-2, GM-CSF, or both in patients with solid tumors. *J Transl Med* 12: 55, 2014.
57. Quandt J, Schlude C, Bartoschek M, Will R, Cid-Arregui A, Schölch S, Reissfelder C, Weitz J, Schneider M, Wiemann S, *et al*: Long-peptide vaccination with driver gene mutations in p53 and Kras induces cancer mutation-specific effector as well as regulatory T cell responses. *Oncimmunology* 7: e1500671, 2018.
58. Hessmann E, Patzak MS, Klein L, Chen N, Kari V, Ramu I, Bapiro TE, Frese KK, Gopinathan A, Richards FM, *et al*: Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* 67: 497-507, 2018.
59. Scarpa M, Ruffolo C, Canal F, Scarpa M, Basato S, Erroi F, Fiorot A, Dall'Agnese L, Pozza A, Porzionato A, *et al*: Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancer enhance immune surveillance. *Oncotarget* 6: 43472-43482, 2015.
60. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, Geva R, Gottfried M, Penel N, Hansen AR, *et al*: Efficacy of Pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite Instability/Mismatch Repair-deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* 38: 1-10, 2019.
61. Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, Zhao L, Spisek R, Kroemer G and Galluzzi L: Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis* 11: 1013, 2020.
62. Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, Watanabe M, Ohkubo Y, Izawa S, Murata K, Fujii H, Nakano T and Kono K: Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 72: 3967-3976, 2012.
63. Ratschker T, Egenberger L, Alev M, Zschiesche L, Band J, Schreiber E, Frey B, Derer A, Alexiou C and Janko C: Mitoxantrone-loaded nanoparticles for magnetically controlled tumor therapy-induction of tumor cell death, release of danger signals and activation of immune cells. *Pharmaceutics* 12: 923, 2020.
64. Zhao X, Yang K, Zhao R, Ji T, Wang X, Yang X, Zhang Y, Cheng K, Liu S, Hao J, *et al*: Inducing enhanced immunogenic cell death with nanocarrier-based drug delivery systems for pancreatic cancer therapy. *Biomaterials* 102: 187-197, 2016.
65. Turrini E, Catanzaro E, Muraro MG, Governa V, Trella E, Mele V, Calcabrini C, Morroni F, Sita G, Hrelia P, *et al*: *Hemidesmus indicus* induces immunogenic death in human colorectal cancer cells. *Oncotarget* 9: 24443-24456, 2018.
66. Wu CJ, Tsai YT, Lee JJ, Wu PY, Lu LS, Tsao WS, Huang YJ, Chang CC, Ka SM and Tao MH: Combination of radiation and interleukin 12 eradicates large orthotopic hepatocellular carcinoma through immunomodulation of tumor microenvironment. *Oncimmunology* 7: e1477459, 2018.
67. He H, Liu L, Liang R, Zhou H, Pan H, Zhang S and Cai L: Tumor-targeted nanoplatfor for in situ oxygenation-boosted immunogenic phototherapy of colorectal cancer. *Acta Biomaterialia* 104: 188-197, 2020.
68. Van Loenhout J, Flieswasser T, Freire Boulosa L, De Waele J, Van Audenaerde J, Marcq E, Jacobs J, Lin A, Lion E, Dewitte H, *et al*: Cold atmospheric plasma-treated PBS eliminates immunosuppressive pancreatic stellate cells and induces immunogenic cell death of pancreatic cancer cells. *Cancers* 11: 1597, 2019.
69. Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-264, 2012.
70. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA and Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3: 541-547, 1995.
71. Borch TH, Donia M, Andersen MH and Svane IM: Reorienting the immune system in the treatment of cancer by using anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Drug Discov Today* 20: 1127-1134, 2015.
72. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ and Sharpe AH: Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity* 44: 955-972, 2016.
73. Lee B, Hutchinson R, Wong HL, Tie J, Putoczki T, Tran B, Gibbs P and Christie M: Emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatment of upper gastrointestinal, pancreatic and hepatic cancers. *Semin Cancer Biol* 52: 241-252, 2018.
74. Zhou G, Noordam L, Sprengers D, Doukas M, Boor PPC, van Beek AA, Erkens R, Mancham S, Grünhagen D, Menon AG, *et al*: Blockade of LAG3 enhances responses of tumor-infiltrating T cells in mismatch repair-proficient liver metastases of colorectal cancer. *Oncimmunology* 7: e1448332, 2018.
75. Huyghe N, Baldin P and Van den Eynde M: Immunotherapy with immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer: What is the future beyond deficient mismatch-repair tumours? *Gastroenterol Rep (Oxf)* 8: 11-24, 2020.
76. Chung KY, Gore I, Fong L, Venook A, Beck SB, Dorazio P, Criscitiello PJ, Healey DI, Huang B, Gomez-Navarro J and Saltz LB: Phase II study of the anti-cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28: 3485-3490, 2010.
77. Torphy RJ, Zhu Y and Schulick RD: Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs. *Ann Gastroenterol Surg* 2: 274-281, 2018.
78. Kudo M, Matilla A, Santoro A, Melero I, Gracian AC, Acosta-Rivera M, Choo SP, El-Khoueiry AB, Kuromatsu R, El-Rayes BF, *et al*: Checkmate-040: Nivolumab (NIVO) in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC) and Child-Pugh B (CPB) status. *J Clin Oncol* 37: 327, 2019.
79. Ledford H, Else H and Warren M: Cancer immunologists scoop medicine Nobel prize. *Nature* 562: 20-21, 2018.
80. Sakakibara K, Sato T, Kufe DW, VonHoff DD and Kawabe T: CBP501 induces immunogenic tumor cell death and CD8 T cell infiltration into tumors in combination with platinum, and increases the efficacy of immune checkpoint inhibitors against tumors in mice. *Oncotarget* 8: 78277-78288, 2017.
81. Landry MR, DuRoss AN, Neufeld MJ, Hahn L, Sahay G, Luxenhofer R and Sun C: Low dose novel PARP-PI3K inhibition via nanoformulation improves colorectal cancer immunoradiotherapy. *Materials today Bio* 8: 100082, 2020.
82. Zhu H, Shan Y, Ge K, Lu J, Kong W and Jia C: Oxaliplatin induces immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma cells and synergizes with immune checkpoint blockade therapy. *Cell Oncol (Dordr)* 43: 1203-1214, 2020.
83. Maruoka Y, Furusawa A, Okada R, Inagaki F, Fujimura D, Wakiyama H, Kato T, Nagaya T, Choyke PL and Kobayashi H: Near-infrared photoimmunotherapy combined with CTLA4 checkpoint blockade in syngeneic mouse cancer models. *Vaccines (Basel)* 8: 528, 2020.
84. Antoniotti C, Borelli B, Rossini D, Pietrantonio F, Morano F, Salvatore L, Lonardi S, Marmorino F, Tambari S, Corallo S, *et al*: AtezoTRIBE: A randomised phase II study of FOLFOXIRI plus bevacizumab alone or in combination with atezolizumab as initial therapy for patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 20: 683, 2020.
85. Fumet JD, Isambert N, Hervieu A, Zanetta S, Guion JF, Hennequin A, Rederstorff E, Bertaut A and Ghiringhelli F: Phase Ib/II trial evaluating the safety, tolerability and immunological activity of durvalumab (MEDI4736) (anti-PD-L1) plus tremelimumab (anti-CTLA-4) combined with FOLFOX in patients with metastatic colorectal cancer. *ESMO Open* 3: e000375, 2018.
86. Bang YJ, Muro K, Fuchs CS, Golan T, Geva R, Hara H, Jalal SI, Borg C, Doi T, Wainberg ZA, *et al*: KEYNOTE-059 cohort 2: Safety and efficacy of pembrolizumab (pembro) plus 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin for first-line (1L) treatment of advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 35: 4012, 2017.

87. Bailly C, Thuru X and Quesnel B: Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: Modern times. *NAR Cancer* 2: zcaa002, 2020.
88. Dosset M, Vargas TR, Lagrange A, Boidot R, Végran F, Roussey A, Chalmin F, Dondaine L, Paul C, Lauret Marie-Joseph E, *et al*: PD-1/PD-L1 pathway: An adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 7: e1433981, 2018.
89. Chu TH, Chan HH, Hu TH, Wang EM, Ma YL, Huang SC, Wu JC, Chang YC, Weng WT, Wen ZH, *et al*: Celecoxib enhances the therapeutic efficacy of epirubicin for Novikoff hepatoma in rats. *Cancer Med* 7: 2567-2580, 2018.
90. Wang F, Lau JKC and Yu J: The role of natural killer cell in gastrointestinal cancer: Killer or helper. *Oncogene* 40: 717-730, 2021.
91. Amedei A, Niccolai E and D'Elios MM: T cells and adoptive immunotherapy: Recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. *Clin Dev Immunol* 2011: 320571, 2011.
92. Guo Y and Han W: Cytokine-induced killer (CIK) cells: From basic research to clinical translation. *Chin J Cancer* 34: 99-107, 2015.
93. Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, *et al*: Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med* 13: 277, 2015.
94. Shiozawa M, Chang CH, Huang YC, Chen YC, Chi MS, Hao HC, Chang YC, Takeda S, Chi KH and Wang YS: Pharmacologically upregulated carcinoembryonic antigen-expression enhances the cytolytic activity of genetically-modified chimeric antigen receptor NK-92MI against colorectal cancer cells. *BMC Immunol* 19: 27, 2018.
95. Liu B, Liu ZZ, Zhou ML, Lin JW, Chen XM, Li Z, Gao WB, Yu ZD and Liu T: Development of c-MET-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells with cytotoxic effects on human liver cancer HepG2 cells. *Mol Med Rep* 20: 2823-2831, 2019.
96. Krause SW, Gastpar R, Andreesen R, Gross C, Ullrich H, Thonigs G, Pfister K and Multhoff G: Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: A clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* 10: 3699-3707, 2004.
97. Andreesen R, Scheibenbogen C, Brugger W, Krause S, Meerpohl HG, Leser HG, Engler H and Löhner GW: Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: A new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Res* 50: 7450-7456, 1990.
98. Klichinsky M, Ruehlla M, Shestova O, Lu XM, Best A, Zeeman M, Schmierer M, Gabrusiewicz K, Anderson NR, Petty NE, *et al*: Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* 38: 947-953, 2020.
99. Liu Y and Wang R: Immunotherapy targeting tumor-associated macrophages. *Front Med (Lausanne)* 7: 583708, 2020.
100. Fesnak AD, June CH and Levine BL: Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 16: 566-581, 2016.
101. Mirzaei HR, Rodriguez A, Sheppherd J, Brown CE and Badie B: Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications. *Front Immunol* 8: 1850, 2017.
102. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, *et al*: Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 377: 2531-2544, 2017.
103. Hou B, Tang Y, Li W, Zeng Q and Chang D: Efficiency of CAR-T therapy for treatment of solid tumor in clinical trials: A meta-analysis. *Disease Markers* 2019: 3425291, 2019.
104. Bebnowska D, Grywalska E, Niedźwiedzka-Rystwej P, Sosnowska-Pasiarska B, Smok-Kalwat J, Pasiarski M, Gózdź S, Roliński J and Polkowski W: CAR-T cell therapy-an overview of targets in gastric cancer. *J Clin Med* 9: 1894, 2020.
105. Alrifai D, Sarker D and Maher J: Prospects for adoptive immunotherapy of pancreatic cancer using chimeric antigen receptor-engineered T-cells. *Immunopharm Immunot* 38: 50-60, 2016.
106. Cheng X, Zhao G and Zhao Y: Combination immunotherapy approaches for pancreatic cancer treatment. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018: 6240467, 2018.
107. Song Y, Tong C, Wang Y, Gao Y, Dai H, Guo Y, Zhao X, Wang Y, Wang Z, Han W and Chen L: Effective and persistent antitumor activity of HER2-directed CAR-T cells against gastric cancer cells in vitro and xenotransplanted tumors in vivo. *Protein Cell* 9: 867-878, 2018.
108. Tao K, He M, Tao F, Xu G, Ye M, Zheng Y and Li Y: Development of NKG2D-based chimeric antigen receptor-T cells for gastric cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 82: 815-827, 2018.
109. Han H, Wang S, Hu Y, Li Z, Yang W, Lv Y, Wang L, Zhang L and Ji J: Monoclonal antibody 3H11 chimeric antigen receptors enhance T cell effector function and exhibit efficacy against gastric cancer. *Oncol Lett* 15: 6887-6894, 2018.
110. Kim M, Pyo S, Kang CH, Lee CO, Lee HK, Choi SU and Park CH: Folate receptor 1 (FOLR1) targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells for the treatment of gastric cancer. *PLoS One* 13: e0198347, 2018.
111. DeLeon TT, Zhou YM, Nagalo BM, Yokoda RT, Ahn DH, Ramanathan RK, Salomao MA, Aqel BA, Mahipal A, Bekaii-Saab TS and Borad MJ: Novel immunotherapy strategies for hepatobiliary cancers. *Immunotherapy* 10: 1077-1091, 2018.
112. Xu JY, Ye ZL, Jiang DQ, He JC, Ding YM, Li LF, Lv SQ, Wang Y, Jin HJ and Qian QJ: Mesothelin-targeting chimeric antigen receptor-modified T cells by piggyBac transposon system suppress the growth of bile duct carcinoma. *Tumor Biol* 39: 1010428317695949, 2017.
113. Guo Y, Feng K, Liu Y, Wu Z, Dai H, Yang Q, Wang Y, Jia H and Han W: Phase I study of chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with EGFR-positive advanced biliary tract cancers. *Clin Cancer Res* 24: 1277-1286, 2018.
114. Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z and Kurzrock R: HER2 expression status in diverse cancers: Review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev* 34: 157-164, 2015.
115. Cui J, Li L, Wang C, Jin H, Yao C, Wang Y, Li D, Tian H, Niu C, Wang G, *et al*: Combined cellular immunotherapy and chemotherapy improves clinical outcome in patients with gastric carcinoma. *Cytotherapy* 17: 979-988, 2015.
116. El-Sayes N, Vito A and Mossman K: Tumor heterogeneity: A great barrier in the age of cancer immunotherapy. *Cancers* 13: 806, 2021.
117. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich PY, Mendrzyk R, *et al*: Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 18: 1254-1261, 2012.
118. Minute L, Teijeira A, Sanchez-Paulete AR, Ochoa MC, Alvarez M, Otano I, Etxeberria I, Bolaños E, Azpilikueta A, Garasa S, *et al*: Cellular cytotoxicity is a form of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer* 8: e000325, 2020.
119. Jiang Q, Zhang C, Wang H, Peng T, Zhang L, Wang Y, Han W and Shi C: Mitochondria-targeting immunogenic cell death inducer improves the adoptive T-cell therapy against solid tumor. *Front Oncol* 9: 1196, 2019.
120. Schwacha MG, Rani M, Nicholson SE, Lewis AM, Holloway TL, Sordo S and Cap AP: Dermal $\gamma\delta$ T-cells can be activated by mitochondrial damage-associated molecular patterns. *PLoS One* 11: e0158993, 2016.
121. Schwacha MG, Rani M, Zhang Q, Nunez-Cantu O and Cap AP: Mitochondrial damage-associated molecular patterns activate $\gamma\delta$ T-cells. *Innate Immunity* 20: 261-268, 2014.
122. Gebremeskel S and Johnston B: Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: Impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget* 6: 41600-41619, 2015.
123. Xie W, Forveille S, Iribarren K, Sauvat A, Senovilla L, Wang Y, Humeau J, Perez-Lanzon M, Zhou H, Martínez-Leal JF, *et al*: Lurbinectedin synergizes with immune checkpoint blockade to generate anticancer immunity. *Oncoimmunology* 8: e1656502, 2019.
124. Limagne E, Thibaudin M, Nuttin L, Spill A, Derangère V, Fumet JD, Amellal N, Peranzoni E, Cattani V and Ghiringhelli F: Trifluridine/Tipiracil plus Oxaliplatin improves PD-1 blockade in colorectal cancer by inducing immunogenic cell death and depleting macrophages. *Cancer Immunol Res* 7: 1958-1969, 2019.

