

## บทคัดย่อ

มะเร็งเยื่อบุผิวช่องปากชนิดสควมัสเซลล์ (OSCC) เป็นโรคที่ร้ายแรงซึ่งพบได้ในช่องปากและคอหอยส่วนปาก มีอัตราการตายและคุณภาพชีวิตสูง พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอ็ดสอินเทกริน แอนด์เมทัลโลโปรทีเนสอินน์หรือ ADAM9 ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดที่ 1 ในโรคมะเร็งหลากหลายชนิดรวมถึง OSCC และในเซลล์ไลน์บางชนิดที่สกัดแยกได้จาก OSCC แต่ก็ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับความผิดปกติของโครโมโซมตรงตำแหน่งที่พบยีนสำหรับ ADAM9 หรือยังมีการศึกษาเฉพาะการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของ ADAM9 ในมะเร็งช่องปากเท่านั้น นอกจากนี้ยังไม่พบว่ามีการศึกษาใดศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของ ADAM9 ต่อพยากรณ์โรคของ OSCC โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกระตุ้นวิถีให้สัญญาณของเอพิเดอร์มัลโกรทแฟกเตอร์รีเซพเตอร์ (EGFR) และเอเคที (Akt) และต่อการที่เซลล์มะเร็งมีความก้าวร้าวเพิ่มมากขึ้น **วัตถุประสงค์:** ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงระดับการแสดงออกของโปรตีน ADAM9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากเปรียบเทียบกับเยื่อบุผิวช่องปากปกติและในเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากปกติซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ ยังศึกษาบทบาทหน้าที่ของ ADAM9 ในการกระตุ้นกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตของ EGFR และ Akt และความก้าวร้าวของเซลล์มะเร็งช่องปากนอกร่างกาย **วัสดุและวิธีการทดลอง:** ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ADAM9 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิด OSCC 34 ชิ้น และเยื่อบุผิวช่องปากปกติ 10 ชิ้น คำนวณคะแนนอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียโดยการนำคะแนนของร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกรวมกับคะแนนของความเข้มของการติดสี ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปากที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ HN5, HN6, HN15 และ HN008 และเซลล์เยื่อบุผิวปริมูมิจากเนื้อเยื่อช่องปากปกติที่ไม่อักเสบซึ่งปกคลุมพื้นกรามคุดซี่ที่สามของผู้บริจาคที่แตกต่างกันจำนวน 8 ราย ซึ่งมีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีประวัติสูบบุหรี่ที่ให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ keratinocyte growth medium ซึ่งไม่มีซีรัมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันวันจันทร์เซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 จากนั้นตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน ADAM9 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธีฟลูออโรอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ และเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน ADAM9 ขนาดที่ทำงานได้ที่ 84 กิโลดาลตัน ในเซลล์มะเร็งช่องปากกับเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากปกติด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตไฮบริไดเซชัน นอกจากนี้ ดำเนินการถ่าย siRNA ที่จำเพาะต่อ ADAM9 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ ADAM9 ในเซลล์มะเร็งช่องปากบางชนิดด้วยวิธี cell transfection และศึกษาการแสดงออกของ EGFR ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine1173 และ Akt ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ serine473 ในเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของ ADAM9 พร้อมกับนำเซลล์ดังกล่าวไปใช้ศึกษาการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์และการรุกรานของเซลล์ **ผลการทดลอง:** ค่ามัธยฐานของการแสดงออกของ ADAM9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากมากกว่าในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) และพบว่าการแสดงออกของ ADAM9 สัมพันธ์กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งโดยมีการแสดงออกของ ADAM9 โปรตีนใน OSCC ชนิดที่เซลล์มะเร็งเปลี่ยนสภาพเป็นอย่างดีและใน OSCC ชนิดที่เซลล์มะเร็งเปลี่ยนสภาพปานกลางมากกว่าใน OSCC ชนิดที่เซลล์มะเร็งเปลี่ยนสภาพอย่างไม่ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $r = 0.557$ ;  $p = 0.001$ ) ผลการทดลองจาก

โพลไซโทเมตรีพบว่าเซลล์มะเร็งช่องปาก 3 ใน 4 ชนิดได้แก่ HN6, HN15 และ HN008 มีการแสดงออกของ ADAM9 โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ และพบว่าการแสดงออกของ ADAM9 โปรตีนที่ทำงานได้แตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ แต่พบว่าการแสดงออกของ ADAM9 โปรตีนเพิ่มสูงขึ้นใน HN6 และ HN15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากปกติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ADAM9 ในเซลล์มะเร็ง HN6 และ HN15 แล้วยังพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ EGFR และ Akt ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ อีกด้วย ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ADAM9 ดังกล่าวนี้อาจถูกยับยั้งด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ ADAM9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ใช้ siRNA ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ( $p < 0.05$ ) พบว่าการแสดงออกของ Akt ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเท่านั้น แต่ไม่ใช่การแสดงออกของ EGFR ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต ที่สามารถถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ ADAM9 ในเซลล์ HN6 และ HN15 ( $p < 0.05$ ) ถึงแม้ว่าอัตราการแบ่งเซลล์มะเร็ง HN6 และ HN15 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของ ADAM9 ด้วย siRNA ไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่าอัตราการรุกรานของเซลล์มะเร็งช่องปากทั้งสองชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเซลล์มะเร็งช่องปากทั้งสองชนิดถูกยับยั้งการแสดงออกของ ADAM9 ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ ADAM9 ( $p < 0.05$ ) **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต:** การแสดงออกของ ADAM9 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็ง OSCC และในเซลล์มะเร็งช่องปากบางชนิด แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ ADAM9 ต่อพยากรณ์โรคของโรคมะเร็งช่องปาก รวมไปถึงการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ADAM9 นี้ยังสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์มะเร็ง OSCC ชนิดที่เปลี่ยนแปลงเป็นชนิดที่ลุกลามได้ดีซึ่งสอดคล้องกับมะเร็งของต่อมลูกหมาก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทหน้าที่ของวิถีให้สัญญาณ ADAM9 และ Akt ต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งช่องปากซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษามะเร็งช่องปากแบบมุ่งเป้า

**คำสำคัญ:** 5-โบรมู-2'-ดีออกซียูริดีน; เอคิโนเทกรินแอนด์เมทัลโลโปรทีเนส; เอเคที; เอพิเดอร์มัลโกรทแฟกเตอร์รีเซพเตอร์; มะเร็งเยื่อบุผิวช่องปากชนิดสควมัสเซลล์; สมอลอินเทอร์เฟียร์ริงอาร์เอ็นเอ

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC), a devastating disease with high morbidity and mortality rates, is commonly found in the oral cavity and the oropharynx. A Disintegrin and Metalloproteinase 9 (ADAM9), a type I transmembrane glycoprotein, is overexpressed in various types of cancer, including OSCC tissues and certain oral cancer cell lines, but some studies have reported inconclusive findings regarding chromosomal aberrations in the ADAM9-containing region or only ADAM9 mRNA expression has been reported in oral cancer. Moreover, ADAM9 involvement in the pathogenesis of OSCC, especially for the activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/Akt signaling pathway and cancer cell aggressiveness, has not yet been addressed. **Objectives:** Therefore, this study aimed to determine and compare ADAM9 protein expression in OSCC and normal oral tissues *in vivo* and in cultured oral cancer cell lines and human oral keratinocytes (HOKs) and to examine the functional role of ADAM9 in phosphorylation of EGFR and Akt and in oral cancer cell aggressiveness *in vitro*. **Materials and Methods:** Thirty-four OSCC and ten healthy paraffin-embedded sections were probed with the anti-ADAM9 antibody, and the immunohistochemical score was determined by combining the score of the percentage of positively-stained cells with the intensity score. Four oral cancer cell lines, including HN5, HN6, HN15 and HN008, and primary HOKs that were isolated from non-inflamed oral tissues overlying the impacted third molars of healthy and non-smoking donors ( $n=8$ ) with their informed consent were cultured in serum-free keratinocyte growth medium at 37°C in a humidified chamber with 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was replenished every other day until 80% cell confluence. Expression of membrane ADAM9 and active ADAM9 at 84 kDa in these cell lines was assayed by flow cytometry and western blot hybridization, respectively. Cell transfection with small interfering RNA (siRNA) was performed to inhibit ADAM9 expression in some oral cancer cells. ADAM9-knockdown cells were examined for expressions of phosphorylated-EGFR<sup>tyrosine1173</sup> (p-EGFR<sup>tyr1173</sup>) and phosphorylated-Akt<sup>serine473</sup> (p-Akt<sup>ser473</sup>) and used in cell proliferation and invasion assays. **Results:** The median immunohistochemical score of ADAM9 expression in OSCC tissues was significantly greater than that in normal tissues ( $p<0.001$ ). Moreover, among OSCC cases, intense staining of ADAM9 expression was detected in well-differentiated and moderately-differentiated OSCC, and ADAM9 expression was correlated with an increasing degree of cell differentiation ( $r=0.557$ ;  $p=0.001$ ). Expression of membrane ADAM9 was found in three of four cancer cell lines, including HN6, HN15 and HN008. Expression of active ADAM9 varied among all tested cell lines, but significantly higher ADAM9 expression was found in HN6 and HN15 than that in HOKs ( $p<0.05$ ). Enhanced expressions of p-EGFR<sup>tyr1173</sup> and p-Akt<sup>ser473</sup>

were also found in HN6 and HN15. ADAM9 expressions in both cells were significantly inhibited by ADAM9 siRNA compared to scramble ( $p<0.05$ ). Expression of p-Akt<sup>ser473</sup>, but not that of p-EGFR<sup>tyr1173</sup>, was significantly blocked by ADAM9 siRNA in HN6 and HN15 ( $p<0.05$ ). Although the cell proliferation rate of ADAM9-knockdown cells did not differ from that of scramble, a significant decrease in cell invasion was found in ADAM9-knockdown HN6 and HN15 ( $p<0.05$ ).

**Conclusions and suggestions for future studies:** ADAM9 is overexpressed in OSCC and certain oral cancer cell lines, suggesting its role in the pathogenesis of oral cancer. Similar to the overexpression of ADAM9 in well-differentiated prostate cancer, high degrees of ADAM9 expression are also observed in the well-differentiated OSCC. Moreover, the findings from the functional studies suggest the involvement of the ADAM9/Akt signaling pathway in oral cancer cell invasion, which may be beneficial for a therapeutic target of oral cancer.

**KEYWORDS:** 5-Bromo-2'-Deoxyuridine; A Disintegrin and Metalloproteinase 9; Akt; Epidermal Growth Factor Receptor; Oral Squamous Cell Carcinoma; Small Interfering RNA