

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยหลังปริญญาเอกในต่างประเทศ สัญญาเลขที่ IPD4680003

เรื่อง
บทบาทของยา somatostatin analogue ต่อการยับยั้งการเกิด
มะเร็งตับในหนูทดลอง

ณ University of Wisconsin-Madison
เมือง Madison ประเทศสหรัฐอเมริกา
ระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2546 ถึง 29 เมษายน 2547

ผู้วิจัย
ชนิตรา ฐวจิตต์ Ph.D., M.D.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยหลังปริญญาเอกในต่างประเทศ สัญญาเลขที่ IPD4680003

เรื่อง
บทบาทของยา somatostatin analogue ต่อการยับยั้งการเกิด
มะเร็งตับในหนูทดลอง

ณ University of Wisconsin-Madison
เมือง Madison ประเทศสหรัฐอเมริกา
ระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2546 ถึง 29 เมษายน 2547

ผู้วิจัย
ชนิตรา ธุวจิตต์ Ph.D., M.D.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยหลังปริญญาเอกในต่างประเทศ สัญญาเลขที่ IPD4680003

เรื่อง

บทบาทของยา somatostatin analogue ต่อการยับยั้งการเกิดมะเร็งตับในหนูทดลอง
Roles of somatostatin analogue in inhibition of mouse hepatocarcinogenesis

ณ University of Wisconsin-Madison
เมือง Madison ประเทศสหรัฐอเมริกา
ระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2546 ถึง 29 เมษายน 2547

ผู้วิจัย

ชนิดรา ธวัชจิตต์ Ph.D., M.D.

ผู้ร่วมวิจัย

Andrea Bilger Ph.D.

Norman Drinkwater Ph.D..

สารบัญ

	หน้า
Lists of figures	2
Lists of tables	3
บทคัดย่อ	4
ABSTRACT	5
INTRODUCTION	6
OBJECTIVES	7
STUDY DESIGN	7
MATERIALS AND METHODS	7
RESULTS	9
DISCUSSION	11
FURTHER WORKS	13
THE APPLICABLE ADVANTAGES	13
ACKNOWLEDGEMENT	13
REFERENCES	15
รายงานค่าใช้จ่าย	16

Lists of figures

	หน้า
Figure 1 Profile of growth hormone secretion in male and female B6 mice	10

Lists of tables

	หน้า
Table 1 Summarization of number and age of B6-Hcs7 ^{C3H} male and female mice	10
Table 2 The down-regulated genes in B6- <i>lit/lit</i> mouse	11
Table 3 The up-regulated genes in B6- <i>lit/lit</i> mouse	11

บทคัดย่อ

มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma เป็นมะเร็งที่พบบ่อยชนิดหนึ่งทั่วโลก กระบวนการเกิดมะเร็งตับชนิดนี้เกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าระดับ growth hormone ที่สูงจะสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับมากขึ้น ในทางตรงกันข้ามระดับฮอร์โมนที่ต่ำจะสัมพันธ์กับการลดลงของการเกิดมะเร็งตับ การศึกษาระดับ clinical trial ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ได้รับการรักษาด้วยยาลดระดับ growth hormone กลุ่ม somatostatin analogue พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยได้ ดังนั้นเพื่อศึกษาการทำงานของยาในกลุ่มนี้ว่าสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งตับในระยะใด และมีกลไกอย่างไร ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษานี้ในหนูทดลอง โดยได้คัดเลือกหนูสายพันธุ์ปกติที่มีอัตราการเกิดมะเร็งสูง (B6-Hcs7^{C3H}) และต่ำ (B6) แล้วกระตุ้นให้เกิดมะเร็งตับด้วยสารก่อมะเร็งชนิด *N,N*-diethylnitrosamine (DEN) หลังจากนั้นทำการทดลองโดยให้ยาในระยะเวลาต่างๆกัน คือ ก่อนการเกิดมะเร็ง, พร้อมๆกับการเกิดมะเร็ง และหลังการเกิดมะเร็ง เพื่อดูผลของยาต่อการยับยั้งการเกิดมะเร็งในระยะต่างๆ และศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของจีน (regulation of gene expression) ในจีนเนื้อที่เป็นมะเร็งเทียบกับที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง ในหนูที่ได้รับยาและที่ไม่ได้รับยา โดยมีหนูสายพันธุ์ที่ผิดปกติ คือ B6-Hcs7^{C3H}-*lit/lit* และ B6-*lit/lit* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ (mutation) ที่จีนสร้าง GHRH receptor ทำให้มีระดับ growth hormone ต่ำเป็น positive control ผลการทำงานในเบื้องต้นนี้คือสามารถผลิตหนูสายพันธุ์ผสมที่มีอัตราการเกิดมะเร็งสูง (B6-Hcs7^{C3H}) และหนู B6-Hcs7^{C3H}-*lit/lit* ได้จำนวนหนึ่งเพื่อใช้ในการทดสอบเกี่ยวกับ pharmacokinetic และ toxicity ของยา somatostatin analogue ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของยานี้ในหนู mouse นอกจากนี้ผลการทดลองเบื้องต้นยังพบว่าการแสดงออกของจีนกลุ่มที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการทำงานของ growth hormone เช่น จีน *egfr*, *cxbl* และ *igf1* ลดลงในหนูสายพันธุ์ *lit/lit* เมื่อเทียบกับหนูสายพันธุ์ปกติ ในขณะที่จีนกลุ่มที่ใช้ในการ detoxify สารพิษต่างๆที่เข้าไปในเซลล์ เช่น จีน *cyp2a*, *cyp4a14* และ *msta2* นั้นเพิ่มขึ้นในหนูสายพันธุ์ *lit/lit* เมื่อเทียบกับหนูสายพันธุ์ปกติ ดังนั้นเมื่องานวิจัยเรื่องนี้เสร็จอย่างสมบูรณ์คาดว่าจะสามารถบอกได้ว่ายาในกลุ่ม somatostatin analogue สามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งตับได้หรือไม่ และเกี่ยวข้องกับจีนควบคุมการทำงานของ growth hormone อย่างไร เพื่อจะสามารถนำยานี้ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในผู้ป่วยมะเร็งตับ และหาจีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับได้ และในอนาคตยังสามารถประยุกต์ใช้นี้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดสูงในประเทศไทย และยังคงเป็นโรคที่ไม่มียาเคมีบำบัดตัวใดรักษาได้ผล โดยมุ่งหวังที่จะทำให้อัตราการหายจากโรคมะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นในอนาคต

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is one of the highest incidence cancers occur worldwide. There are many factors influence hepatocellular carcinoma formation. This study in an animal model shows that a high level of growth hormone correlates with a high chance for hepatocarcinogenesis. To the contrary, a low growth hormone level can decrease hepatocellular carcinoma formation. In hepatocellular carcinoma patients treated with a growth hormone reducing drug, a somatostatin analogue, an increase of the 5-year survival rate was observed. To study the effect of what carcinogenetic stage this drug affects the hepatocellular formation and the mechanism of how it can do that. We designed a study using mice with high (B6-Hcs7^{C3H}) and low susceptibility (B6) to hepatocellular carcinoma formation. The hepatocellular carcinoma is developed after *N,N*-diethylnitrosamine (DEN) injection at 12 days of age. The drug will be administered before, at the same time and after the first observation of liver cancer in order to study the effect of drug in prevention, treatment and inhibition of the progression of liver cancer respectively. The expression of genes involved in growth hormone control pathway will be measured comparing between those from cancerous tissues and normal tissues. The abnormal mouse strain, *lit/lit*, which has one base mutation in the GHRH receptor gene (*ghrhr*) leads to low levels of growth hormone, will be used as the positive control. The breeding of B6 and C3H mice to get the congenic (B6-Hcs7^{C3H}) was performed and mice were classified to select the desired strain by DNA polymorphism. They were prepared for pharmacokinetic and drug toxicity tests. The genotype of B6-Hcs7^{C3H}-*lit/lit* mice were checked by restriction site polymorphism. In addition, the preliminary result showed that the expressions of growth hormone responsive genes, *egfr*, *cxbl* and *igf1*, decreased in B6-*lit/lit* mice compared to wild type. But the detoxify genes, *cy2a*, *cyp4a14* and *msta2* increased in B6-*lit/lit* mice. It is possible to say that after the completion of this study, we will be better understand the effects of this somatostatin analogue in the inhibition of liver cancer formation. The ultimate goal is to define the gene controlling pathway that this drug uses to inhibit hepatocarcinogenesis and then properly uses this drug in hepatocarcinoma patients. It may then be possible to use this drug in treatment of cholangiocarcinoma, the life threatening cancer in the North and Northeastern parts of Thailand.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma is the eighth leading cause of cancer-related deaths in the world (1). Hepatocarcinogenesis in rodents is strongly influenced by growth hormone. Studies in rats show a reduction in the incidence of induced hepatomas following hypophysectomy (2-3). Mice expressing growth hormone at a serum level about 4000-fold higher than normal develop chronic hepatitis and eventually spontaneous hepatocellular carcinomas (4-5). The *little (lit)* mutation, which arose spontaneously in the C57BL/6J (B6) strain (6), is a point mutation in the gene for the growth hormone releasing hormone receptor ($Ghrhr^{lit}$) (7-8). In the B6-*lit/lit* mice, the serum level of growth hormone is about 5% of the normal level (9). In carcinogen-treated B6-*lit/lit* mice, growth hormone deficiency dramatically suppresses liver tumor development. Tumor development is also suppressed, to the same minimal level, in animals carrying the *little* mutation on more sensitive genetic backgrounds such as C3H/HeJ and C57BR/cdJ (10).

Several drugs are being tested for anti-hepatocarcinogenesis activity in the clinical trials. Among these drugs, the somatostatin analogue, one of the synthetic analogues of the natural hormone somatostatin, was demonstrated to significantly improve survival in patients with inoperable hepatocellular carcinoma (11). Octreotide is the first somatostatin analogue introduced for clinical use. The action of octreotide is to inhibit the secretion of growth hormone. It can inhibit the release of growth hormone in monkeys 45 times more effectively than somatostatin-14. Recently, SOM230, the newest somatostatin analogue was established and proved to have more potency than octreotide (12). The *in vivo* activity could be attributable to effects of octreotide on the growth hormone-insulin like growth hormone (GH-IGF) axis. There are a number of animal tumor models which suggest a role of the GH-IGF axis dysregulation in tumor growth and development. We are collaborating with Drs. Daniel Mulkerin and Sherry Meadows, at the University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center (UWCCC) in a test of the effectiveness of the somatostatin analog, Sandostatin LAR, a long acting octreotide, as a liver cancer treatment and an assessment of its effects on growth hormone-regulated gene expression in treated and untreated liver tumors. These studies will establish whether any effects of somatostatin analogue on liver tumors could be explained by suppression of the growth hormone pathway. We proposed to complement these human studies with mouse studies that are inherently more manipulable. Specifically, we will test the somatostatin analogue's effectiveness in both preventing and treating liver cancer in carcinogen-treated mice of strains that differ in their sensitivity to liver cancer.

OBJECTIVES

1. To demonstrate the effect of the somatostatin analogue in hepatocarcinogenesis in liver cancer-resistant C57BL/6J (B6) and the sensitive derivative, B6-Hcs^{C3H} mice
2. To determine whether the somatostatin analogue's inhibitory effect in mouse hepatocarcinogenesis are correlated with a suppression of the growth hormone pathway
3. To study toxicity and pharmacokinetics of this somatostatin analogue in the mouse model

STUDY DESIGN

We proposed to use different strains of mice including B6 and B6-Hcs^{C3H} in the experiment. First of all toxicity and pharmacokinetic tests of drug must be performed. Then the kinetics of drug will be indicated by the level of serum growth hormone after various times of administering the drug to the mice. The major experiment then will be done in both strains of mice mentioned earlier. DEN will be subcutaneously injected to the mice. Each strain will be divided into 3 groups. The first one will be for starting a suitable dose of the somatostatin analogue before tumor formation, the second one will be for starting the drug simultaneously with tumor formation and the last one will be for starting drug administration after tumor development. B6-Hcs^{C3H}-*lit/lit* and B6-*lit/lit* will be used as the positive controls. The blood samples and liver tissues will be collected at different times to study the plasma growth hormone level, and tumor foci development and gene expression.

MATERIALS AND METHODS

1. Mouse genotyping

The tip of the mouse tails and one toe were clipped and processed for DNA extraction. PCR was used to distinguish B6, C3H and their heterozygous strains was performed using DNA polymorphism. For finding their derivatives, *lit/lit*, PCR of *Ghrhr* gene was done and Fok I was used to cut the PCR fragment. The DNA bands obtained after restriction endonuclease cutting were different between wild type and *lit/lit* mice. DNA bands were detected in agarose gel electrophoresis and then stained with ethidium bromide. The visualized bands were seen under a gel photoimager.