รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง อิทธิพลของเมทริกซ์นอกเซลล์ ไฟโบรเนกตินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา

โดย ผศ.ทญ.ดร.ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ และคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2551

สัญญาเลขที่ MRG4980100

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง อิทธิพลของเมทริกซ์นอกเซลล์ ไฟโบรเนกตินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา

คณะผู้วิจัย

ผศ.ทญ.ดร.ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยซึ่งสนับสนุนงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภาสันต์ นักวิจัยที่ปรึกษา ผู้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆของการวิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งหน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านการเก็บข้อมูล สถานที่ อุปกรณ์ บุคลากร

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4980100

ชื่อโครงการ : อิทธิพลของเมทริกซ์นอกเซลล์ ไฟโบรเนกตินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ทญ.ดร.ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ
รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail address: piyamas.S@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 ก.ค. 2549 - 30 มิ.ย. 2551

สัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์ และ โกร๊ทแฟกเตอร์ ที่อยู่รอบเซลล์มักจะมีบทบาทสำคัญต่อพฤติกรรมของเซลล์ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือต้องการศึกษาผลของไฟโบร-เนกติน ร่วมกับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา หรือ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ต่อการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน ในเซลล์เอชเอ็น-22 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากศีรษะและลำคอ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทีเอ็นเอฟ-อัลฟา สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนได้ในภาวะที่เซลล์ถูกเลี้ยงอยู่บนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยไฟ-โบรเนกตินเท่านั้น ซึ่งผลกระตุ้นนี้พบได้ทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีน และถูกยับยั้งได้โดยแอนตีบอดีที่จำเพาะต่ออินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยเอ็นเอฟ-อัลฟาร่วมกับแอนตีบอดีอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 ก็สามารถกระตุ้นการสร้างออสทีโอพอนทีนได้เช่นกัน นอกจากนี้ระดับออสที-โอพอนทีนที่ถูกกระตุ้นโดยไฟโบรเนกติน และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ยังลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใส่สารยับยั้งต่อแมพไคเนส ในขณะที่สารยับยั้งต่อเอ็นเอฟ-แคปป้าบี ไม่มีผล เรายังแสดงให้เห็นว่าระดับฟอสโฟรีเลชั่นของเอิร์ค 1/2 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวหนึ่งในเป้าหมายของเอนไซม์แมพไคเนสถูกส่งเสริมให้มีมากขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มีทั้งไฟโบรเนกติน และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา และแอนตีบอดีกระตุ้นอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 ก็สามารถเพิ่มระดับฟอสโฟรีเลชั่นของเอิร์ค ในขณะที่แอนตีบอดียับยั้งอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 ก็สามารถลดระดับฟอสโฟรีเลชั่นของเอิร์คได้เช่นกัน จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าไฟโบรเนกติน และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา มีผลร่วมกันในการส่งเสริมการสร้างออสทีโอพอนทีนโดยอาศัยกลไกที่ผ่านมาทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 และ เอิร์ค ซึ่งการเข้าใจถึงกลไกที่ควบคุมพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

คำหลัก : มะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากช่องปาก, ไฟโบรเนกติน, ทูเมอร์เนโครซิสแฟก เตอร์-อัลฟา, ออสทีโอพอนทีน, อินทีกรินรีเซบเตอร์

Abstract

Project Code : MRG4980100

Project Title : Influence of extracellular matrix, fibronectin, on growth of squamous cell carcinoma cell line.

Investigator : Piyamas Sumrejkanchanakij

Prasit Pavasant

Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

E-mail Address : piyamas.S@chula.ac.th

Project Period : July 1, 2006 – June 30, 2008

Extracellular matrix (ECM) and growth factor signaling networks are known to interact in a complex manner and modulate behavior of the cells. Herein, we investigated the influence of fibronectin (FN) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) on osteopontin (OPN) expression in HN-22, a head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line. The data showed that TNF-α significantly increased OPN expression only in the FN-coated condition. Application of neutralizing antibody against β1 integrin abolished the OPN induction. Moreover, TNF-α when added together with activating β1 integrin is sufficient to induced OPN expression. The combination effect of FN and TNF-α was significantly inhibited by a MEK, but not NF-kB inhibitor. We further demonstrated that the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) was strongly enhanced by TNF-α and FN compared to application either one alone. Synergistic effect on ERK1/2 phosphorylation was also detected TNF-α by and activating β1 integrin, whereas inhibitory antibody to β1 integrin abrogated FN and TNF-α-induced phosphorylation of ERK1/2. These results indicate that the combination effect of TNF-α and FN on OPN induction is mediated by β1 integrin and ERK pathway, and suggest the critical role of FN in concert to TNF-α on the invasive of HNSCC cells.

Keywords : Squamous cell carcinoma, Fibronectin, Tumor necrosis factor-alpha, Osteopontin, Integrin receptor

บทนำ

การศึกษาถึงกลไกที่ควบคุมพฤติกรรมเกี่ยวกับความรุนแรงของเซลล์มะเร็งเป็นประเด็นที่น่าสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในกลุ่มที่ทำงานวิจัยทางด้านมะเร็ง นอกจากอิทธิพลที่มาจากเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงแล้ว ปัจจัยแวดล้อมที่อยู่รอบๆเซลล์ซึ่งได้แก่ เมทริกซ์-นอกเซลล์ (Extracellular matrix) โกร๊ทแฟกเตอร์ (growth factors) ฮอร์โมน (hormones) และสารที่หลั่งจากเซลล์ หรือไซโทไคน์ (cytokines) ยังเป็นอีกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเซลล์ทั้งในแง่ของการเจริญเติบโต (growth) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฉพาะอย่าง (differentiation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) หรือแม้แต่การตายของเซลล์ (apoptosis) มีการศึกษาอย่างกว้างขวางถึงสัญญาณที่ติดต่อถึงกัน (reciprocal crosstalk) ระหว่างเมทริกซ์นอกเซลล์และโกร๊ทแฟกเตอร์ (Lukashev and Werb 1998, Schwartz and Ginsberg 2002) ทั้งในด้านการทำงานของโกร๊ทแฟกเตอร์ที่ต้องอาศัยสัญญาณจากเซลล์ที่ยึดเกาะกับเมทริกซ์นอกเซลล์ หรือในอีกด้านที่โกร๊ทแฟกเตอร์สามารถกระตุ้นสัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์ได้โดยที่เซลล์ไม่จำเป็นต้องยึดเกาะกับเมทริกซ์นอกเซลล์

ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา หรือ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา (Tumor necrosis factor-α, TNF-α) เป็นหนึ่งในสารที่หลั่งจากเซลล์ซึ่งพบในบริเวณเซลล์เยื่อบุผิวที่ผิดปกติ (transformed epithelium) และเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง (Gannot, Buchner et al. 2004) ทีเอ็น-เอฟ-อัลฟา ถูกค้นพบครั้งแรกว่าเป็นสารที่หน้าที่ในกระบวนการอักเสบ และมีผลกระตุ้นให้เกิดการตายของเนื้องอก ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ โดยทั่วไปทีเอ็นเอฟ-อัลฟาจะถูกหลั่งจากเซลล์แมกโครแฟกจ์ (macrophage) แต่ภายหลังพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาส เซลล์เยื่อบุผิว เซลล์มะเร็ง รวมทั้งเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์มะเร็งก็สามารถสร้างทีเอ็นเอฟ-อัลฟาได้เช่นกัน (Szlosarek, Charles et al. 2006, Balkwill 2006) มีการแสดงถึงความเกี่ยวข้องระหว่างสัญญาณจากปฏิกิริยาการอักเสบที่นำไปสู่การเกิดเป็นเนื้องอกหรือมะเร็งได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาต่อมาที่ยืนยันถึงการพบทีเอ็น-เอฟ-อัลฟาในเนื้อเยื่อมะเร็งที่บริเวณต่างๆ ได้แก่ ทรวงอก รังไข่ ลำไส้ใหญ่ ต่อมลูกหมาก หลอดอาหาร มะเร็งผิวหนัง รวมทั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว

(Viac, Schmitt et al. 1995, Szlosarek and Balkwill 2003) ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาเมื่อจับกับรีเซบ-เตอร์ที่ผิวเซลล์จะกระตุ้นการส่งสัญญาณเข้ามาภายในเซลล์ผ่านทางแมพไคเนส (mitogen-activated protein kinase, MAPK), เอเคที (Akt), เอ็นเอฟ-แคปป้าบี (nuclear factor-kappa B, NF-κB) (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงว่ากลไกที่ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาควบคุมกระบวนการเคลื่อนที่ (tumor migration) และการแทรกซึม (tumor invasion) ของเซลล์มะเร็งนั้นผ่านมาทาง MAPK และเอิร์ค (extracellular signal-regulated kinase, ERK) ซึ่งเป็นตัวหนึ่งในโปรตีนเป้าหมายของ MAPK เมื่อทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งของทรวงอก (Choo, Sakurai et al. 2005)

นอกจากโกร๊ทแฟกเตอร์แล้ว สัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์ยังมีบทบาทสำคัญต่อพฤติกรรมของเซลล์รวมทั้งเซลล์มะเร็งอีกด้วย เนื่องจากในกระบวนการแทรกซึมของเซลล์มะเร็งจะพบการเปลี่ยนแปลงของเมทริกซ์นอกเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งได้สัมผัสกับเมทริกซ์นอกเซลล์ที่เปลี่ยนไป และมีผลต่อพฤติกรรมที่ส่งเสริมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งทั้งในแง่การยึดเกาะ (adhesion) การย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) และการเคลื่อนที่ (migration) (Miyamoto, Akiyama et al. 1995, Ashkenas, Muschler et al. 1996) ไฟโบรเนกติน (fibronectin, FN) เป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ตัวหนึ่งที่มีงานวิจัยสนับสนุนว่ามีความเกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogeneis) เนื่องจากในเนื้อเยื่อของมะเร็งหลายชนิดพบว่ามีปริมาณของไฟโบรเนกตินที่เพิ่มขึ้น (Wasenius, Hemmer et al. 2003, Nanki, Fujita et al. 2001) มีรายงานที่พบว่าไฟโบรเนกตินมีผลต่อการยึดเกาะและส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Morla, Zhang et al. 1994) นอกจากนี้ยังพบไฟโบรเนกตินเป็นองค์ประกอบหลักในเมทริกซ์นอกเซลล์ในขณะที่กำลังมีการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิดมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากศีรษะและลำคอ (Head and Neck Squamous Cell carcinoma) อีกด้วย (Liu, Chen et al. 1998) อินทีกรินรีเซบเตอร์ (integrin receptor) เป็นรีเซบเตอร์ที่ผิวเซลล์ซึ่งรับสัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า อัลฟา และ เบต้า (α and β subunits) ซึ่งจะทำงานโดยการจับกันเป็นคู่แบบ heterodimer เพื่อจับกับเมทริกซ์นอกเซลล์และส่งสัญญาณต่อเข้าไปภายในเซลล์ (Hynes

2002) ไฟโบรเนกตินสามารถจับกับอินทีกรินรีเซบเตอร์ หลายตัว ได้แก่ $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ และ $\alpha v\beta 6$ แต่อินทีกริน รีเซบเตอร์ $\alpha 5\beta 1$ ถูกพบว่าเป็นรีเซบเตอร์หลักในการรับสัญญาณจากไฟโบรเนกตินในขบวนการส่งเสริมการเกิดมะเร็ง (Akiyama, Olden et al. 1995, Assoian and Schwartz 2001)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการทดสอบผลของไฟโบรเนกติน ร่วมกับทีเอ็น-เอฟ-อัลฟา ในเซลล์มะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากศีรษะและลำคอ (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่มีอุบัติการณ์ของการเกิดอยู่ใน 5 อันดับแรกของมะเร็งทั้งหมดที่พบในประชากรไทย โดยจะทำการศึกษาอิทธิพลต่อระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน (Osteopontin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบว่ามีบทบาทสำคัญในขบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง (tumor metastasis) ออสทีโอพอนทีนเป็นโปรตีนในกลุ่ม small integrin binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING) ซึ่งพบว่ามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแทรกซึมของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากความสามารถในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ 2 กลุ่มซึ่งได้แก่ เมทริกซ์เมเทโลโปร-ทีเนส (matrix mettaloproteinase-2, MMP-2 and urokinase plasminogen activator (u-PA) (Philip, Bulbule et al. 2001, Wai and Kuo 2004) ในเนื้อเยื่อของมะเร็งที่มีการแพร่กระจายมักพบว่ามีระดับการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทีนที่เพิ่มสูงขึ้น (Matsuzaki, Shima et al. 2007) นอกจากนี้ในการทดลองที่ทำให้มีการเพิ่มระดับ (overexpression) ออสทีโอพอนทีนในเซลล์พบว่ามีผลเพิ่ม malignant phenotype ในขณะที่เมื่อใส่สายนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อออสทีโอพอนทีน (antisense oligonucleotides) ทำให้ความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastatic phenotype) ลดลง (Gardner, Berse et al. 1994) ดังนั้นจึงมีการใช้ออสทีโอพอนทีนเป็นโปรตีนตัวหนึ่งในการพยากรณ์ความรุนแรง (prognostic marker) ของมะเร็งหลายชนิด (Rangaswami, Bulbule et al. 2006), รวมทั้งมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากศีรษะและลำคอ (Rittling and Chambers 2004, Matsuzaki, Shima et al. 2007)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือเซลล์ไลน์เอชเอ็น-22 (HN-22) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง-สแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากศรีษะและลำคอ โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ที่ถูกเคลือบด้วยสารละลายของไฟโบรเนกติน และทำการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟ-อัลฟา แล้วทำการวัดระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน mRNA และโปรตีน จากการทดลองพบว่า ไฟโบรเนกตินมีผลในการทำให้เซลล์เอชเอ็น-22 ตอบสนองต่อทีเอ็นเอฟ-อัลฟาโดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนได้โดยผ่านทางอินทีกรินรีเซปเตอร์ เบต้า-1 และ ERK

ระเบียบวิธีวิจัย

<u>การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาของมนุษย์</u>

เซลล์ไลน์ HN-22 เตรียมได้จากชิ้นเนื้อมะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาของผู้ป่วย และได้รับความอนุเคราะห์จาก Professors Gutkind JS, NIDCR, NIH, USA โดยเซลล์ไลน์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่เติมสารประกอบดังต่อไปนี้ คือ ซีรัมจากฟีตัสของวัวร้อยละ10 (10% Fetal Bovine Serum), กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-Glutamine), เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml Penicillin), สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (100 mg/ml Streptomycin sulfate), แอมโฟ-เทอริซิน บี 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Amphotericin B 0.25 mg/ml) ในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เซลล์จะถูกถ่ายใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในอัตราส่วน 1:5 สำหรับการเคลือบด้วยไฟโบรเนกตินนั้น จานเลี้ยงเซลล์จะถูกเคลือบด้วยสารละลายของไฟโบรเนกตินที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นจึงดูดส่วนเกินออก แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ที่ปราศจากเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้เลี้ยงเซลล์

การกระตุ้นเซลล์ไลน์ HN-22 ด้วย TNF-α

เซลล์ไลน์ HN-22 จะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 6 หลุมที่ถูกเคลือบหรือไม่ได้ถูกเคลือบด้วยไฟโบรเนกติน และปล่อยให้เซลล์เกาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ไม่มีซีรั่มอีก 6 ชั่วโมงก่อนจะทำการกระตุ้นด้วย 0, 0.1, 1, and 10 ng/ml TNF-α (Chemicon International, Temecula, CA, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเซลล์จะถูกผสมกับแอนติบอดีที่ยับยั้งต่ออินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า 1 (neutralizing antibody against β1 integrin 1) ng/ml หรือ แอนติบอดีที่กระตุ้นอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า 1 (activating β1 integrin) 2 ng/ml (Chemicon International, Temecula, CA, USA) ก่อนจะหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์ สำหรับการทดลองที่ทดสอบ inhibitor ชนิดต่างๆ ได้แก่ 2 μM of MAPK/extracellular signal-regulated kinase (MEK) inhibitor หรือ 10 nM of NF-κB inhibitor จะถูกเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 30 นาทีก่อนการกระตุ้นด้วย TNF-α

การศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ไลน์HSCโดยวิธี MTT assay

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50000 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม และเลี้ยงต่อไปอีก 48 ชั่วโมง ในการทดลองจะเป็นการเปรียบเทียบเซลล์ที่เลี้ยงในหลุมที่ไม่ได้เคลือบ กับหลุมที่เคลือบด้วยไฟโบรเนกติน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกดูดออกแล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายด์ 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (Thiazolyl blue, Sigma, MO, USA) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและฟีนอลเรด ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง ทำการดูดสารละลาย MTT ออก แล้วทำละลายผลึกสีม่วงเข้มของ formazan ด้วยสารละลายผสมระหว่างไกลซีนบัฟเฟอร์และ DMSO (Dimethylsulfoxide, Merck, Darmstradt, Germany) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายใสสีม่วง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาจำนวนเซลล์

จากกราฟมาตรฐาน ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

กราฟมาตรฐานทำขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยวิธีข้างต้น ค่าที่ได้จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ทราบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสง

<u>การวิเคราะห์ระดับของอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)</u>

RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเตรียมโดยใช้ TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต และนำไปสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription) ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega) และ oligodT primer (Promega, USA) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR (polymerase chain reaction) โดยการใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จาก GenBank ผ่านทาง website ของ และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง

OPN	forward: 5’AGTACCCTGATGCTACAGACG3’
	reverse: 5’CAACCAGCATATCTTCATGGC3’
GAPDH	forward: 5’TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT3’
	reverse: 5’TCACACCCATGACGAACATGG3’

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 2 และแถบความเข้มจะถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม Scion Image Analysis (NIH, USA)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบเวสเทอร์น (Western Blot Analysis)

เซลล์และเมทริกซ์จะถูกทำละลาย (extracted) ด้วย RIPA buffer จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปริมาณโปรตีนโดยชุดวัดโปรตีน BCA (Pierce, USA) สารละลายที่มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากันจากแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกแยกด้วยไฟฟ้าในอะคริลามายด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) จากนั้นโปรตีนจะถูกถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ด้วยกระแสไฟฟ้า (electroblotting) แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ต่อโปรตีนที่ศึกษา จากนั้นจึงย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่ติดสลากด้วยไบโอติน (biotin) และตรวจสอบโดยการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ในสารละลายสเตรบตาวิดิน (streptavidin) ติดสลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) แล้วจึงเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลส ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (Chemiluminescence detection system) เพื่อตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ (auto-fluorography)

ผลงานวิจัย

ทีเอ็นเอฟ-อัลฟากระตุ้นการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนได้ในภาวะที่มีไฟโบรเนกติน

เราเริ่มทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ไลน์เอชเอ็น-22 บนจานเลี้ยงเซลล์ที่ถูกเคลือบด้วยสารละลายของไฟโบรเนกติน และจานเลี้ยงเซลล์พลาสติก และทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดจากจำนวนเซลล์ โดยใช้เทคนิค MTT assay ซึ่งผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์ในทั้งสองสภาวะไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าไฟโบรเนกตินไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เอชเอ็น-22 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเติมทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ng/ml ลงบนเซลล์ที่เลี้ยงอยู่บนไฟโบรเนกตินก็ไม่มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์เช่นกัน

จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบว่ามีระดับเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งที่การแพร่กระจาย โดยทำการกระตุ้นเซลล์เอชเอ็น-22 ด้วยทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในภาวะที่มีหรือไม่มีไฟโบรเนกติน พบว่าทีเอ็นเอฟ-อัลฟาไม่มีผลในการเพิ่มระดับของออสทีโอพอนทีน เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงอยู่บนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติก แต่ในภาวะที่มีไฟโบรเนกติน ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาสามารถส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน mRNA ได้แบบ dose-dependent manner (รูปที่ 2)

ในการทดลองต่อมาเราจึงเลือกใช้ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่ความเข้มข้น 10 ng/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เห็นผลชัดที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยพบว่าไฟโบรเนกตินสามารถส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟ-อัลฟาได้ทั้งในระดับของ mRNA (รูปที่ 3A) และโปรตีน (รูปที่ 3B) ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบเช่นเดียวกันในเซลล์ HaCat (human keratinocyte cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของเยื่อบุผิวปกติ พบว่าทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ไม่มีผลต่อระดับออสทีโอพอนทีนทั้งในภาวะที่มีและไม่มีไฟโบรเนกติน (รูปที่4) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากไฟโบรเนกติน และ

ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่มาควบคุมการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนในเซลล์มะเร็งคาร์ซิโนมาของศีรษะและลำคอ

ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาและไฟโบรเนกตินกระตุ้นการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนโดยผ่านทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1

เนื่องจากสัญญาณจากไฟโบรตินซึ่งเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์นั้นจะผ่านมาทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ ดังนั้นเราจึงใช้แอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่ออินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 เพื่อแสดงถึงบทบาทของอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 ในสัญญาณจากไฟโบรเนกตินที่มาควบคุมการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน ผลการทดลองพบว่า แอนตีบอดีที่มีผลยับยั้งอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 สามารถลดระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน mRNA (รูปที่ 5A) และโปรตีน (รูปที่ 5B) ที่ถูกกระตุ้นด้วย ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาในภาวะที่มีไฟโบรเนกตินได้ ในขณะที่แอนตีบอดีเพียงตัวเดียวไม่มีผลทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลง

เพื่อเป็นการยืนยันถึงสัญญาณของไฟโบรเนกตินที่ผ่านมาทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า 1 เราได้ทำการทดลองกระตุ้นเซลล์ด้วยแอนตีบอดีที่มีผลกระตุ้นอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 ร่วมกับ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาบนจานเลี้ยงเซลล์พลาสติก พบว่าระดับการแสดงออกของออสทีโอ-พอนทีนเพิ่มขึ้นได้แม้ในภาวะที่ไม่มีไฟโบรเนกติน (รูปที่ 5) จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสัญญาณของไฟโบรเนกตินและทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่มีผลกระตุ้นระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนนั้นน่าจะผ่านมาทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1

สัญญาณการกระตุ้นจาก MAPK จำเป็นต่อการกระตุ้นการแสดงออกของของออสทีโอพอนทีนโดย ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาและไฟโบรเนกติน

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า สัญญาณจากทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่มากระตุ้นเซลล์มะเร็งนั้นผ่านมาทาง MAPK และ NF-κB (Rivas, Carnevale et al. 2008) เราจึงทำการศึกษาระดับการ

แสดงออกของ ออสทีโอพอนทีน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR และ western blot ในเซลล์ไลน์เอชเอ็น-22 ที่ใส่สารยับยั้งการทำงานของ MAPK (MEK inhibitor) หรือ NF-κB inhibitor ก่อนทำการกระตุ้นด้วย ไฟโบรเนกติน และทีเอ็นเอฟ-อัลฟา โดยพบว่า MEK inhibitor สามารถลดระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนในระดับ mRNA (รูปที่ 6A) และโปรตีน (รูปที่ 6B) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.005$) ในขณะที่ NF-κB inhibitor ไม่มีผลต่อการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน นอกจากนี้ยังได้แสดงผลของ MEK inhibitor ที่สามารถลดระดับระดับฟอสโฟรีเลชั่น ของเอิร์ค (phosphorylation of ERK) เพื่อเป็นการยืนยันถึงบทบาทของ MAPK ในสัญญาณการกระตุ้นโดย ไฟโบรเนกติน และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา

ไฟโบรเนกติน และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟามีผลในการส่งเสริมระดับ phosphorylation of ERK

เมื่อศึกษาระดับ phosphorylation of ERK ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายตัวหนึ่งของ MAPK ในเซลล์ไลน์เอชเอ็น-22 ที่ทำการกระตุ้นด้วย ไฟโบรเนกติน และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา พบว่าระดับ phosphorylation of ERK จะเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยไฟโบรเนกติน หรือ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟาตัวใดตัวหนึ่ง แต่จะมีระดับเพิ่มมากขึ้นเมื่อกระตุ้นทั้งสองตัวพร้อมกัน (รูปที่ 7A)

จากผลการวิจัยในที่พบว่าสัญญาณของไฟโบรเนกตินและ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟามีผลกระตุ้นระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนนั้นผ่านมาทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาต่อถึงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 และ ERK โดยพบว่าแอนตีบอดีที่มีผลยับยั้งอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 สามารถลดระดับ phosphorylation of ERK ในภาวะที่มีไฟโบรเนกตินและทีเอ็นเอฟ-อัลฟาได้ (รูปที่ 7B) นอกจากนี้เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยแอนตีบอดีที่มีผลกระตุ้น อินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1 พร้อมกับทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ก็สามารถเพิ่มระดับ phosphorylation of ERK ได้เช่นกัน (รูปที่ 7C)

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสัญญาณของไฟโบรเนกตินและทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่มีผลกระตุ้นระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนในเซลล์ไลน์เอชเอ็น-22 นั้นน่าจะผ่านมาทางอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า1และ ERK

บทวิจารณ์

ถึงแม้ว่าสัญญาณจากอินทีกรินรีเซบเตอร์และโกร๊ทแฟกเตอร์จะสามารถทำงานเป็นอิสระจากกัน แต่ก็มีรายงานที่แสดงถึงการทำงานร่วมกันของสัญญาณทั้งสองที่มีผลต่อการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพหลายด้าน เช่น การเจริญของหลอดเลือดขณะที่มีพัฒนาการในทารก รวมทั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเนื้องอก (Eliceiri 2001) ทางคณะผู้ศึกษาเคยรายงานถึงสัญญาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่มีต่ออินซูลินไลค์โกร๊ทแฟกเตอร์ ในการควบคุมระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ (Chutivongse, Sumrejkanchanakij et al. 2005) นอกจากนี้ Choung และคณะได้แสดงให้เห็นว่าการยึดเกาะกับไฟโบรเนกตินมีผลในการส่งเสริมการงอกยาวของเส้นประสาท (neurite outgrowth) ที่ถูกกระตุ้นโดยไฟโบรบลาสโกร๊ทแฟกเตอร์ ในเซลล์ PC12 (Choung, Seo et al. 2002) ส่วนในด้านของทีเอ็นเอฟ-อัลฟา มีการทดลองในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์ พบว่าสัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์ร่วมกับทีเอ็นเอฟ-อัลฟามีผลลดการเคลื่อนที่ของทีเซลล์ (T cell) เข้าหาสิ่งกระตุ้น (Franitza, Hershkoviz et al. 2000)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสัญญาณจากไฟโบรเนกตินมีอิทธิพลต่อการควบคุมระดับออสทีโอพอนทีนที่ถูกกระตุ้นโดยทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ในขณะที่การการะตุ้นด้วยไฟโบรเนกตินหรือทีเอ็นเอฟ-อัลฟาเพียงอย่างเดียวไม่มีผล ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสัญญาณการกระตุ้นจากทีเอ็นเอฟ-อัลฟา จะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยสัญญาณการเกาะระหว่างเซลล์และไฟโบรเนกติน หรืออีกนัยหนึ่งสัญญาณจากไฟโบรเนกตินสามารถช่วยส่งเสริมสัญญาณการกระตุ้นจากทีเอ็นเอฟ-อัลฟาได้ โดยทั่วไปปฏิกิริยาโต้ตอบ (interaction) ระหว่างสัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์และโกร๊ทแฟกเตอร์นั้นอาจจะเกิดขึ้นได้ใน 2 ระดับ คือระดับของรีเซบเตอร์ โดยจะเกิดการจับกันโดยตรงของรีเซบเตอร์ทั้งสอง (direct physical interaction) เกิดเป็นโมเลกุลที่มีโครงสร้างซับซ้อน (macrololecular complex) และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ posttranslational modification ตำแหน่ง หรือการทำงานของรีเซบเตอร์อีกตัวหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งอาจเกิดขึ้นในระดับของการกระตุ้นโมเลกุลเป้าหมาย (downstream signaling molecule) โดย

ผลลัพธ์จากสัญญาณการกระตุ้นผ่านรีเซบเตอร์ทั้งสอง อาจจะถูกส่งผ่านไปกับเอนไซม์ในกลุ่ม kinase หรือ adaptor protein ไปกระตุ้นโมเลกุลเป้าหมายเดียวกัน ทำให้ระดับการกระตุ้นนั้นสูงเกินขีดจำกัดของเซลล์ (threshold) และทำให้เห็นผลการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ได้ (Fashena and Thomas 2000, Yamada and Even-Ram 2002, ffrench-Constant and Colognato 2004)

สัญญาณจากจากเมทริกซ์นอกเซลล์และโกร๊ทแฟกเตอร์สามารถทำงานร่วมกันในการกระตุ้นส่งสัญญาณผ่านได้หลายทางได้แก่ Rho family GTPase, Ras-Raf-MAPK, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ribosomal S6 kinase (RSK) และ Jun amino-terminal kinase (JNK) (reviewed in Schwartz and Ginsberg 2002) มีการศึกษาที่พบว่าเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของมนุษย์ที่เลี้ยงแบบมีการยึดเกาะจะมีการตอบสนองต่อทีเอ็นเอฟ-อัลฟา โดยการกระตุ้นสัญญาณผ่านมาทาง JNK ได้มากกว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงแบบแขวนลอย (Short, Talbott et al. 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานส่งเสริมกัน (Synergistic effect) ระหว่างสัญญาณจากโกร๊ทแฟกเตอร์ และสัญญาณจากการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสในการกระตุ้นผ่านมาทาง MAPK (Renshaw, Ren et al. 1997, Lin, Chen et al. 1997) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของเราที่พบว่า สัญญาณจากไฟโบรเนกตินและทีเอ็นเอฟ-อัลฟา มีผลในการส่งเสริมซึ่งกันและกันผ่านมาทาง ERK ซึ่งเห็นได้จากผลในการเพิ่มระดับ phosphorylation of ERK ในขณะที่ MEK inhibitor เองก็มีผลในการลดระดับออสทีโอพอนทีนที่ถูกกระตุ้นด้วยไฟโบรเนกตินและทีเอ็นเอฟ-อัลฟา โดยมีรายงานที่กล่าวสนับสนุนว่า โปรตีนในกลุ่ม cytosolic tyrosine kinase คือ Focal adhesion kinase (FAK) เป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่เชื่อมสัญญาณระหว่างโกร๊ทแฟกเตอร์และอินทีกรินรีเซบเตอร์ (Sieg, Hauck et al. 2000, Ivankovic-Dikic, Gronroos et al. 2000, Moro, Dolce et al. 2002) ซึ่งผลร่วมกันในการกระตุ้นการทำงานของ FAK นี้จะทำให้ FAK สามารถจับกับ Adaptor protein ในกลุ่ม Grb-2 ได้และนำไปสู่การกระตุ้น MAPK ในที่สุด (Schlaepfer, Broome et al. 1997) ซึ่งเราคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ในระดับของรีเซบเตอร์ ว่าสัญญาณที่ส่งเสริมกัน

นั้นเกิดจากการจับกลุ่มกันของอินทีกรินรีเซบเตอร์เมื่อมีการยึดเกาะระหว่างเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งจะมีผลในการดึงเอาโกร๊ทแฟกเตอร์รีเซบเตอร์มารวมกัน (recruit) ที่บริเวณที่เกิดจุดที่เกิดการยึดเกาะ (focal adhesion) และส่งเสริมให้เกิดการ phosphorylation ของ Adaptor protein บางตัวนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของโกร๊ทแฟกเตอร์รีเซบเตอร์หรือไม่

ถึงแม้จะมีรายงานที่แสดงว่าไฟโบรเนกตินเองมีผลในการส่งเสริมการเคลื่อนที่และการแทรกซึมของเซลล์มะเร็ง โดยการกระตุ้นเอ็นไซม์ MMP-9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ได้ทุกชนิด และมีความเกี่ยวข้องการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Thant, Nawa et al. 2000, Han, Ritzenthaler et al. 2006) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไฟโบรเนกตินเพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนออสทีโอพอนทีนโดยตรง ซึ่งโดยทั่วไปตำแหน่งที่ทำหน้าที่หลักในการจับกับอินทีกรินรีเซบเตอร์อย่างจำเพาะ คือตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโน Arg-Gly-Asp (RGD) ที่พบได้บนสายไฟโบรเนกตินหรือเมทริกซ์นอกเซลล์ตัวอื่นๆเช่น ไวโทรเนกติน (vitronectin) ไฟบริโนเจน (fibrinogen) ทำให้มีการใช้สายกรดอะมิโนสังเคราะห์ (synthetic peptide) ของ RGD เลียนแบบการส่งสัญญาณจากเมทริกซ์นอกเซลล์มาใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของการยึดเกาะระหว่างเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ แต่ภายหลังมีการพบว่าตำแหน่ง pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) ที่อยู่ติดกับตำแหน่งของ RGD บนสายไปรตีนไฟโบรเนกติน มีความสำคัญและทำหน้าส่งเสริมการยึดเกาะกับอินทีกรินรีเซบเตอร์ $\alpha5\beta1$ ซึ่งเป็นรีเซบเตอร์หลักของไฟโบรเนกตินในขบวนการส่งเสริมการเกิดมะเร็ง (Akiyama, Olden et al. 1995) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า 1 มีบทบาทสำคัญในสัญญาณจากไฟโบรเนกตินที่ส่งผลต่อสัญญาณจากทีเอ็นเอฟ-อัลฟาที่มาควบคุมการแสดงออกของออสทีโอพอนทีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่า ไฟโบรเนกตินกระตุ้นการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 ผ่านทาง $\alpha5\beta1$ ในเซลล์ human non-small cell lung carcinoma (Han, Ritzenthaler et al. 2006) และ breast cancer cells (Das, Banerji et al. 2008) แต่อย่างไรก็ตามก็มีบางรายงานที่ศึกษาในเซลล์ไลน์ของ monocyte ของมนุษย์พบว่า ผลของไฟโบรเนกตินร่วมกับทีเอ็นเอฟ-อัลฟา สามารถกระตุ้น

การสร้างออสทีโอพอนทีน โดยไม่ผ่าน อินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า 1 (Vaday, Hershkoviz et al. 2000) ซึ่งรีเซบเตอร์สำหรับไฟโบรเนกตินนั้นมีหลายตัว และรีเซบเตอร์แต่ละตัวอาจทำหน้าที่แตกต่างกันในเซลล์ที่ต่างชนิดกันได้

จากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างสัญญาณจากไฟโบรเนกตินและทีเอ็นเอฟ-อัลฟาในเซลล์มะเร็งสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาจากช่องปาก ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า สัญญาณจากไฟโบรเนกตินสามารถส่งเสริมให้เซลล์มีการตอบสนองต่อทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ในการเพิ่มระดับการแสดงออกของออสทีโอพอนทีนโดยสัญญาณการควบคุมนี้จะผ่านมาทาง อินทีกรินรีเซบเตอร์ เบต้า 1 และ ERK ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้จะเป็นข้อมูลในเบื้องต้นที่แสดงถึงบทบาทของปัจจัยแวดล้อมที่อยู่รอบ ๆเซลล์ โดยเฉพาะเมทริกซ์นอกเซลล์ และโกร๊ทแฟกเตอร์ ที่มีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมหรือรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

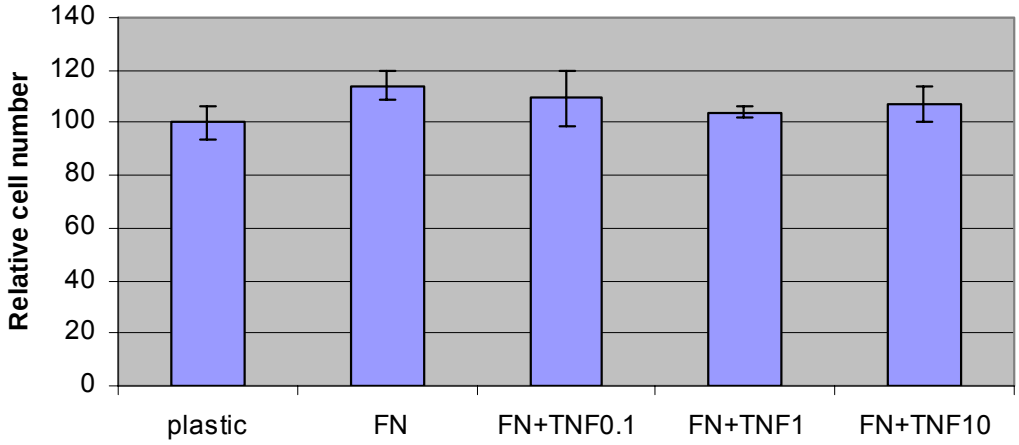


Figure 1 The effect of fibronectin(FN) and TNF-α on cell proliferation. HN-22 cells were plated on plastic or FN-coated culture dishes in the presence of TNF-α at 0.1, 1 and 10 ng/ml. The cell number was measured by MTT assay. The data are represented as means ± SD relative to the control from three independent experiments.

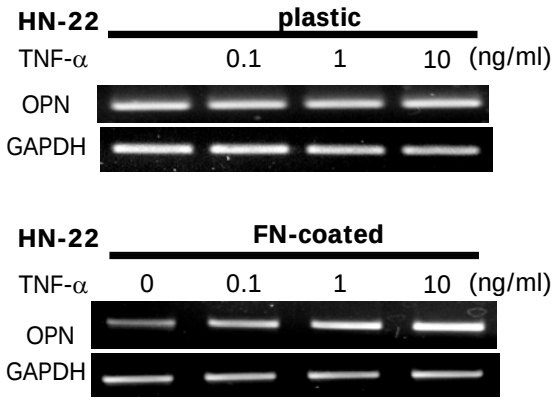


Figure 2 The effect of TNF-α and FN on OPN expression. HN-22 cells were plated on plastic or FN-coated plate and treated with TNF-α at 0.1, 1 and 10 ng/ml for 24 hours and examined the level of OPN and GAPDH mRNA by RT-PCR.

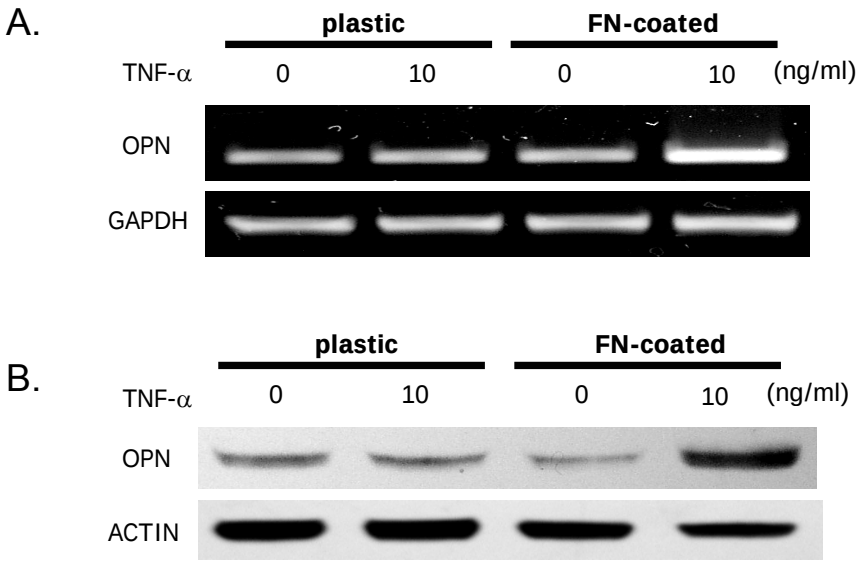


Figure 3 TNF-α significantly increased OPN expression in the presence of FN. HN-22 cells were treated with TNF-α at 10 ng/ml for 24 hours in the presence or absence of FN. The cell extract was collected and assessed for OPN mRNA expression (A) and OPN protein expression (B).

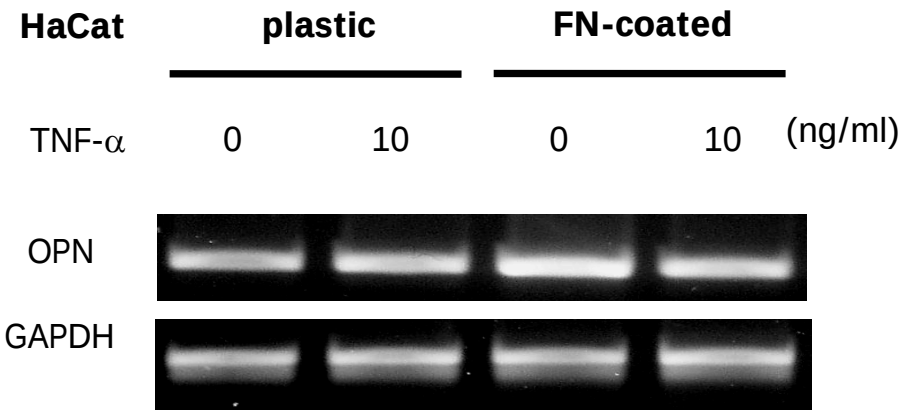


Figure 4 Fibronectin TNF-a could not induce OPN expression in the presence of fibronectin in human keratinocyte cell line. HaCat cells were treated as in figure 3 and analyzed for OPN mRNA.

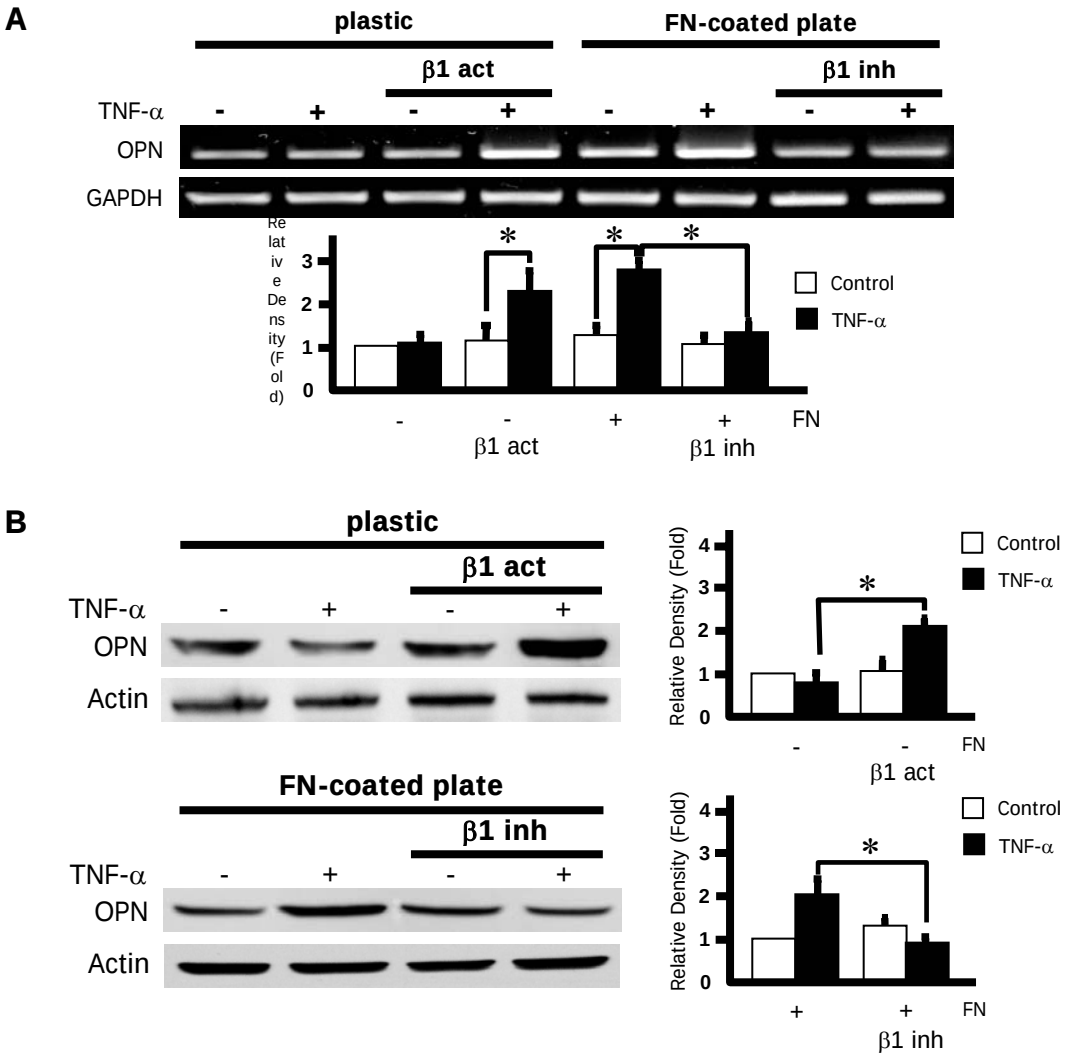


Figure 5 The effect of antibody specific to integrin receptor β1 on OPN expression in HN-22.

HN-22 cells were incubated with inhibitory antibody to integrin receptor β1 (β1 inh) or activating antibody to integrin receptor β1 (β1 act) for 30 minutes before plated on plastic or FN-coated plate, and then treated with TNF–α at 10 ng/ml. The cell extracts were collected 24 hours after treatment and assessed for OPN mRNA (A) and protein expression (B). *, indicate significant difference ($p < 0.05$).

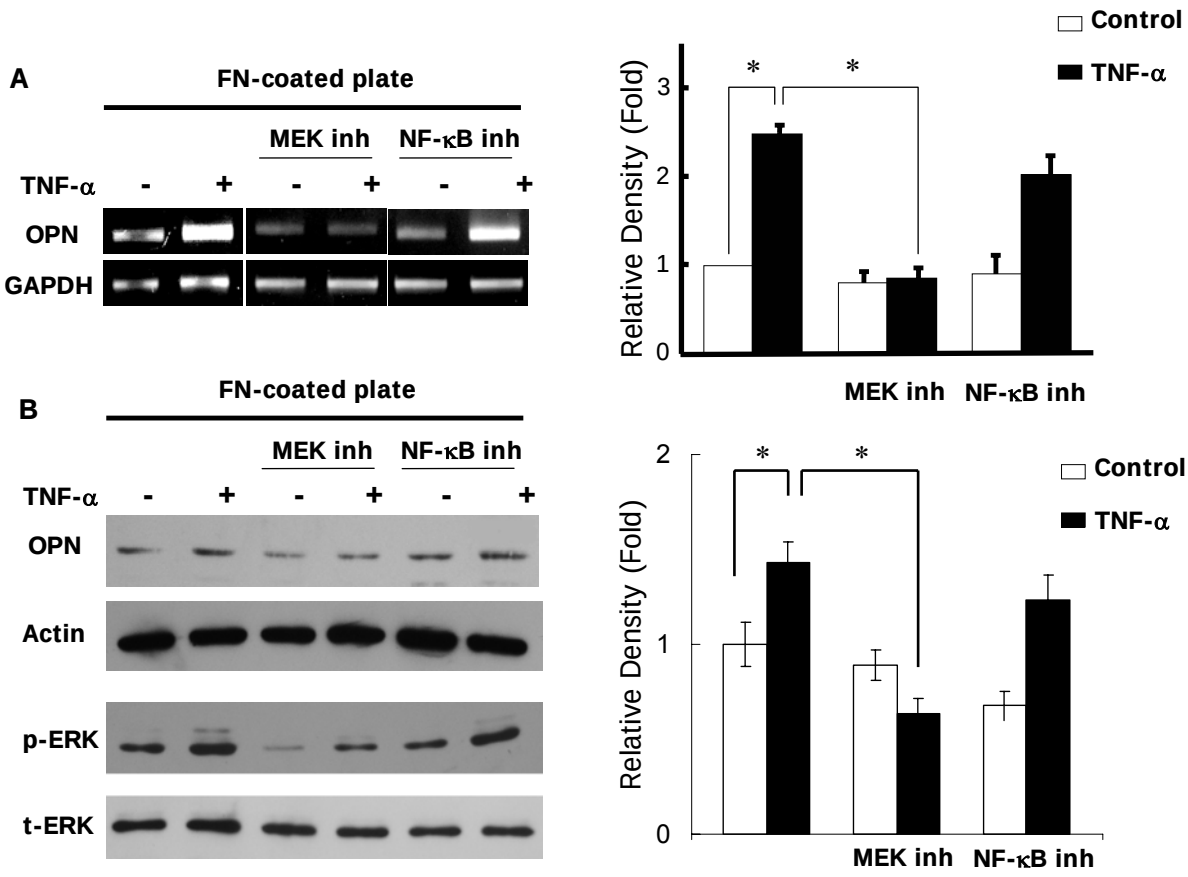


Figure 6 The effect of inhibitor of MEK and NF-κB on OPN expression in HN-22 cells. HN-22 cells were treated with 2 μM of MEK inhibitor or 10 nM of NF-κB inhibitor for 30 min prior to application of 10 ng/ml TNF-α for another 24 h. The cell extracts were analyzed for RT-PCR (A) and Western blot analysis (B). Graphs show the quantification of OPN expression which normalized to the GAPDH or β-actin. To detect phosphorylated (p-ERK) and total ERK (t-ERK), the cell extract was collected 15 min after adding TNF-α. The results are indicated by the mean ± SD relative to the control from three independent experiments.). *, indicate significant difference ($p < 0.05$).

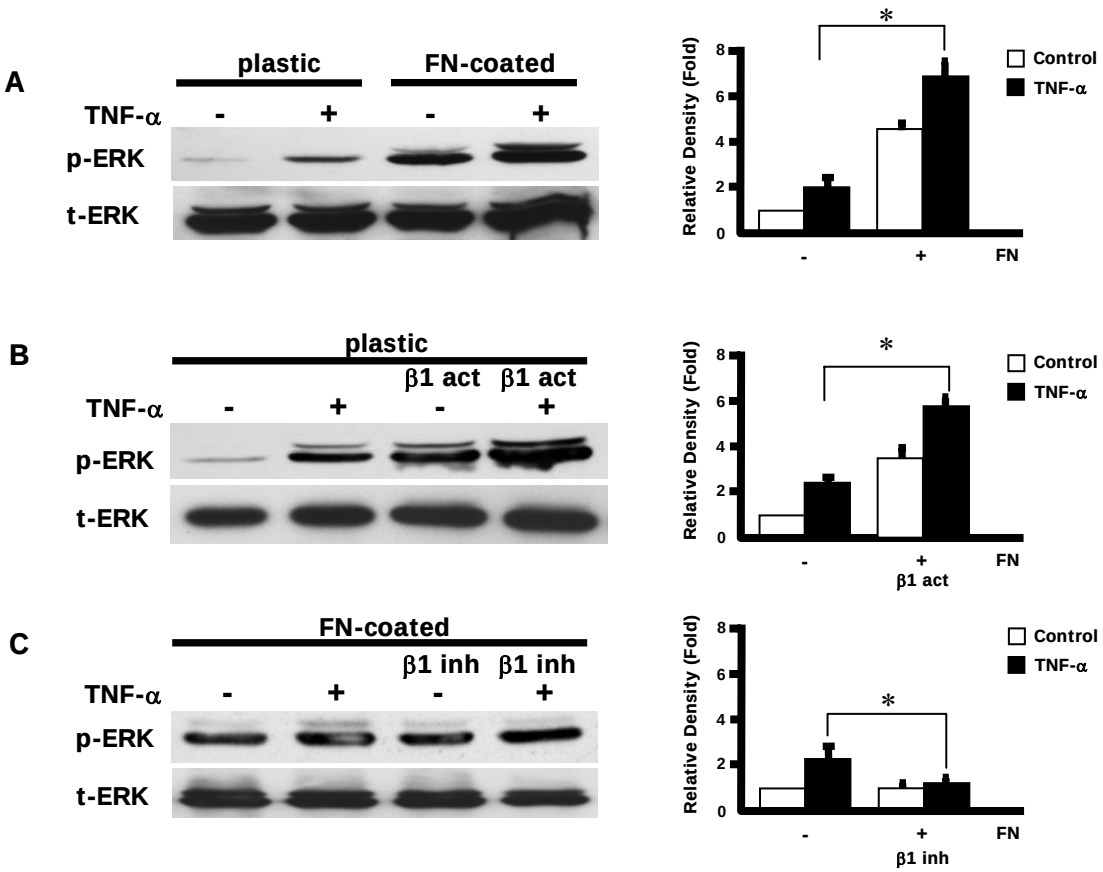


Figure 7 Activation of ERK phosphorylation by FN and TNF-α. (A) HN-22 cells were stimulated with 10 ng/ml TNF-α in the presence or absence of FN for 15 min. The cell lysates were analyzed by western blotting with anti-phospho ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibody. Inhibitory (B) or activating antibody (C) to β1 integrin were added to the cells as in figure 5B. Graphs show the quantification of phosphorylated ERK1/2 which normalized to total ERK. *, indicate significant difference ($p < 0.05$).

เอกสารอ้างอิง

Akiyama, S. K., K. Olden, et al. (1995). "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 173-89.

Ashkenas, J., J. Muschler, et al. (1996). "The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla." Dev Biol **180**(2): 433-44.

Assoian, R. K. and M. A. Schwartz (2001). "Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 48-53.

Balkwill, F. (2006). "TNF-alpha in promotion and progression of cancer." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 409-16.

Choo, M. K., H. Sakurai, et al. (2005). "Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF-alpha promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway." Cancer Lett **230**(1): 47-56.

Choung, P. H., B. M. Seo, et al. (2002). "Synergistic activity of fibronectin and fibroblast growth factor receptors on neuronal adhesion and neurite extension through extracellular signal-regulated kinase pathway." Biochem Biophys Res Commun **295**(4): 898-902.

Chutivongse, N., P. Sumrejkanchanakij, et al. (2005). "Insulin-like growth factor-I attenuates the inhibitory effect of type I collagen through beta1 integrin receptor." Biochem Biophys Res Commun **336**(3): 836-41.

Das, S., A. Banerji, et al. (2008). "Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium." Life Sci **82**(9-10): 467-76.

Eliceiri, B. P. (2001). "Integrin and growth factor receptor crosstalk." Circ Res **89**(12): 1104-10.

Fashena, S. J. and S. M. Thomas (2000). "Signalling by adhesion receptors." Nat Cell Biol **2**(12): E225-9.

ffrench-Constant, C. and H. Colognato (2004). "Integrins: versatile integrators of extracellular signals." Trends Cell Biol **14**(12): 678-86.

Franitza, S., R. Hershkoviz, et al. (2000). "TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells." J Immunol **165**(5): 2738-47.

Gannot, G., A. Buchner, et al. (2004). "Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice." Oral Oncol **40**(3): 287-97.

Gardner, H. A., B. Berse, et al. (1994). "Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed Rat1 fibroblasts." Oncogene **9**(8): 2321-6.

Han, S., J. D. Ritzenthaler, et al. (2006). "Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells." J Biol Chem **281**(40): 29614-24.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.

Ivankovic-Dikic, I., E. Gronroos, et al. (2000). "Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins." Nat Cell Biol **2**(9): 574-81.

Lin, T. H., Q. Chen, et al. (1997). "Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases." J Biol Chem **272**(14): 8849-52.

Liu, H., B. Chen, et al. (1998). "Soluble fibronectin promotes migration of oral squamous-cell carcinoma cells." Int J Cancer **78**(2): 261-7.

Lukashev, M. E. and Z. Werb (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol **8**(11): 437-41.

Matsuzaki, H., K. Shima, et al. (2007). "Osteopontin as biomarker in early invasion by squamous cell carcinoma in tongue." J Oral Pathol Med **36**(1): 30-4.

Miyamoto, S., S. K. Akiyama, et al. (1995). "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function." Science **267**(5199): 883-5.

Morla, A., Z. Zhang, et al. (1994). "Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin." Nature **367**(6459): 193-6.

Moro, L., L. Dolce, et al. (2002). "Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines." J Biol Chem **277**(11): 9405-14.

Nanki, N., J. Fujita, et al. (2001). "Expression of oncofetal fibronectin and syndecan-1 mRNA in 18 human lung cancer cell lines." Tumour Biol **22**(6): 390-6.

Philip, S., A. Bulbule, et al. (2001). "Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells." J Biol Chem **276**(48): 44926-35.

Rangaswami, H., A. Bulbule, et al. (2006). "Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression." Trends Cell Biol **16**(2): 79-87.

Renshaw, M. W., X. D. Ren, et al. (1997). "Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion." Embo J **16**(18): 5592-9.

Rittling, S. R. and A. F. Chambers (2004). "Role of osteopontin in tumour progression." Br J Cancer **90**(10): 1877-81.

Rivas, M. A., R. P. Carnevale, et al. (2008). "TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways." Exp Cell Res **314**(3): 509-29.

Schlaepfer, D. D., M. A. Broome, et al. (1997). "Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins." Mol Cell Biol **17**(3): 1702-13.

Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg (2002). "Networks and crosstalk: integrin signalling spreads." Nat Cell Biol **4**(4): E65-8.

Short, S. M., G. A. Talbott, et al. (1998). "Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells." Mol Biol Cell **9**(8): 1969-80.

Sieg, D. J., C. R. Hauck, et al. (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." Nat Cell Biol **2**(5): 249-56.

Szlosarek, P., K. A. Charles, et al. (2006). "Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter." Eur J Cancer **42**(6): 745-50.

Szlosarek, P. W. and F. R. Balkwill (2003). "Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours." Lancet Oncol **4**(9): 565-73.

Thant, A. A., A. Nawa, et al. (2000). "Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells." Clin Exp Metastasis **18**(5): 423-8.

Vaday, G. G., R. Hershkoviz, et al. (2000). "Fibronectin-bound TNF-alpha stimulates monocyte matrix metalloproteinase-9 expression and regulates chemotaxis." J Leukoc Biol **68**(5): 737-47.

Viac, J., D. Schmitt, et al. (1995). "Expression of adhesion receptors in epidermal tumors: correlation with TNF alpha expressing cells." Anticancer Res **15**(2): 551-5.

Wai, P. Y. and P. C. Kuo (2004). "The role of Osteopontin in tumor metastasis." J Surg Res **121**(2): 228-41.

Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

Wasenius, V. M., S. Hemmer, et al. (2003). "Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study." Clin Cancer Res **9**(1): 68-75.

Yamada, K. M. and S. Even-Ram (2002). "Integrin regulation of growth factor receptors." Nat Cell Biol **4**(4): E75-6.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การนำเสนอผลงานวิชาการ ในการประชุม FDI Annual World Dental Congress ที่ประเทศ Dubai วันที่ 24-27 ตุลาคม 2550 เรื่อง “Fibronectin regulates TNF-α induced osteopontin expression in squamous cell carcinoma”
2. บทความวิจัยสำหรับการตีพิมพ์ (manuscript) ในวารสาร Archives of Oral Biology

ภาคผนวก

บทความวิจัยสำหรับการตีพิมพ์ (manuscript)

Combination effect of fibronectin and TNF-α on osteopontin expression through β1 integrin and ERK in head and neck squamous cell carcinoma

Piyamas Sumrejkanchanakij*, Ruchadaporn Kaomongkolgit, Prasit Pavasant

Department of Anatomy, Faculty of Dentistry,

Chulalongkorn University

Henri-Dunant Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

* Corresponding author:

Piyamas Sumrejkanchanakij

Department of Anatomy, Faculty of Dentistry,

Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road,

Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

Phone: +66-2-218-8885

Fax: +66-2-218-8870

E-mail: piyamas.S@chula.ac.th

Abstract

Extracellular matrix (ECM) and growth factor signaling networks are known to interact in a complex manner and modulate behavior of the cells. Herein, we investigated the influence of fibronectin (FN) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) on OPN expression in HN-22, a head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line. The data showed that TNF-α significantly increased OPN expression only in the FN-coated condition. Application of neutralizing antibody against β1 integrin abolished the OPN induction. Moreover, TNF-α when added together with activating β1 integrin is sufficient to induced OPN expression. The combination effect of FN and TNF-α was significantly inhibited by a MEK, but not NF-κB inhibitor. We further demonstrated that the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) was strongly enhanced by TNF-α and FN compared to application either one alone. Synergistic effect on ERK1/2 phosphorylation was also detected TNF-α by and activating β1 integrin, whereas inhibitory antibody to β1 integrin abrogated FN and TNF-α-induced phosphorylation of ERK1/2. These results indicate that the combination effect of TNF-αand FN on OPN induction is mediated by β1 integrin and ERK pathway, and suggest the critical role of FN in concert to TNF-α on the response of HNSCC cells.

Key words: Squamous cell carcinoma, Fibronectin, Tumor necrosis factor-alpha, Osteopontin, Integrin

Introduction

Tumor micro-environment, the substances surrounded tumor cells including ECM, growth factors hormones and cytokines, are know as an important regulators of cellular functions. There are enormous scientific and clinical researches in elucidating the effect of each regulator on the behavior of tumor cells. Recently, the field of research in carcinogenesis has focused on the complex interactions of these regulators especially the reciprocal crosstalk between ECM and growth factors signaling systems (Schwartz and Ginsberg 2002). Growth factor-induced proliferation, differentiation and migration have been shown to require cell adhesion to ECM surrounded it. On the other hand, growth factors can induce adhesion molecules to propagate adhesion-independent signals.

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) was a proinflammatory mediator and has a capacity to induce apoptosis of tumor cells as its name. Although TNF-α mostly secreted by activated macrophage, it also produced by a various cells including fibroblasts, astrocytes, keratinocytes, tumor cells and stromal cells (Szlosarek and Balkwill 2003, Balkwill, 2006). Increasing evidences implicate TNF-α as a critical bridging inflammation and tumorigenesis. TNF-α was expressed by the transformed epithelium and thus probably plays a crucial role in tumor progression (Gannot, Buchner et al. 2004). TNF-α has been confirmed in the tumor micro-environment in the following malignancies: breast, ovarian, colorectal, prostate, oesophagus, melanoma and leukemias (Viac, Schmitt et al. 1995, Szlosarek and Balkwill 2003). TNF-α triggers several intracellular signaling pathways such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), Akt and NF-κB pathways (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). It has

been shown that TNF-α regulate tumor cell migration, invasion, apoptosis and angiogenesis, which are the hallmark of metastasis, through the classical MAPK, extracellular signal-signal-regulated kinase (ERK) in colon cancer cells (Choo, Sakurai et al. 2005).

Tumor cells encounter a wide variety of ECM and basement membrane molecules as they penetrate and migrate through tissue during the metastasis process. One ECM molecule that has been studied for its role in metastasis and invasion is Fibronectin (FN). FN can act as substrates for adhesion and spreading, thereby promoting cell migration during tumor progression (Morla, Zhang et al. 1994). In addition, FN is a principle component found in the ECM surrounding tumor cells promotes migration of oral squamous carcinoma cells (Liu, Chen et al. 1998). The signal from ECM is meditated through integrin receptors, which are heterodimeric receptors consisting of α and β subunits (Hynes 2002). FN interacts with a number of integrins, including α3β1, α4β1, α5β1, αvβ1, αvβ3 and αvv6, although the major FN receptor which responsible for tumor cell invasion is α5β1 (Akiyama, Olden et al. 1995, Assoian and Schwartz 2001)

The role of either TNF-α or FN alone on the tumor cell function has been reported, however, there is no direct evidence of the cooperative effect of both FN and TNF-α. Therefore, the aim of the present study was to investigate the influence of FN and TNF-α and their signaling pathway on the modulation of OPN expression in human head and neck squamous carcinoma cell line (HNSCC). Osteopontin (OPN), a member of the small integrin binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING) family, plays an important role in tumor cell invasion due to its capacity to regulates the activity of at least two ECM degrading protein,

matrix mettaloproteinase-2 (MMP-2) and urokinase plasminogen activator (u-PA) (Philip, Bulbule et al. 2001, Wai and Kuo 2004). The expression of OPN is significantly and consistently high during tumor progression and metastasis (Matsuzaki, Shima et al. 2007). Moreover, overexpression of OPN results in an increase in the malignant phenotype, whereas transfection with antisense oligonucleotides yields a population with a reduced malignant potential (Gardner, Berse et al. 1994). Several lines of evidence indicated that OPN might be considered as a candidate prognostic marker in human cancers (Rangaswami, Bulbule et al. 2006) including HNSCC (Rittling and Chambers 2004, Matsuzaki, Shima et al. 2007). We showed here that FN support TNF-α on induction of OPN expression through β1 integrin and ERK pathway.

Results

Combination effect of FN and TNF-α on osteopontin expression in HN-22 cells.

We first determined the effect of TNF-α and FN on OPN expression in HN-22 cell line. The results in Figure 1A demonstrated that OPN mRNA expression was not altered after treated with various dose of TNF-α. Interestingly, TNF-α could activate OPN mRNA and protein expression dose-dependently when the cells were plated on FN-coated dish (Figure 1B and 1C respectively). Conversely, RT-PCR analysis from HaCat cells in Fig. 1D showed that TNF-α could not activate OPN mRNA expression even though in the presence of fibronectin. We also confirmed that the treatment with various concentration of TNF-α used in this study had no effect on cell number (data not shown).

FN and TNF-α induced osteopontin expression is mediated by β1 integrin receptor.

Since our data showed that TNF-α could stimulate OPN expression when HN-22 cells were plated on FN-coated dish, we therefore examined the involvement of integrin receptor in the OPN induction mechanism by using an inhibitory and activating antibody specific to β1 integrin. OPN-induced by TNF-α and FN was significantly decreased by inhibitory antibody to β1 integrin as shown in Figure 2A. This result suggests that the cooperative effect of FN and TNF-α on OPN expression is required β1 integrin. We next asked whether signal from β1 integrin is enough to induce OPN expression. Activating β1 integrin when simultaneously applied with TNF-α could stimulate the expression of OPN as

compare to the TNF-α alone. Consistent with mRNA results, Western blotting analysis of OPN protein was shown in Figure 2B.

Activation of MAP kinase is required for the OPN induction by FN and TNF-α.

We further investigate the downstream pathway in the OPN induction by TNF-α and FN. Previous studies have shown that TNF-α induced proliferation of murine mammary tumor cells through the activation of MAPK and nuclear factor-kappaB (NF-κB) transcriptional activation (Rivas, Carnevale et al. 2008). Therefore, HN-22 cells were incubated with MEK and NF-κB inhibitors for 30 min before activated with TNF-α. The results demonstrated that the induction of OPN in both mRNA (Figure 3A) and protein (Figure 3B) levels was significantly inhibited by MEK inhibitor, whilst NF-κB inhibitors had no effect. We also confirmed that the level of ERK phosphoryalation was significantly inhibited by MEK inhibitor.

Synergistyic effect on ERK activation stimulated by FN and TNF-α.

We finally focused on the ERK signaling pathway, because the activation of ERK is associated with the invasion and migration in many cell lines (Krueger, Keshamouni et al. 2001). We do the Western blot analyses to detect the level phosphorylated and total ERK1/2 when stimulated with FN and TNF-α. The results in Figure 4A demonstrated that either FN or TNF-α alone could induce the phosphorylation of ERK1/2. We can speculate the synergistic effects of FN and TNF-α on the phosphorylation of ERK1/2, which increased to

about 6 fold compared to the control. Concomitantly, the additional effect on the phosphorylation of ERK1/2 was detected by activating antibody specific to β1 integrin and TNF-α (Figure 4B). In addition, inhibitory antibody to β1 integrin significantly inhibited the phosphorylated ERK induced by FN and TNF-α. These results suggested that regulation of the ERK phosphorylation by β1 integrin could contribute to the control of OPN activation in response to FN and TNF-α.

Discussion

Although integrins and growth factor receptors can act independently on intracellular signals, the interaction of signals provided by the extracellular matrix (ECM) and growth factors appears to regulate several biological processes, including blood vessel development during embryogenesis as well as tumor growth/metastasis and angiogenesis in the adult (Eliceiri 2001). We previously demonstrated that signal from IGF-I interacted with type I collagen in regulating OPN expression in Human periodontal ligament cells (Chutivongse, Sumrejkanchanakij et al. 2005). Choung and colleagues 2002 has shown that FN-mediated adhesion synergized the effect of FGF-1 on neurite outgrowth in PC12 cells (Choung, Seo et al. 2002). ECM-associated TNF-α provides T cells with effective stop signals during their migration along chemokine gradients created by T cell chemokines, whereas TNF-α lacks proadhesive and chemotactic activities on its own (Franitza, Hershkoviz et al. 2000).

Our study shows for the first time that FN mediated signaling can collaborate TNF-α signaling for regulate OPN expression in HN-22 cells whereas apply either one alone has no effect. It is well documented that integrins and their matrix protein ligands collaborate with growth factor in signal transduction through several pathways. For example, Integrins have direct interaction and activate growth factor receptors by forming a macromolecular complex, or integrins enhance growth factor ligands activation via the same target downstream signaling molecules leading to the acceleration over the threshold level (Fashena and Thomas 2000, Yamada and Evan-Ram 2002, Comoglio, Boccaccio et al. 2003, ffrench-Constant and Colognato 2004). The integration from these signals may target to Rho family

GTPase, Ras-Raf-MAPK, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ribosomal S6 kinase (RSK) and Jun amino- terminal kinase (JNK) (reviewed in (Schwartz and Ginsberg 2002). It has been reported that human endothelial cells cultured in attached-condition has greater response to TNF-α via JNK pathway than in the suspensioned-condition (Short, Talbott et al. 1998). In addition, the synergstic effect between growth factor and cell adhesion in the activation of MAPK has been shown in NIH-3T3 cells (Renshaw, Ren et al. 1997, Lin, Chen et al. 1997). Consistently, we showed here that FN cooperate with TNF-α on ERK phosphorylation, and MEK inhibitor also support this engagement and indicated that the level of phosphorylation of ERK is critical for OPN gene regulation. The cytosolic tyrosine kinase FAK is a candidate for bridging the cytoplasmic tails of growth factor receptors and integrins through its amino and carboxyl termini, respectively (Sieg, Hauck et al. 2000, Ivankovic-Dikic et al. 2000, Moro et al. 2002). Since it ahs been showed that Fn-integrin complexes may recruit a number of growth factor receptors to the focal adhesion, and stimulated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, FAK and result in MAPK activation (Schlaepfer, Broome et al. 1997). Further studies still required to define the collaborative mechanism of FN and TNF-α on MAPK pathway.

FN has been reported to enhance tumor cell migration through the activation of MMP-9 (Thant, Nawa et al. 2000, Han, Ritzenthaler et al. 2006). However, FN has no direct effect ton OPN expression. Fn binds to the integrin through a consensus sequence including the Arg-Gly-Asp (RGD) and pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN), which PHSRN was recently shown to act synergistically on its cell adhesive activity mediated by binding to integrin $\alpha5\beta1$

(Akiyama, Olden et al. 1995). We also applied RGD synthetic peptide together with TNF-α but it failed to induce OPN expression (data not shown). These suggest that RGD sequence is not enough to enhance TNF-α to activate OPN, it might require the additional subregions besides the RGD motif to create three-dimensional structure of FN for the proper function. The involvement of integrin α5β1 in Fn-regulated MMP-9 -9 expression and gelatinolytic activity was described in human non-small cell lung carcinoma (Han, Ritzenthaler et al. 2006) and breast cancer cells (Das, Banerji et al. 2008). Consistent with previous results, we also found that blockage of β1 integrin eliminated the stimulatory effect of FN and TNF-α on OPN and on phosphorylation of ERK suggesting β1 integrin is critical in mediating signal transduction on these processes. However, it was reported that FN-bound TNF-α (FN/TNF-α) significantly up-regulated MMP-9 expression and secretion by the human monocytic cell line, MonoMac-6, and peripheral blood monocytes was independent of binding to β1 integrin (Vaday, Hershkoviz et al. 2000).

In conclusion, we demonstrate the cooperation effect of FN and TNF-α on OPN induction through β1 integrin receptor and ERK signaling pathway. Our studies provides an insight concern of integrate signals from tumor micro-environment on tumor cell behavior. Therefore, it is important to further investigate role of these signaling molecules in regulating tumor metastasis.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (MRG 4980100) and Mineralized Tissue Research Unit, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.

References

Akiyama, S. K., K. Olden, et al. (1995). "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 173-89.

Choo, M. K., H. Sakurai, et al. (2005). "Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF-alpha promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway." Cancer Lett **230**(1): 47-56.

Choung, P. H., B. M. Seo, et al. (2002). "Synergistic activity of fibronectin and fibroblast growth factor receptors on neuronal adhesion and neurite extension through extracellular signal-regulated kinase pathway." Biochem Biophys Res Commun **295**(4): 898-902.

Chutivongse, N., P. Sumrejkanchanakij, et al. (2005). "Insulin-like growth factor-I attenuates the inhibitory effect of type I collagen through beta1 integrin receptor." Biochem Biophys Res Commun **336**(3): 836-41.

Das, S., A. Banerji, et al. (2008). "Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium." Life Sci **82**(9-10): 467-76.

Eliceiri, B. P. (2001). "Integrin and growth factor receptor crosstalk." Circ Res **89**(12): 1104-10.

Fashena, S. J. and S. M. Thomas (2000). "Signalling by adhesion receptors." Nat Cell Biol **2**(12): E225-9.

Franitza, S., R. Hershkoviz, et al. (2000). "TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells." J Immunol **165**(5): 2738-47.

Gannot, G., A. Buchner, et al. (2004). "Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice." Oral Oncol **40**(3): 287-97.

Gardner, H. A., B. Berse, et al. (1994). "Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed Rat1 fibroblasts." Oncogene **9**(8): 2321-6.

Han, S., J. D. Ritzenthaler, et al. (2006). "Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells." J Biol Chem **281**(40): 29614-24.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.

Krueger, J. S., V. G. Keshamouni, et al. (2001). "Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion." Oncogene **20**(31): 4209-18.

Liu, H., B. Chen, et al. (1998). "Soluble fibronectin promotes migration of oral squamous-cell carcinoma cells." Int J Cancer **78**(2): 261-7.

Matsuzaki, H., K. Shima, et al. (2007). "Osteopontin as biomarker in early invasion by squamous cell carcinoma in tongue." J Oral Pathol Med **36**(1): 30-4.

Morla, A., Z. Zhang, et al. (1994). "Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin." Nature **367**(6459): 193-6.

Philip, S., A. Bulbule, et al. (2001). "Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells." J Biol Chem **276**(48): 44926-35.

Rangaswami, H., A. Bulbule, et al. (2006). "Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression." Trends Cell Biol **16**(2): 79-87.

Renshaw, M. W., X. D. Ren, et al. (1997). "Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion." Embo J **16**(18): 5592-9.

Rittling, S. R. and A. F. Chambers (2004). "Role of osteopontin in tumour progression." Br J Cancer **90**(10): 1877-81.

Rivas, M. A., R. P. Carnevale, et al. (2008). "TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways." Exp Cell Res **314**(3): 509-29.

Schlaepfer, D. D., M. A. Broome, et al. (1997). "Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins." Mol Cell Biol **17**(3): 1702-13.

Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg (2002). "Networks and crosstalk: integrin signalling spreads." Nat Cell Biol **4**(4): E65-8.

Short, S. M., G. A. Talbott, et al. (1998). "Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells." Mol Biol Cell **9**(8): 1969-80.

Sieg, D. J., C. R. Hauck, et al. (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." Nat Cell Biol **2**(5): 249-56.

Szlosarek, P. W. and F. R. Balkwill (2003). "Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours." Lancet Oncol **4**(9): 565-73.

Thant, A. A., A. Nawa, et al. (2000). "Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells." Clin Exp Metastasis **18**(5): 423-8.

Vaday, G. G., R. Hershkoviz, et al. (2000). "Fibronectin-bound TNF-alpha stimulates monocyte matrix metalloproteinase-9 expression and regulates chemotaxis." J Leukoc Biol **68**(5): 737-47.

Viac, J., D. Schmitt, et al. (1995). "Expression of adhesion receptors in epidermal tumors: correlation with TNF alpha expressing cells." Anticancer Res **15**(2): 551-5.

Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

Material & Methods

Cell culture

HN-22 cells, human head and neck squamous carcinoma cell line were kindly provided by Professors Gutkind JS (NIDCR, NIH, USA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 5 µg/ml amphotericin B at 37°C in humidified atmosphere of 95% air, 5%CO_2. Medium and supplements were from GibcoBRL (Grand Island, NY, USA).

Preparation of fibronectin-coated plate

Human plasma fibronectin (Invitrogen) was dissolved in sterile distilled water in a concentration of 1 mg/ml. Stock solution was diluted in PBS to a final concentration of 2 µg/cm^2. Before use, six-well culture plates (Corning Incorporated, NY, USA) were coated with a film of fibronectin by a modification technique. Briefly, aliquots of 1 ml per well were dispensed and the plates were shaken overnight at 4°C. The plate were then washed twice with sterilized PBS and air-dried in a laminar flow cabinet at ambient temperature. Normal plastic culture plates were used as a control in this study.

Activation of HN-22 cells with TNF-α

Cells were seeded in 6-well-plates, coated and uncoated with fibronectin, and allowed to attach for 24 h. Cells were then starved in serum-free medium containing 0.02% lactalbumin hydrolysate (Sigma Chemical, St.Louis, MO, USA) for 6 h before further

treatments. Cells were treated with 0, 0.1, 1, and 10 ng/ml TNF-α (Chemicon International, Temecula, CA, USA) in serum-free condition for 24 h.

In the inhibitory and stimulatory experiments, cells were premixed with 1 ng/ml of inhibitory antibody to β1 integrin, 2 μg/ml of activating β1 integrin (Chemicon International, Temecula, CA, USA), 50 μg/ml of RGD; GRGDSP sequence (Sigma Genosys, The woodlands, TX, USA) prior to seeding on culture plate. For another inhibitors, 2 μM of MEK inhibitor or 10 nM of NF-κB inhibitor was added in culture for 30 min prior to application of 10 ng/ml TNF-α for another 24 h.

RNA extraction and Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted with TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to manufacturer's instructions. One microgram of each RNA sample was converted to cDNA by a reverse transcription reaction using an AMV (Avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) for 1.5 hours at 42°C. Subsequent to the reverse transcription, a polymerase-chain reaction was performed to detect OPN cDNA. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control. The primers were designed based on the reported sequences from GenBank. The oligonucleotide sequences of the primers are

OPN	forward:	5'AGTACCCTGATGCTACAGACG3'
	reverse:	5'CAACCAGCATATCTTCATGGC3'
GAPDH	forward:	5'TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT3'
	reverse:	5'TCACACCCATGACGAACATGG3'

After denaturation for 1 min at 94°C, 30 cycles of amplification followed by final extension for 10 min at 72°C were performed using Tag polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) by a thermocycler (Tpersonal, Whatman Biometra, Goettingen, Germany). The amplification profile was denaturing for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 60°C, and extension for 1.45 min at 72°C. The PCR products were separated electrophoretically on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide fluorostaining. The band intensity was determined by Scion Image analysis software (Scion, Frederick, MA, USA).

Protein extraction and Western blot Analysis

Protein from HN-22 cells was extracted in PhosphoSafe extraction buffer (EMD Biosciences, Madison, WI, USA) and the protein concentration was determined by using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein samples were subjected to electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Samples were subsequently transferred onto nitrocellulose membrane. Nonspecific binding site were blocked with blocking buffer (5% non-fat dried milk, 0.1% Tween 20 in deionized water) at room temperature for 1 h. The membrane was incubated overnight with rabbit anti-human osteopontin polyclonal antibody or mouse anti-human β-actin monoclonal antibody (Chemicon International, Temecula, CA, USA) and rabbit anti-human phospho ERK1/2 polyclonal antibody or mouse anti-human ERK1/2 monoclonal antibody (R&D System, Minneapolis, MN, USA) at the dilution of 1:1000 in blocking buffer at 4 $^{\circ}$C. After extensive washing with PBS, the membrane was incubated with biotinylated goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min at room temperature and

peroxidase-conjugated streptavidin (Zymed, South San Francisco, CA, USA) for 30 min, respectively. The protein bands were detected using SuperSignal West Pico chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA) and were exposed on CL-X Posture film (Pierce, Rockford, IL, USA). The band intensity was determined by Scion Image analysis software (Scion, Frederick, MA, USA).

Statistical Analysis

Values were calculated as the mean ± standard deviation (SD). Statistical significance was determined by Student's t test. Data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA).

Figure Legends

Figure 1 The effect of FN and TNF-α on OPN expression in HN-22 cells.

HN-22 cells were plated on the plastic (A) or FN-coated plate (B and C) for 24 h and then treated with 0, 0.1, 1, and 10 ng/ml TNF-α for 24 h. RT-PCR (A and B) and Western blot analysis (C) were performed using OPN primer and monoclonal antibody against OPN, respectively. GAPDH and β-actin were used as internal control. (D) HaCat cells were treated with 10 ng/ml TNF-α in the presence or absence of FN and analyzed by RT-PCR. All experiments were performed in triplicate.

Figure 2 Involement of β1 integrin on OPN expression induce by FN and TNF-α.

HN-22 cells were premixed with 1 ng/ml of inhibitory antibody to β1 integrin or 2 μg/ml of activating β1 integrin before plated on plastic or FN-coated plate for 24 h. The cell extracts were collected 24 h after treatment with TNF-α and assessed for RT-PCR (A) and Western blot analysis (B). Graphs show the quantification of OPN expression which normalized to the GAPDH or β-actin. The results are indicated by the mean $\pm$ SD relative to the control from three independent experiments). *, indicate significant difference ($p < 0.05$).

Figure 3 The effect of MEK and NF-κB inhibitor on OPN expression induce by FN and TNF-α.

HN-22 cells were treated with 2 μM of MEK inhibitor or 10 nM of NF-κB inhibitor for 30 min prior to application of 10 ng/ml TNF-α for another 24 h. The cell extracts were analyzed for RT-PCR (A) and Western blot analysis (B). Graphs show the quantification of OPN expression which normalized to the GAPDH or β-actin. To detect phosphorylated (p-ERK) and total ERK (t-ERK), the cell extract was collected 15 min after adding TNF-α.The results are indicated by the mean ± SD relative to the control from three independent experiments. *, indicate significant difference ($p < 0.05$).

Figure 4 Activation of ERK phosphorylation by FN and TNF-α.

(A) HN-22 cells were stimulated with 10 ng/ml TNF-α in the presence or absence of FN for 15 min. The cell lysates were analyzed by western blotting with anti-phospho ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibody. Inhibitory (B) or activating antibody (C) to β1 integrin was added to the cell as in figure 2B. Graphs show the quantification of phosphorylated ERK1/2 which normalized to total ERK. The results are indicated by the mean ± SD relative to the control from three independent experiments. *, indicate significant difference ($p < 0.05$).

Fig. 1

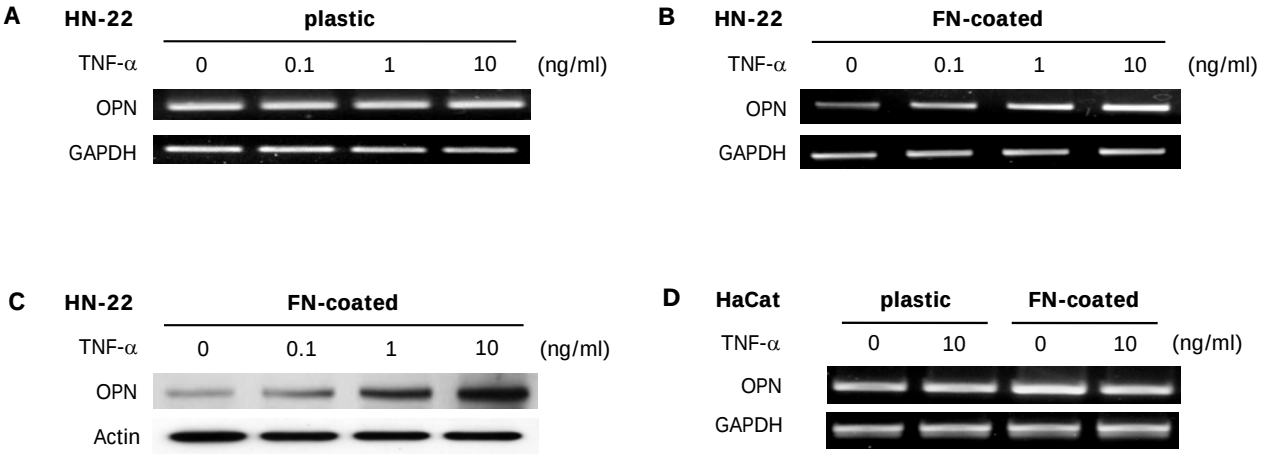

A
HN-22
plastic
TNF-α
0
0.1
1
10
(ng/ml)
OPN
GAPDH
B
HN-22
FN-coated
TNF-α
0
0.1
1
10
(ng/ml)
OPN
GAPDH
C
HN-22
FN-coated
TNF-α
0
0.1
1
10
(ng/ml)
OPN
Actin
D
HaCat
plastic
FN-coated
TNF-α
0
10
0
10
(ng/ml)
OPN
GAPDH

Fig. 2

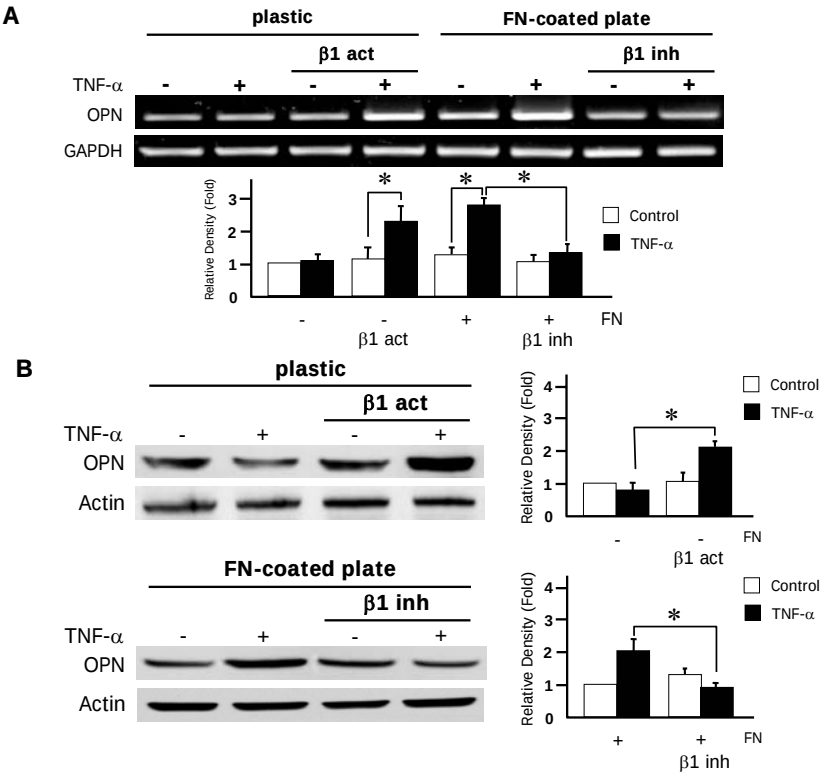

A
plastic
FN-coated plate
β1 act
β1 inh
TNF-α
OPN
GAPDH
Relative Density (Fold)
Control
TNF-α
FN
β1 act
β1 inh
B
plastic
β1 act
TNF-α
OPN
Actin
FN-coated plate
β1 inh
Relative Density (Fold)
Control
TNF-α
FN

Fig. 3

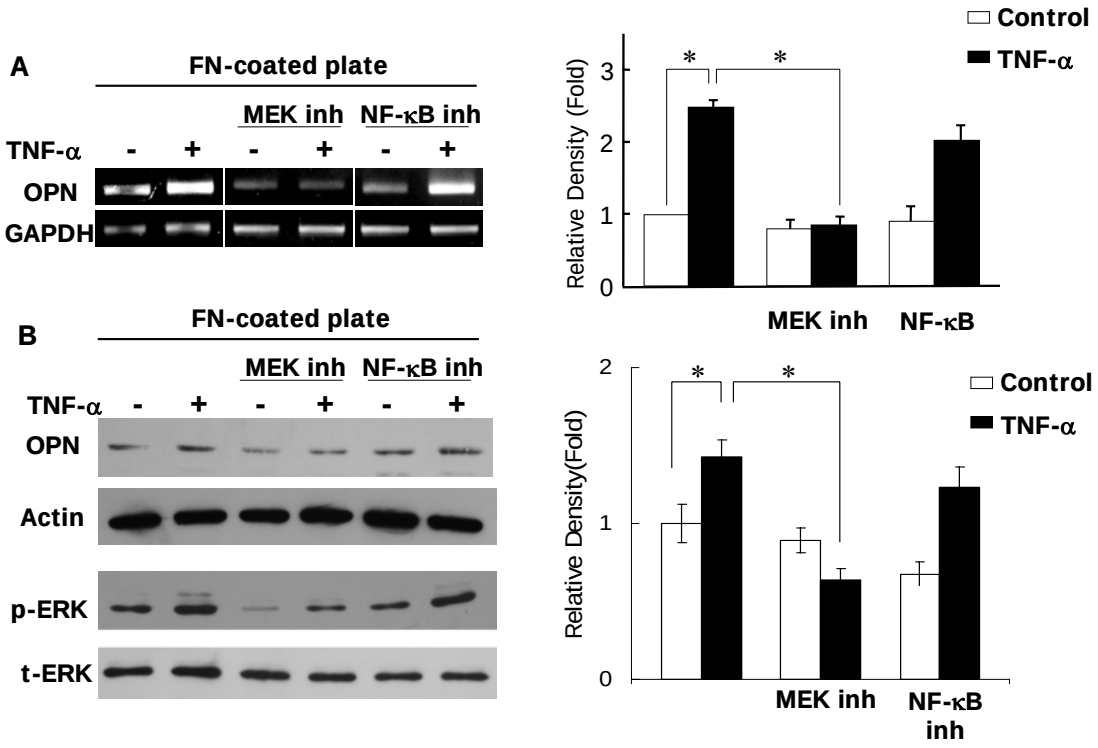
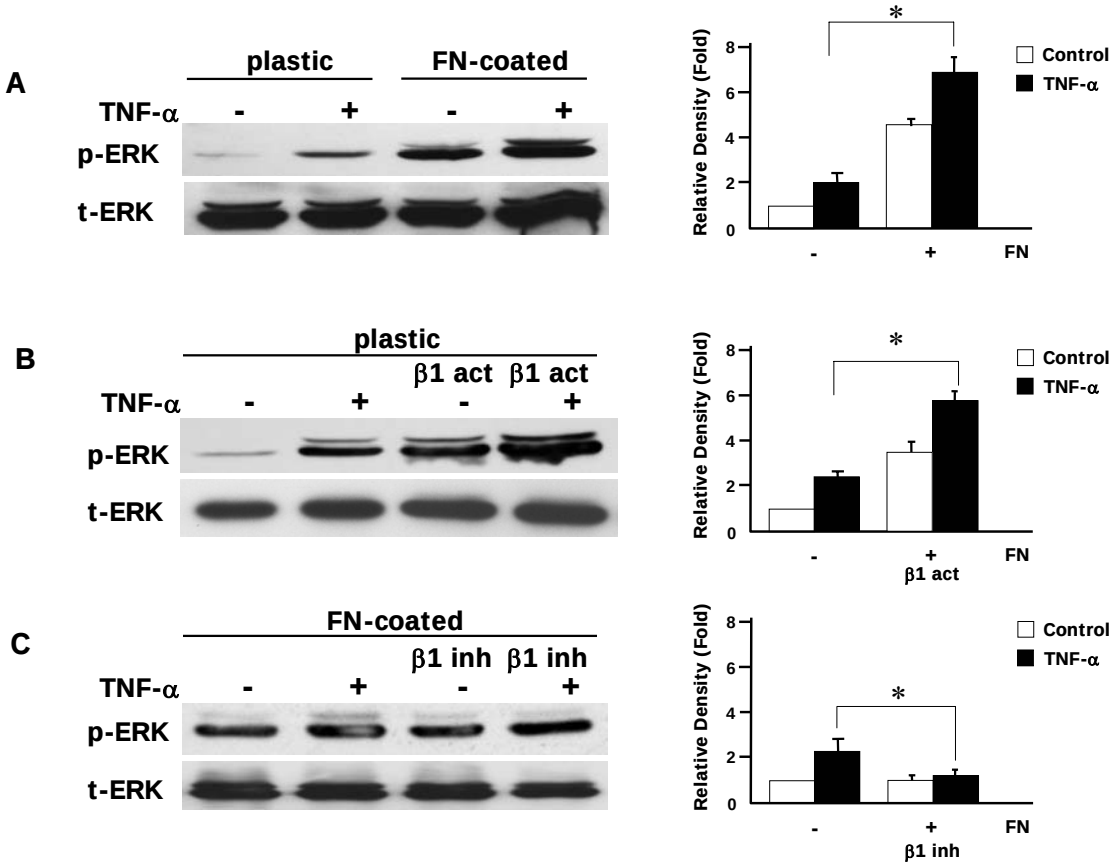

A
FN-coated plate
MEK inh
NF-κB inh
TNF-α
- + - + - +
OPN
GAPDH
B
FN-coated plate
MEK inh
NF-κB inh
TNF-α
- + - + - +
OPN
Actin
p-ERK
t-ERK
Control
TNF-α
Relative Density (Fold)
0
1
2
3
*
*
MEK inh
NF-κB
Control
TNF-α
Relative Density(Fold)
0
1
2
*
*
MEK inh
NF-κB inh

Fig. 4


A
plastic
FN-coated
TNF-α - + - +
p-ERK
t-ERK
Relative Density (Fold)
Control
TNF-α
FN
B
plastic
β1 act β1 act
TNF-α - + - +
p-ERK
t-ERK
β1 act
C
FN-coated
β1 inh β1 inh
TNF-α - + - +
p-ERK
t-ERK
β1 inh