



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "บทบาทของ MAPK ในการ Invasion และ Metastasis ของเซลล์"

โดย

ดร. ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย และคณะ

ธันวาคม 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "บทบาทของ MAPK ในการ Invasion และ Metastasis ของเซลล์"

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย

ม.มหิดล

ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์

ม.มหิดล

น.ส. พิริดี พร้อมญาติ

ม.มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF/17/2542
ชื่อโครงการ: บทบาทของ MAP kinase ในการ invasion และ metastasis ของเซลล์
ชื่อนักวิจัย: นางสาว ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย
Email address: sctsc@mahidol.ac.th
ระยะเวลาโครงการ 1 กรกฎาคม 2542 ถึง 31 ธันวาคม 2544

Mitogen-activating protein kinase (MAP kinase, MAPK) เป็น ตัวกลางในการรับ สัญญาณจากภายนอก ที่มีบทบาทสำคัญในทางชีววิทยาหลากหลายอย่าง เช่น ควบคุมการแบ่งตัว, การ differentiate และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญใน metastasis) ในรายงาน นี้เราได้ศึกษาบทบาทของ MAP kinase ในการ invasion และ metastasis ของเซลล์

ในโครงการนี้เราศึกษาบทบาทของ MAP kinase ในการ invasion และ metastasis โดยใช้ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูในตระกูล Dunning 3 ชนิด ที่พัฒนามาจากต้นกำเนิดเดียวกัน ได้แก่ AT-01, AT-02 และ MLL โดยที่เซลล์ 3 ชนิดนี้ มีความสามารถในการแพร่กระจายแตกต่างกัน เราได้แสดงว่าปริมาณ MAP kinase ที่ active มีความสัมพันธ์กับ ความสามารถในการแพร่ กระจายของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดนี้ และการยับยั้งการกระตุ้น MAP kinase โดย MEK1 inhibitor (PD98059) มีผลลดความสามารถในการบุกรุก (invasiveness) ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากทั้ง สามชนิด ด้วยค่า IC_{50} ที่แตกต่างกัน โดยค่า IC_{50} มีความสัมพันธ์กับปริมาณ active MAP kinase ในเซลล์นั้นๆ นอกจากนี้ MEK1 inhibitor นี้ ยังมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ ในขณะที่แทบไม่ มีผลต่อการแบ่งเซลล์ หรือ ปริมาณการหลั่ง MMP2 (gelatinase) อย่างไรก็ตาม IC_{50} ในการยับยั้ง การเคลื่อนที่ มากกว่า IC_{50} ในการยับยั้งการบุกรุก เมื่อเทียบในเซลล์ชนิดเดียวกัน โดยสรุป ผล การทดลองนี้ ชี้ว่า MAP kinase มีบทบาทสำคัญในการบุกรุก matrigel ของเซลล์ และ อาจเป็น สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์มีพัฒนาการจนมีความสามารถในการแพร่กระจายสูง การยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ ด้วย PD98059 นั้นน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้ง การเคลื่อนที่ของเซลล์ อย่างไร ก็ตามค่า IC_{50} ชี้ว่า การควบคุมการเคลื่อนที่ไม่ใช่กลไกหลักในการส่งผลต่อการบุกรุก ยังต้องมีกลไกอื่นอีกซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

คำหลัก: MAP kinase, invasion, metastasis, Prostate cancer

ABSTRACT

Project Code: PDF/17/2542
Project Title: Role of MAPK in Cell Invasion and Metastasis
Investigator: Tuangporn Suthiphongchai, Ph.D.
Email address: setsc@mahidol.ac.th
Project period: 1 July 1999 - 31 December 2001

Mitogen-activating protein kinase, MAPK, a mediator of various extracellular Mitogens, plays an important role in cell proliferation, cell differentiation or cell motility (one of the requirement for metastasis). In this project we study role of MAP kinase in cell invasion and metastasis.

In this project, we investigated the role of MAP kinase in cell invasion and metastasis using three Dunning rat prostatic adenocarcinoma cell lines, AT-01, AT-02 and MLL, all of which derived from the same parental origin. We demonstrated that the steady-state levels of activated MAP kinase correlated with invasiveness and metastatic potential of these three Dunning cell lines. Inhibition of MEK1, an upstream regulator of MAP kinase, with PD98059 resulted in a dose dependent reduction in the *in vitro* invasiveness of these three cancer cell lines, of which IC_{50} values related to their steady-state levels of activated MAP kinase. This specific MEK1 inhibitor also suppressed the cell motility whereas MMP2 secretion and proliferation were not significantly affected. However, the IC_{50} values for motility were higher than those for invasiveness when compared within the same cell lines. In conclusion, these results suggested that MAP kinase is necessary for cell invasiveness and may responsible for the differences in metastatic ability of these cell lines. The reduction of invasiveness upon treatment with MEK1 inhibitor may partly be due to the impairment of cell motility, however, the differences in IC_{50} for invasiveness and motility suggested that some other invasive factors (that is not MMP2) must also be interfered by this inhibitor.

Key words: MAP kinase, invasion, metastasis, Prostate cancer

บทนำ

มะเร็งเกิดจากการที่เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ระบบการควบคุมการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ผิดปกติ เซลล์จะแบ่งตัวมากผิดปกติและไม่สามารถควบคุมได้อย่างถูกต้อง สาเหตุสำคัญคือมีการเปลี่ยนแปลงของยีน (genetic alteration) โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์ ได้แก่ oncogene และ tumor suppressor gene (1) นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้ (metastasis) ความรู้ทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน โดยเฉพาะความรู้เกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง บทบาทของ oncogene และ tumor suppressor จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการเกิดมะเร็งมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาในการวินิจฉัย ป้องกัน และรักษาโรคมะเร็ง

โดยปกติขบวนการทางชีววิทยาหลายอย่าง จะเกิดขึ้นภายใต้การควบคุมของสัญญาณจากภายนอกหลากหลายชนิด ซึ่งจะส่งสัญญาณผ่านทาง signal transduction pathway ต่างๆ ตัวอย่างเช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ จะถูกควบคุมโดย growth factor ในเซลล์มะเร็ง เซลล์จะสามารถเติบโต และแบ่งตัวได้โดยไม่ต้องการสัญญาณจากภายนอกลดลงหรือไม่ต้องการเลย ซึ่งการลดความต้องการของสัญญาณจากภายนอกนี้ เป็นผลเนื่องมาจากความผิดปกติของ oncogene หลายชนิด ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณจากภายนอกเข้ามาภายในเซลล์ Ras เป็น oncogene product ตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่ ส่งสัญญาณที่ได้รับจากภายนอก โดยเมื่อ receptor จับกับ ligand เช่น EGF จะกระตุ้น Ras และ Ras จะส่งสัญญาณ cascade ไปยัง mediator หลากหลายชนิด สำหรับการแบ่งเซลล์ Ras จะส่งสัญญาณผ่านตัวกลางไปกระตุ้น transcription factor ต่างๆ : Fos, Jun, Ets ซึ่งจะไป transcribe ยีนที่มีความสำคัญในการสร้าง DNA และการแบ่งเซลล์ (2, 3) การกระตุ้น Ras/MAP kinase pathway จะมีผลให้ cyclin D1 มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ผ่านจาก G₁ ไป S phase ได้ดีขึ้น นั่นคือ เซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้น (3)

นอกจากการแบ่งตัวอย่างผิดปกติแล้ว การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนอื่นของร่างกาย (metastasis) เป็นอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญ และยังนับได้ว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คนไข้ต้องเสียชีวิต ปกติเซลล์ในเนื้อเยื่อหนึ่งๆจะอยู่รวมกันได้โดยเซลล์จะเกาะกันและส่งสัญญาณสื่อสารระหว่างกัน และมี basement membrane เป็นขอบเขตของเนื้อเยื่อนั้นๆ การที่เซลล์จะแพร่กระจายออกจากแหล่งที่อยู่ของมันได้จะต้องสูญเสียคุณสมบัตินี้ ขบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) เป็นขบวนการที่ซับซ้อน เกิดจากการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง โดยเริ่มจากการ

ที่เซลล์มะเร็งจะหลุดจากเซลล์ข้างเคียง และ basement membrane, ปล่อยเอ็นไซม์ protease เช่น collagenase I, IV, matrix metalloproteinases (MMPs) มาย่อย extracellular matrix (ECM) รวมทั้ง basement membrane และ stroma จากนั้นเซลล์จะเคลื่อนที่ออกมา โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงของ cytoskeleton ซึ่งจะทำให้เซลล์เคลื่อนที่ออกจากที่อยู่เดิม invade เข้าสู่ stroma และเกาะกับ ECM ในที่ใหม่ได้ ขบวนการเหล่านี้ (ได้แก่ การหลุดจากเซลล์ข้างเคียง, ย่อย ECM, เคลื่อนที่ออกมา และ เกาะกับที่ใหม่) จะเกิดเป็นวงจร ทำให้เซลล์บุกรุก (invade) เนื้อเยื่อข้างเคียง และ stroma ได้ จากนั้นเซลล์จะ invade ผนังเส้นเลือดเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะนำเซลล์มะเร็งไปสู่ที่อื่นต่อไป (4,5)

เช่นเดียวกับการแบ่งเซลล์ มีสัญญาณจากภายนอกหลากหลายอย่างที่มีผลต่อกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง สัญญาณที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ สัญญาณจาก Ras ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ Growth factor หลายชนิดและ integrin จะออกฤทธิ์ผ่าน Ras โดยจะกระตุ้น Ras ให้อยู่ในรูป active Ras (6) ซึ่งจะส่งสัญญาณออกไปได้หลายทางโดยผ่านตัวกลาง (mediator) ต่างๆ เช่น Raf/MEK/MAP kinase pathway, PI3K pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์, Ral/PI3K pathway หรือ Rac/Rho pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (7, 8) นอกจากนี้ยังมีรายงานสนับสนุนว่า MAP kinase เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ สามารถ phosphorylate และ กระตุ้น myosin light chain kinase (MLCK) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ เอ็นไซม์ myosin light chain kinase นี้ จะไปกระตุ้น myosin โดยไป phosphorylate myosin regulatory light chain (MRLC) และการเพิ่มปริมาณ active MAP kinase ภายในเซลล์จะทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่มากขึ้น (9)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

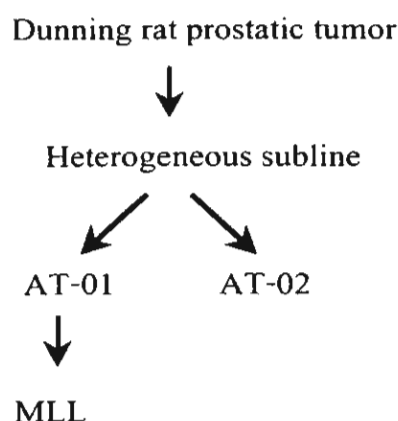
เราต้องการที่จะศึกษาถึงความสำคัญของ MAP kinase signaling pathway ในการเกิด metastasis โดยในโครงการนี้เราได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณ และสถานะภาพของ MAPK กับ ความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก เซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน และศึกษากลไกของ MAP kinase ในการควบคุมการบุกรุก (invasion) ของเซลล์มะเร็ง โดยการศึกษาผลการของยับยั้งการกระตุ้น MAP kinase ต่อกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง

วิธีการทดลอง

1) Cell lines ที่ใช้ในการทดลอง และการเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนู Dunning rat prostate tumor cell lines ได้แก่ AT-01, AT-02 และ MLL เป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน คือ Dunning tumor โดยการนำเซลล์/เนื้อเยื่อมะเร็งผ่านเข้าสู่หนู (Copenhagen rat) และคัดเลือกเซลล์ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่างกัน ตามตารางและแผนภูมิรูปที่ 1 โดยที่เซลล์ AT-01 (มี metastatic potential ต่ำ) และ AT-02 (มี metastatic potential ปานกลาง) มาจาก heterogenous subline ซึ่งพัฒนามาจาก Dunning tumor ส่วนเซลล์ MLL (มี metastatic potential สูง) พัฒนามาจาก AT-01 จนได้เซลล์ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและตับ จึงเรียกว่า Mat Ly Lu หรือ MLL (10)

Cell line	Metastatic potential
AT-01	Low
AT-02	Low to moderate
MLL	High



รูปที่ 1 แผนผังแสดงที่มาของ cell lines ในตระกูล Dunning rat prostate tumor sublines

เซลล์ AT-01, AT-02 และ MLL ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ดร. K. Pienta, University of Michigan, Ann Arbor, MI. เซลล์เหล่านี้ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI-1640, Gibco, Inc.) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technology, Inc.) ในจานเลี้ยงเซลล์ และ อบในตู้อบ 37°C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2) การตรวจหาปริมาณ MAP kinase ทั้งหมด และ ปริมาณ phosphorylated MAP kinase โดยวิธี western blotting

เนื่องจาก MAP kinase ถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต เราจึงใช้ระดับของ MAP kinase ที่มีหมู่ฟอสเฟต (phosphorylated MAP kinase) เป็นตัวบ่งถึง MAP kinase activity ปริมาณ phosphorylated MAP kinase ในเซลล์ หาได้โดย western blotting โดยใช้ anti-phospho-MAP kinase antibody เป็น primary antibody

2.1) การเตรียม cell lysate

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS จนได้ 70-80% confluent จึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MEK1 inhibitor, PD98059 (Cell signaling technology, Inc) ความเข้มข้นต่างๆ incubate ต่ออีก 6 ชม. Harvest เซลล์ และ lyse ด้วย lysis buffer ที่มี phosphatase และ protease inhibitors (Roche Diagnostics, Corp.) centrifuge เอาเศษเซลล์ออก นำส่วนใส (cell lysate) มาวัดโปรตีนโดย Bradford reagent (ใช้ solvent ที่ใช้ละลายยา (DMSO) เป็น Control)

2.2) การแยกโปรตีนในเซลล์ lysate ด้วยกระแสไฟฟ้า โดย SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

สารตัวอย่าง (cell lysate) จะถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 10% SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli หลังจากนั้นโปรตีนในเจลจะถูก transfer ลงบน nitrocellulose membrane ด้วยกระแสไฟฟ้า และย้อมด้วย primary antibody ได้แก่ rabbit polyclonal anti p44/p42 MAP kinase antibody และ anti phospho-p44/p42 MAP kinase antibody (Cell signaling technology, Inc.) ที่ 4°C ข้ามคืน ตามด้วย antirabbit secondary antibody conjugated with horse radish peroxidase (Cell signaling technology, Inc.) และ enhance chemiluminescence (Amersham, IL) หลังจากประกบฟิล์มจะเห็น bands ที่ molecular weight ประมาณ 44 และ 42 kDa คือ p44 และ p42 MAP kinase หรือ phospho-MAP kinase ขึ้นอยู่กับชนิดของ primary antibody ที่ใช้

3) การวัดความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation assay) โดยวิธี MTT assay

Trypsinized เซลล์จากงานเลี้ยงเซลล์ เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS ให้ได้ปริมาณเซลล์ 2500 เซลล์ ต่อ 100 μ l ใส่เซลล์ลงใน 96 well plate หลุมละ 2500 เซลล์ เลี้ยงไว้ข้ามคืน วันรุ่งขึ้น เปลี่ยนเป็น media ที่มี DMSO หรือ PD98059 ที่ความเข้มข้นต่างๆ incubate ไว้ในตู้

อบ carbon dioxide 37°C นาน 48 ชม. เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะถูกย้อมด้วย MTT โดยการเติม 5 mg/ml MTT ลงใน media ในอัตราส่วน 1:10 incubate ต่ออีก 4 ชม. เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยน MTT ให้เป็นผลิตภัณฑ์ Formazan dye ซึ่งมีสีม่วง หลังจากนั้นเอา media ออกและละลายผลิตภัณฑ์โดยการเติม DMSO 200 μ l อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยใช้ microtiter plate reader จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะบอกเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

4) การตรวจวัดความสามารถในการบุกรุกผ่าน Matrigel (Invasion assay) โดยใช้ Transwell

ความสามารถของเซลล์ ในการบุกรุกผ่าน Matrigel (synthetic extracellular matrix) และ 0.8 μ m เมมเบรน (หรือ ที่เรียกว่า invasive ability) จะถูกตรวจวัด โดยใช้วิธี Transwell *in vitro* invasion assay (15) โดยดูจากจำนวนเซลล์ที่สามารถบุกรุก ลงไปอยู่ด้านล่างของเมมเบรน

ก่อนทำการทดลองจะต้องทำการเคลือบเมมเบรนของ upper chamber ของ transwell ด้วย 30 μ g matrigel (Collaborative Research, Becton Dickinson, U.K.) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum ทิ้งไว้ 1 คืน ในตู้อบ 37°C Trypsinize เซลล์ที่เตรียมไว้ และเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS และ DMSO หรือ PD98059 ความเข้มข้นต่างๆ นำเซลล์ 2×10^5 เซลล์ใส่ใน upper chamber ที่เคลือบด้วย Matrigel ไว้แล้ว ส่วนใน lower chamber ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS 600 μ l incubate ในตู้อบ CO₂ 37°C 6 ชม. เมื่อครบกำหนดเขี่ยเซลล์บน upper chamber ออก และย้อมเซลล์ที่บุกรุกเข้าไปใต้เมมเบรนด้วย 0.5% crystal violet ใน 25% Methanol 20 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น และนับจำนวนเซลล์ได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10x ได้ค่าเป็น จำนวนเซลล์/ field

5) การตรวจวัดความสามารถในการเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนของเซลล์ (Motility assay) โดยใช้ Transwell

ทำเช่นเดียวกับ Invasion assay (ดูวิธีทำการทดลองข้อ 4) แต่ไม่ต้องเคลือบเมมเบรนด้วย matrigel

6) การตรวจหาปริมาณ matrix metalloproteinases ที่หลั่งออกมาโดย Gelatin zymography

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS จนได้ 70% confluent แล้ว treat ด้วย PD98059 24 ชม. จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum แต่ยังคงมี inhibitor ในความเข้มข้นเท่าเดิม incubate ต่ออีก 24 ชม. เก็บ conditioned media มาตรวจสอบ gelatinase activity โดย gelatin zymography

สารตัวอย่าง (conditioned media) จะถูก treated ด้วย SDS sample buffer ที่ไม่มี reducing agent และแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 7.5% SDS-PAGE ที่มี gelatin 1 mg/ml หลังจากนั้น gel มาล้างด้วย 2.5% tritonX-100 และ incubate gel ใน reaction buffer (500mM Tris-Cl pH7.5, 100mM CaCl₂, 1mM ZnCl₂, 10% tritonX-100, 2% NaN₃) 17 ชม. ที่ 37°C ย้อม gel ด้วย Coomassie blue บริเวณที่มี gelatinase activity จะปรากฏเป็นแถบใส

ผลการทดลอง

1) ความสามารถในการเคลื่อนที่และการบุกรุกผ่าน Matrigel ของ Dunning cell lines ที่มี metastatic potential ต่างกัน

จากการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่และการบุกรุกผ่าน Matrigel และ เมมเบรน โดย *in vitro* motility and invasion assay ของ Dunning sublines (AT-01, AT-02 และ MLL) พบว่า cell lines ที่มีความสามารถในการแพร่กระจาย (metastatic potential) สูง, MLL, มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการบุกรุก (invasive ability) สูงกว่า AT-02 ส่วน AT-01 ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำสุดใน 3 cell lines นี้ ก็มี ความสามารถในการเคลื่อนที่และการบุกรุกต่ำสุดด้วย (รูปที่ 2A & B) ความสามารถในการเคลื่อนที่และการบุกรุกผ่าน Matrigel ของ Dunning cell lines มีความสัมพันธ์กับ ความสามารถในการแพร่กระจาย

2) สถานภาพของ MAP Kinase ใน Dunning cell lines ที่มี metastatic potential ต่างกัน

ในการทดลองนี้ ปริมาณ MAP kinase ทั้งหมด และ ปริมาณ MAP kinase ที่ถูกกระตุ้น (active MAP kinase) ซึ่งวัดจากระดับของ MAP kinase ที่มีหมู่ฟอสเฟต (phosphorylated MAP kinase) ในเซลล์ที่มี metastatic potential ต่างๆ ได้ถูกตรวจวัดโดย western blotting (ในปริมาณโปรตีนที่เท่าๆ กัน) โดยใช้ anti-MAP kinase และ anti-phospho-MAP kinase antibodies เป็น primary antibodies ได้ 2 bands ที่ 42 และ 44 kDa ซึ่งหมายถึง p42 และ p44 MAP kinase

เมื่อเปรียบเทียบสถานภาพของ MAP kinase ใน Dunning cell lines 3 ชนิดที่มี metastatic potential ต่างกัน พบว่า cell lines 3 ชนิดนี้ (AT-01, AT-02 และ MLL) มีปริมาณ MAP kinase ทั้งหมด ในระดับที่ใกล้เคียงกัน แต่มีสัดส่วนของ MAPK ที่ถูกกระตุ้น (active MAP kinase) ต่างกัน โดย AT-01 ซึ่งมีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำสุด มีระดับของ active MAP kinase น้อยที่สุด ตามด้วย AT-02 และ MLL (รูปที่ 3) การทดลองนี้ จึงให้เห็นว่า ระดับของ MAP kinase ที่