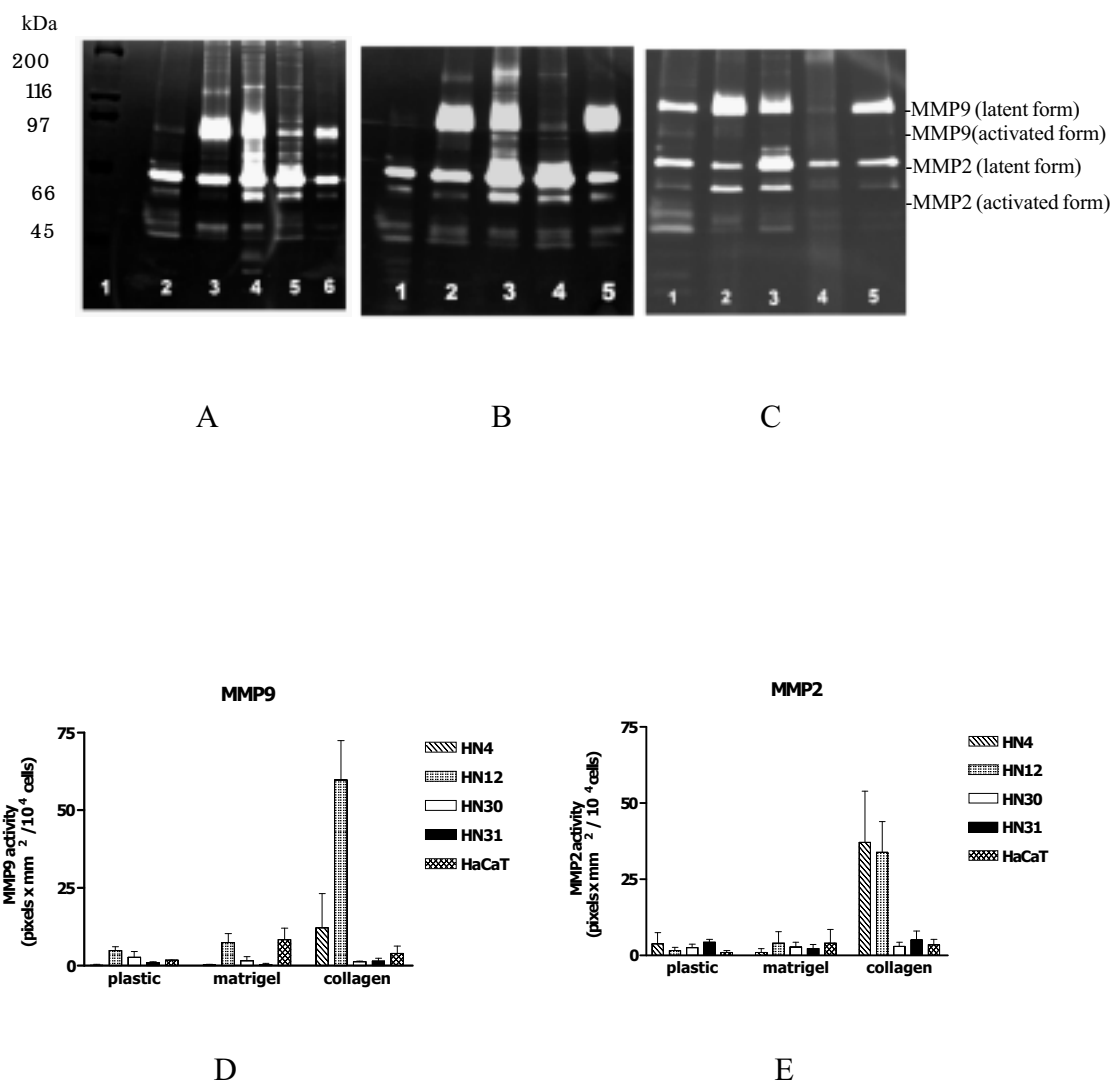
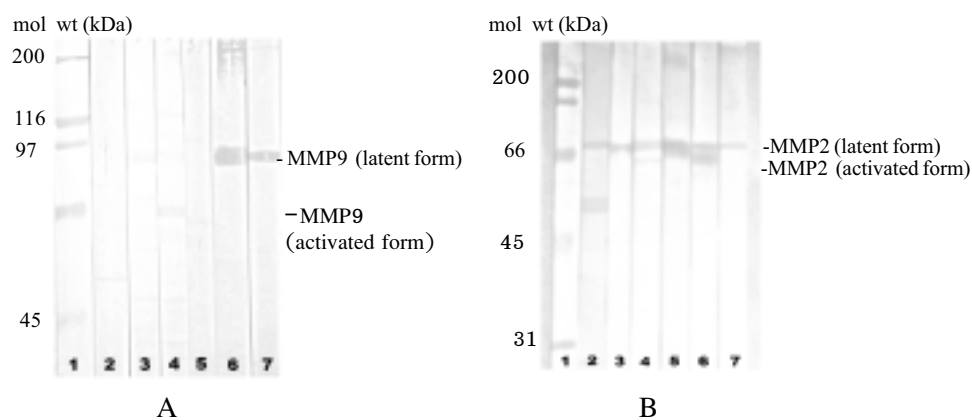


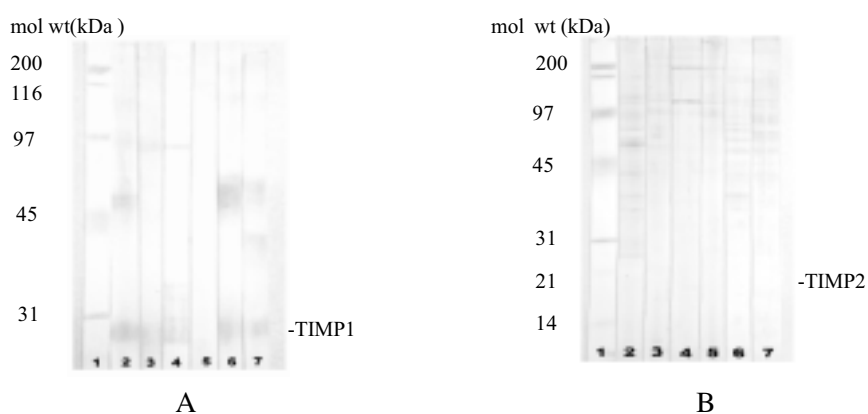


รูปที่ 17 แสดง zymogram ของ MMPs จากเซลล์ที่เลี้ยงบนพลาสติก(A), matrigel(B) และ collagen(C) โดย lane A1= mol wt standard; A2,B1,C1=HN4; A3,B2,C2=HN12; A4,B3,C3=HN30; A5,B4,C4=HN31; A6,B5,C5=HaCaT และแสดงผลวิเคราะห์ activity ของ MMP9 และ MMP2 โดยdensitometric analysisในรูป D และ E ตามลำดับ

ในการทดลองนี้ได้ทำ immunoblot ต่อ MMP9 และ MMP2 เพื่อยืนยันว่า band ที่ได้จาก zymogram นั้นเกิดจาก genolytic activity ของเอนไซม์ทั้งสองดังแสดงในรูปที่ 18 นอกจากนั้นยังได้ทำการตรวจหา TIMP1 และ TIMP2 (รูป 19)



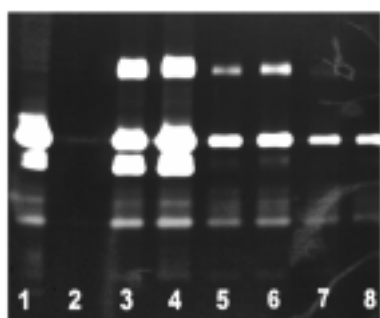
รูปที่ 18 แสดง immunoblot ต่อ MMP9(A) และ MMP2(B) โดย
lane 1=mol wt standard, 2=HN4, 3=HN12, 4=HN30, 5=HN31,
6=HaCaT และ 7=HT1080(positive control)



รูปที่ 19 แสดง immunoblot ต่อ TIMP1(A) และ TIMP2(B) โดย
lane 1=mol wt standard, 2=HN4, 3=HN12, 4=HN30, 5=HN31,
6=HaCaT และ 7=HT1080(positive control)

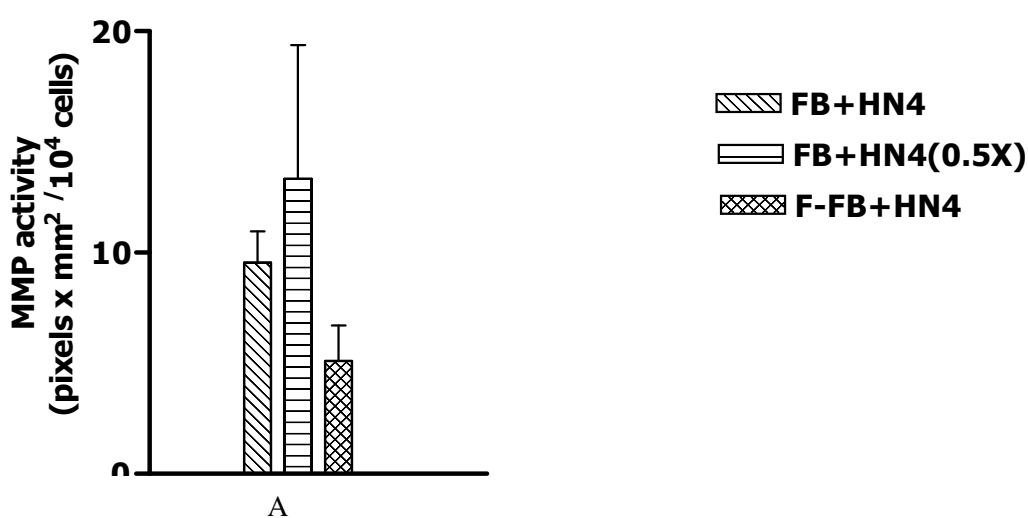
4.ผลของไฟโบรบลาสต์ต่อการสร้าง MMPs

จากการทดลองเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ร่วมกับเซลล์ HN ชนิดต่างๆพบว่า ไฟโบรบลาสต์สามารถกระตุ้นเซลล์บางชนิด ให้คัดหลั่ง MMPs ได้มากกว่า สภาวะปกติ ดังแสดงในรูปที่ 20-39

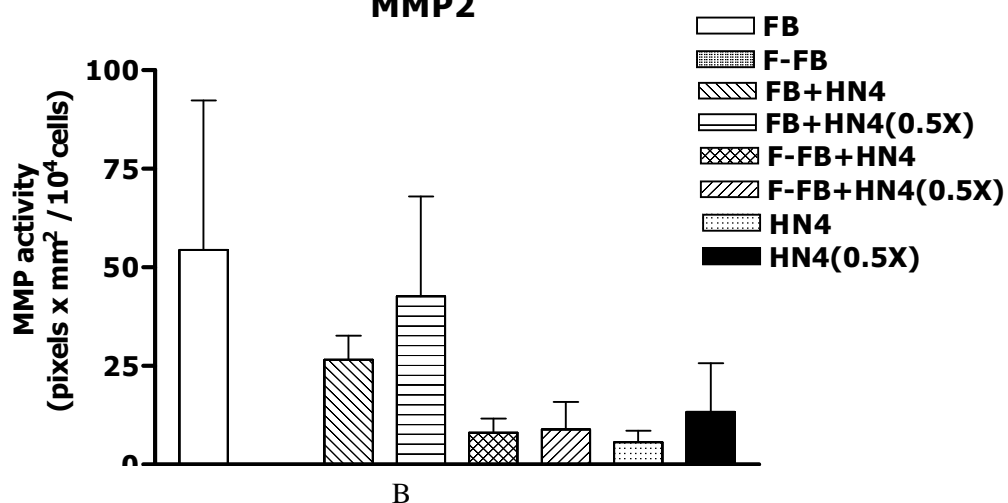


รูปที่ 20 zymogram ของ conditioned media ที่เกิดจากการเลี้ยง HN4 ร่วมกับไฟโบรบลาสในสภาวะต่างๆ โดย lane 1=ไฟโบรบลาส, 2=ไฟโบรบลาสที่ถูก fix, 3=ไฟโบรบลาส+HN4, 4=ไฟโบรบลาส+HN4 อัตราส่วน 1:0.5, 5-6=ไฟโบรบลาสที่ fix+HN4 อัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5 ตามลำดับ, 7-8=HN4 1X และ 0.5X

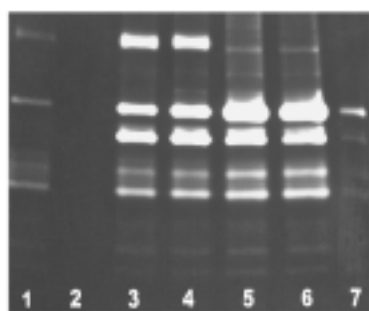
MMP9



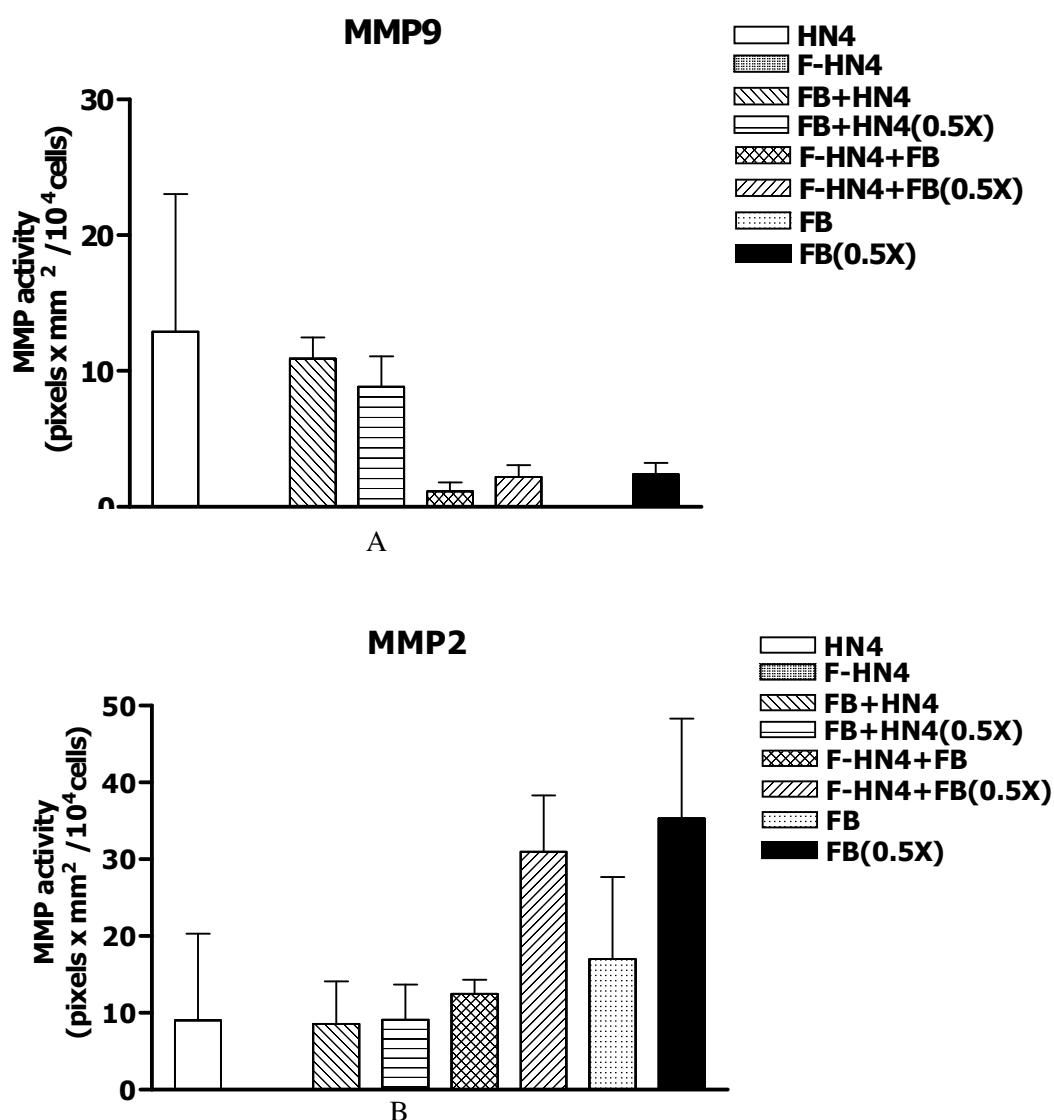
MMP2



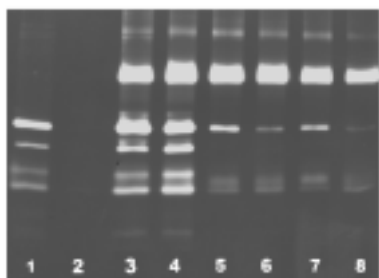
รูปที่ 21 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 8 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB=ไฟโบรบลาสที่ fix)



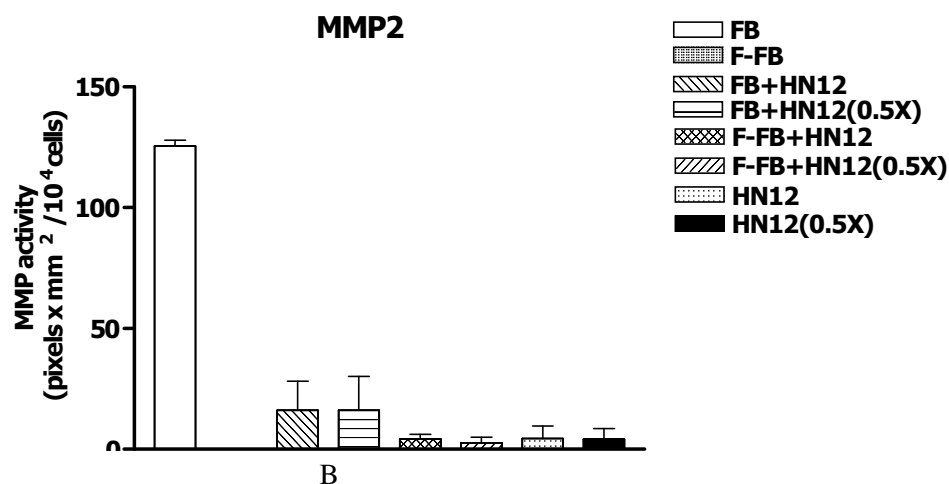
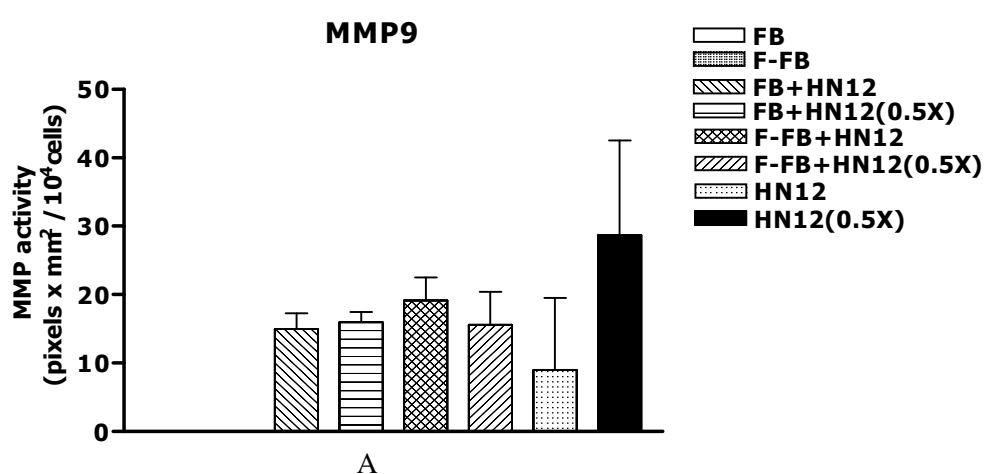
รูปที่ 22 แสดง zymogram ของ conditioned media ที่ได้จากการเลี้ยง HN4 ร่วมกับไฟโบรบลาสต์ lane1=HN4, 2=HN4 ที่ถูก fix, 3= ไฟโบรบลาสต์+ HN4, 4=ไฟโบรบลาสต์+ HN4 0.5x, 5-6=ไฟโบรบลาสต์+ HN4 ที่ถูก fix ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5, 7= ไฟโบรบลาสต์ 1X



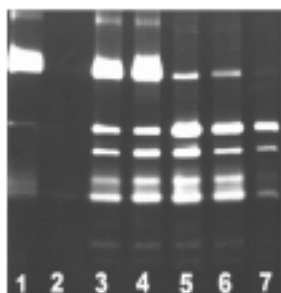
รูปที่ 23 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 10 (FB=ไฟโบรบลาสต์, F-FB= ไฟโบรบลาสต์ที่ fix)



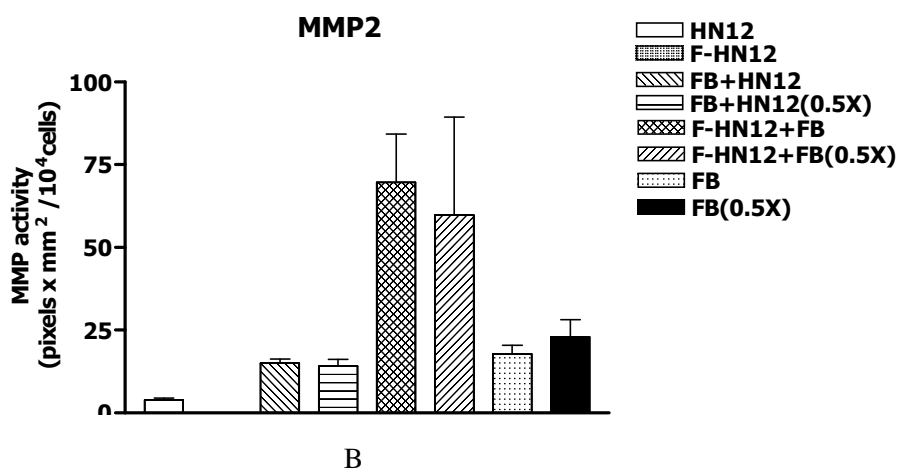
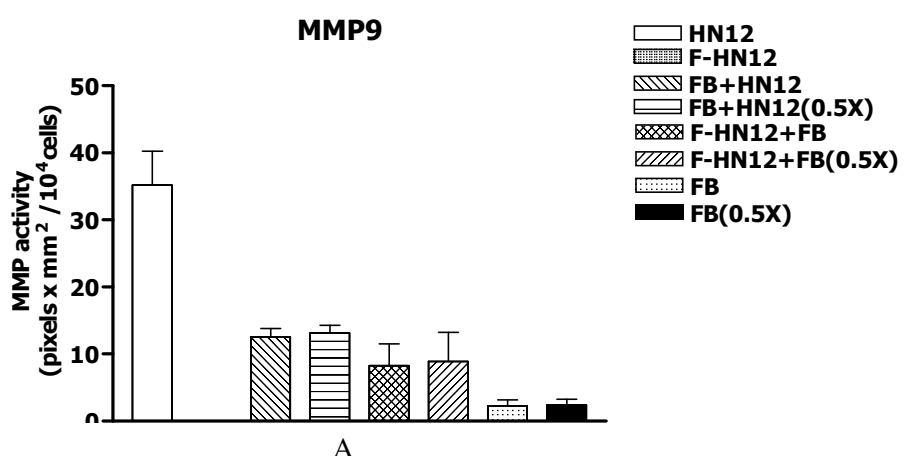
รูปที่ 24 zymogram ของ conditioned media ที่เกิดจากการเลี้ยง HN12 ร่วมกับไฟโบรบลาสในสภาวะต่างๆ โดย
lane1=ไฟโบรบลาส, 2=ไฟโบรบลาสที่ถูกfix, 3=ไฟโบรบลาส+HN12, 4=ไฟโบรบลาส+HN12ที่สัดส่วน 2:1, 5-6=ไฟโบรบลาสที่ fix+HN12 ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5 ตามลำดับ, 7-8=HN12 1Xและ0.5X



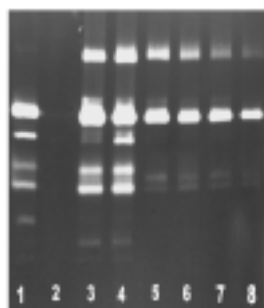
รูปที่ 25 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 12 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB= ไฟโบรบลาสที่ fix)



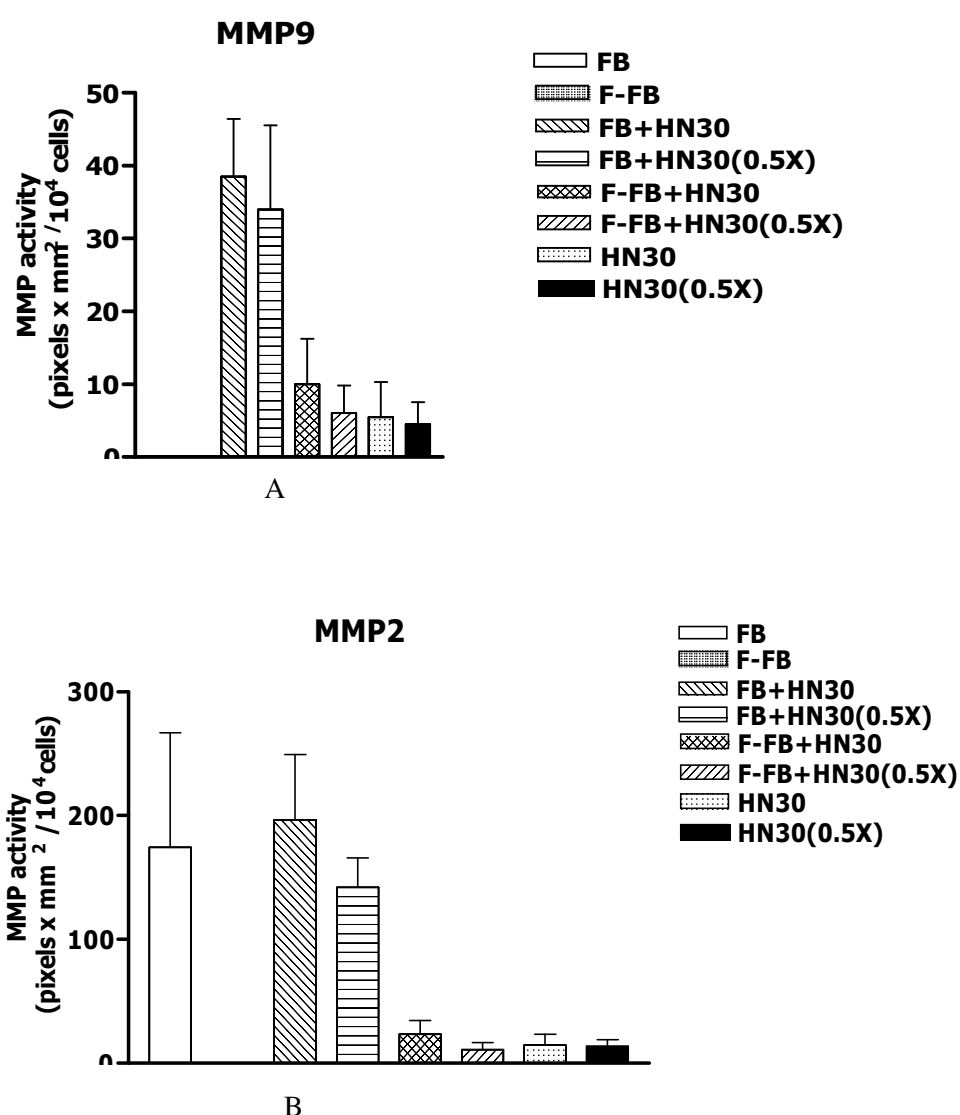
รูปที่ 26 แสดง zymogram ของ conditioned media ที่ได้จากการเลี้ยง HN12 ร่วมกับไฟโบรบลาส lane1=HN12, 2=HN12 ที่ถูกfix 3=ไฟโบรบลาส+HN12, 4=ไฟโบรบลาส+HN12 (0.5X), 5-6=ไฟโบรบลาส+HN12 ที่ fix ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5, 7=ไฟโบรบลาส 1X



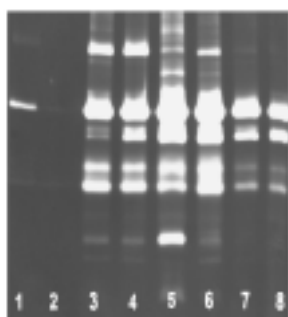
รูปที่ 27 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 14 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB= ไฟโบรบลาสที่ fix)



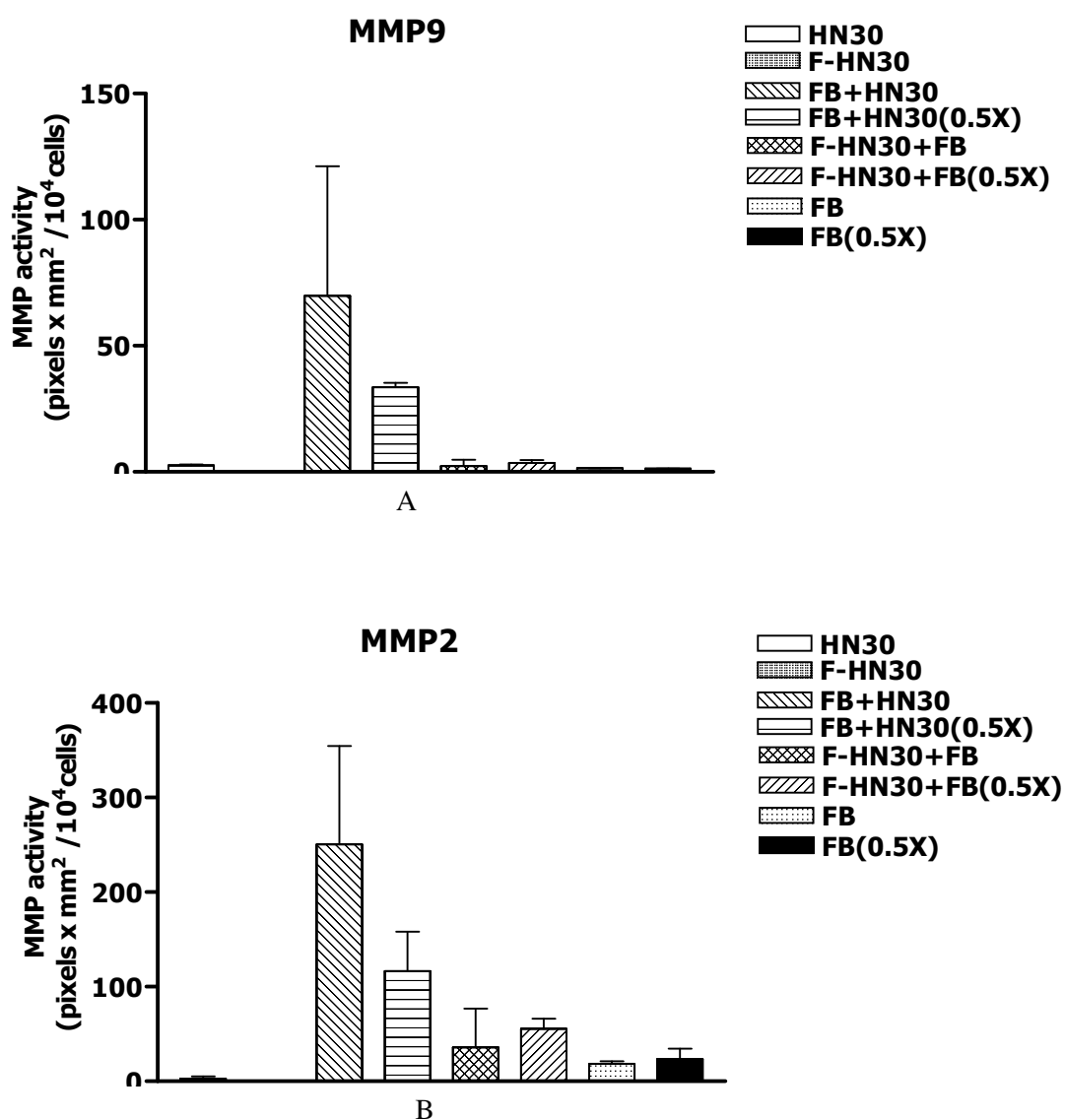
รูปที่ 28 zymogram ของ conditioned media ที่เกิดจากการเลี้ยง HN30 ร่วมกับไฟโบรบลาสในสภาวะต่างๆ โดย lane 1=ไฟโบรบลาส, 2=ไฟโบรบลาสที่ถูก fix, 3=ไฟโบรบลาส+HN30, 4=ไฟโบรบลาส+HN30 ที่อัตราส่วน 1:0.5, 5-6=ไฟโบรบลาสที่ fix+HN30 ในอัตรา 1:1 และ 1:0.5 ตามลำดับ, 7-8=HN30 1X และ 0.5X



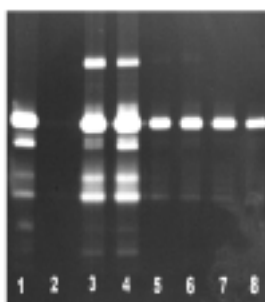
รูปที่ 29 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 16 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB=ไฟโบรบลาสที่ fix)



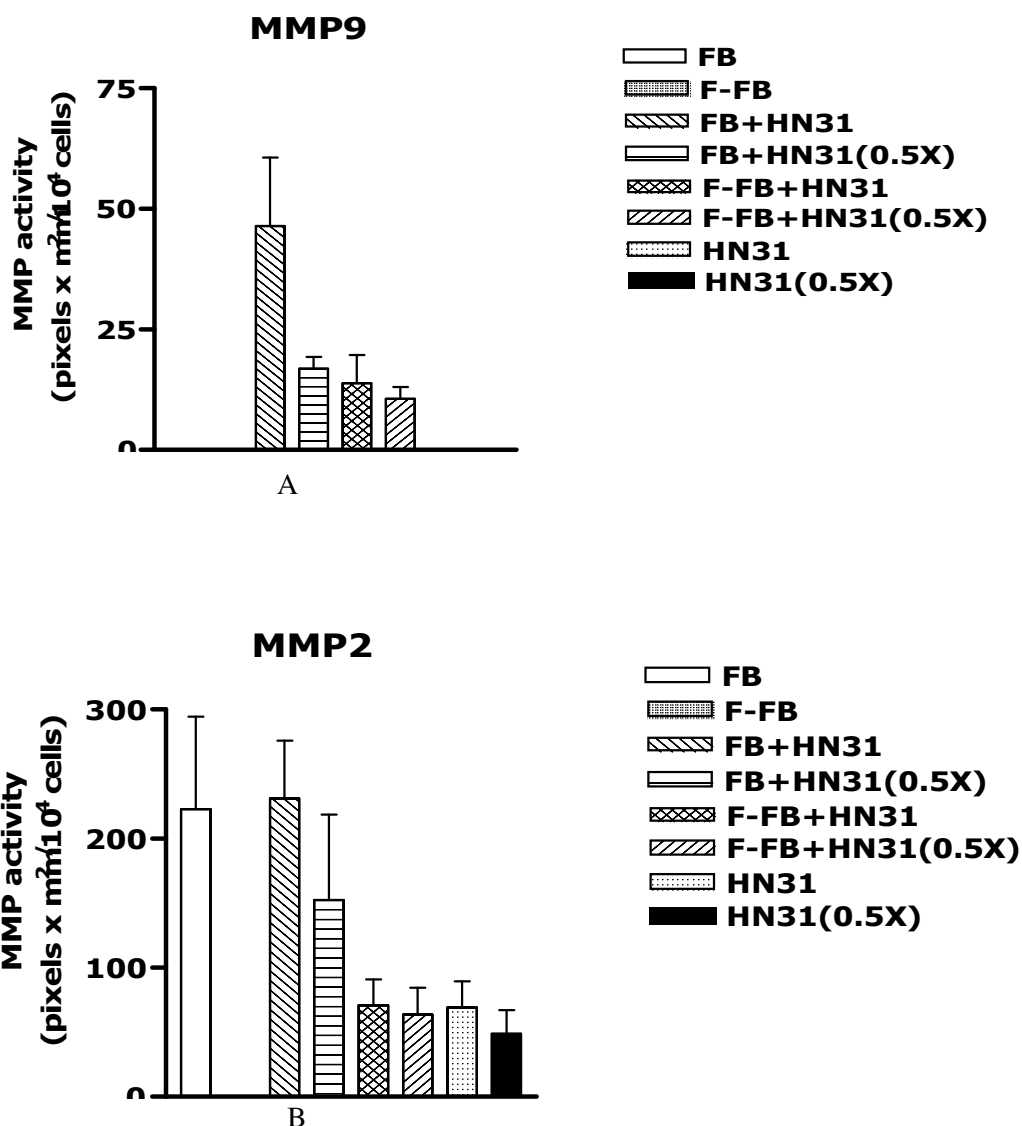
รูปที่ 30 แสดง zymogram ของ conditioned media ที่ได้จากการเลี้ยง HN30 ร่วมกับไฟโบรบลาส lane1=HN30, 2=HN30 ที่ถูก fix 3=ไฟโบรบลาส+HN30, 4=ไฟโบรบลาส+HN30 (0.5X), 5-6= HN30 ที่ถูก fix +ไฟโบรบลาสในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5, 7-8=ไฟโบรบลาส 1X และ 0.5X



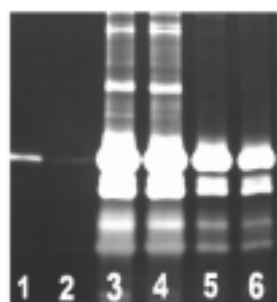
รูปที่ 31 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 18 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB= ไฟโบรบลาสที่ fix)



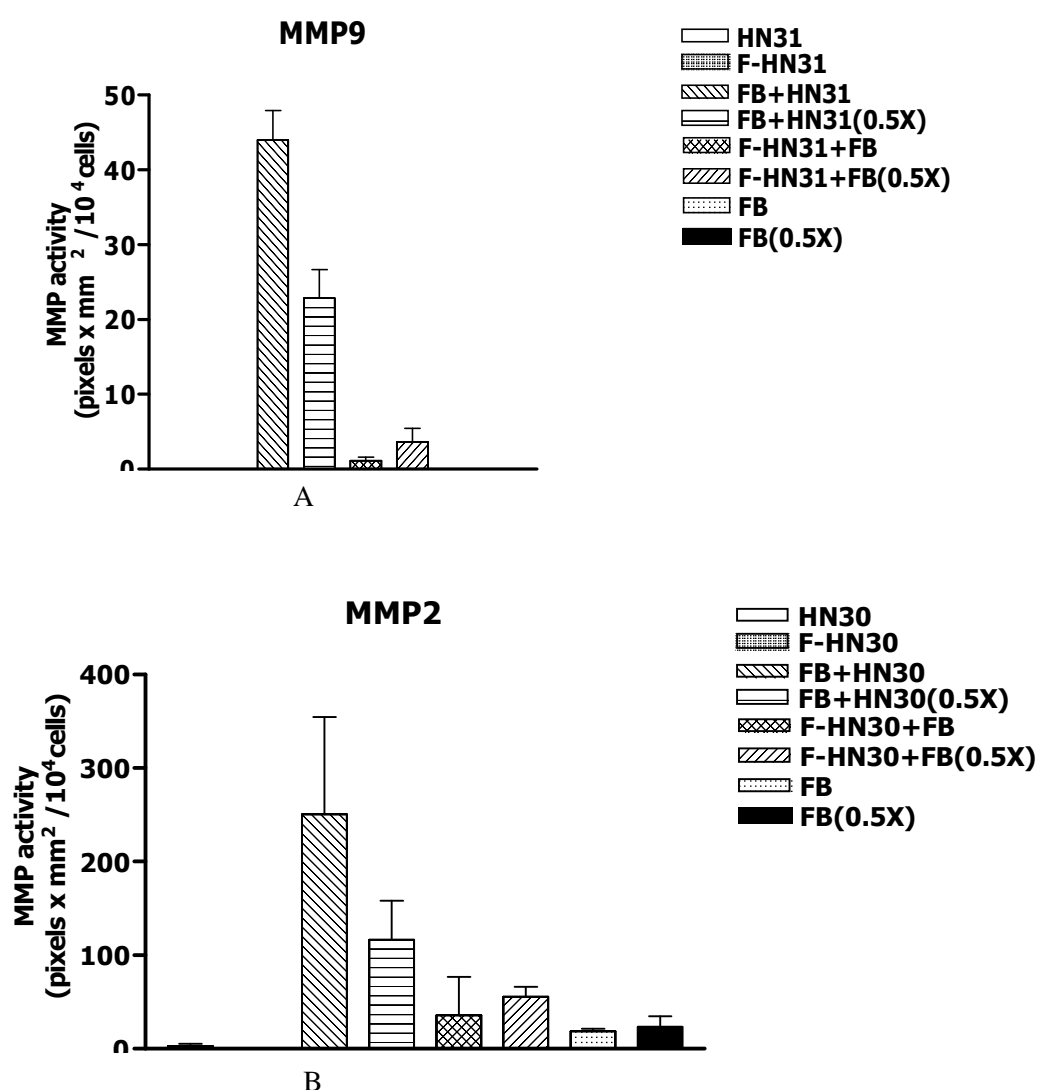
รูปที่ 32 zymogram ของ conditioned media ที่เกิดจากการเลี้ยง HN31 ร่วมกับไฟโบรบลาสต์ในสภาวะต่างๆ โดย lane 1=ไฟโบรบลาสต์, 2=ไฟโบรบลาสต์ที่ถูก fix, 3=ไฟโบรบลาสต์+ HN31, 4=ไฟโบรบลาสต์+ HN31 ในอัตราส่วน 1:0.5, 5- 6=ไฟโบรบลาสต์ที่ fix+HN31 ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5 ตามลำดับ, 7-8=HN31 (1X) และ 0.5X



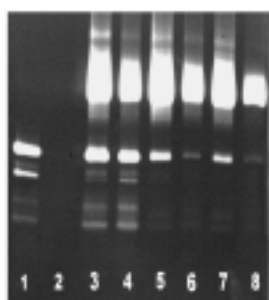
รูปที่ 33 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 20 (FB=ไฟโบรบลาสต์, F-FB= ไฟโบรบลาสต์ที่ fix)



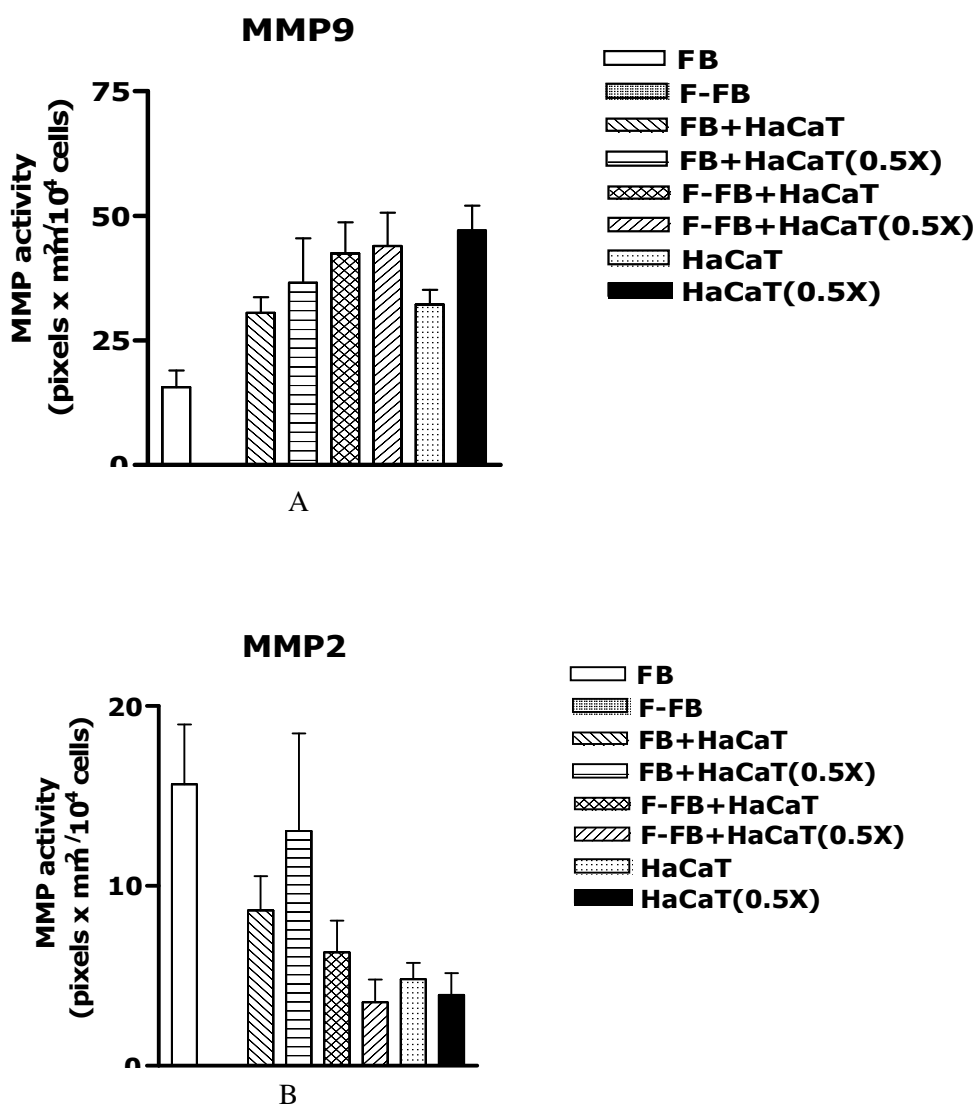
รูปที่ 34 แสดง zymogram ของ conditioned media ที่ได้จากการเลี้ยง HN31 ร่วมกับไฟโบรบลาส lane1=HN31, 2=HN31 ที่ถูก fix 3=ไฟโบรบลาส+HN31, 4=ไฟโบรบลาส+HN31(0.5X), 5-6= ไฟโบรบลาส+HN31 ที่ถูก fix ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5



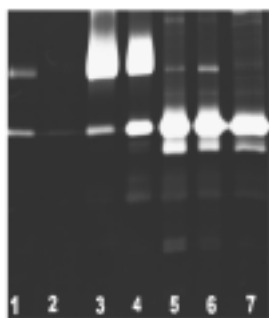
รูปที่ 35 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 22 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB= ไฟโบรบลาสที่ fix)



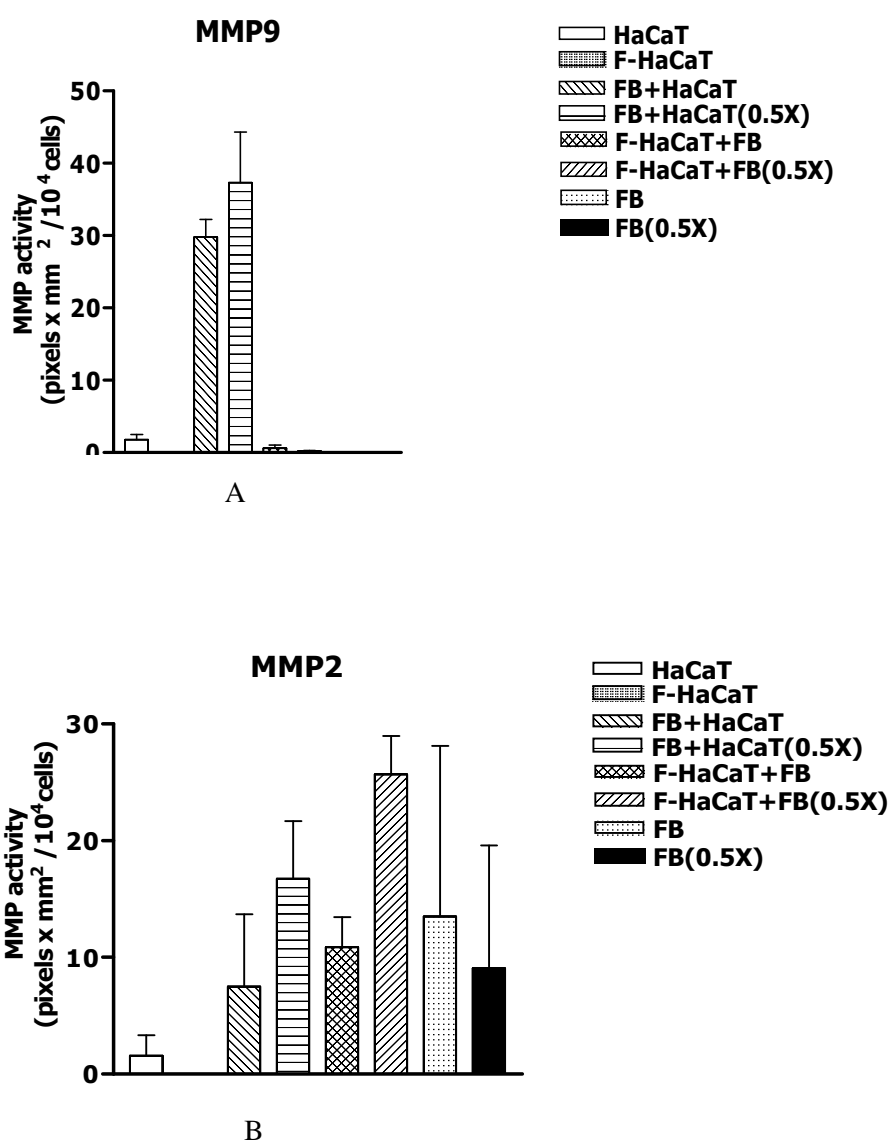
รูปที่ 36 zymogram ของ conditioned media ที่เกิดจากการเลี้ยง HaCaT ร่วมกับไฟโบรบลาสในสภาวะต่างๆ โดย lane 1=ไฟโบรบลาส, 2=ไฟโบรบลาสที่ถูก fix, 3=ไฟโบรบลาส+HaCaT, 4=ไฟโบรบลาส+HaCaT ที่อัตราส่วน 1:0.5, 5-6=ไฟโบรบลาสที่ fix+HaCaT ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5 ตามลำดับ, 7-8=HaCaT 1X และ 0.5X



รูปที่ 37 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 24 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB=ไฟโบรบลาสที่ fix)



รูปที่ 38 zymogram ของ conditioned media ที่ได้จากการเลี้ยง HaCaT ร่วมกับไฟโบรบลาส lane1=HaCaT, 2=HaCaT ที่ถูก fix 3=ไฟโบรบลาส+HaCaT, 4=ไฟโบรบลาส+HaCaT(0.5X), 5-6= ไฟโบรบลาส+HaCaT ที่ถูก fix ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:0.5, 7=ไฟโบรบลาส

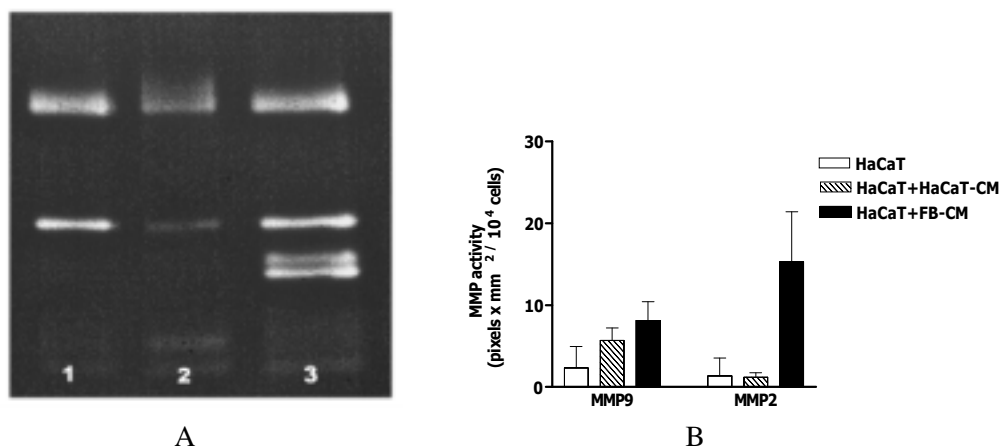


รูปที่ 39 การวิเคราะห์ความเข้มของ band เพื่อคำนวณหา activity ของ MMP9(A) และ MMP2(B) ที่ได้จาก gel ในรูปที่ 26 (FB=ไฟโบรบลาส, F-FB= ไฟโบรบลาสที่ fix)

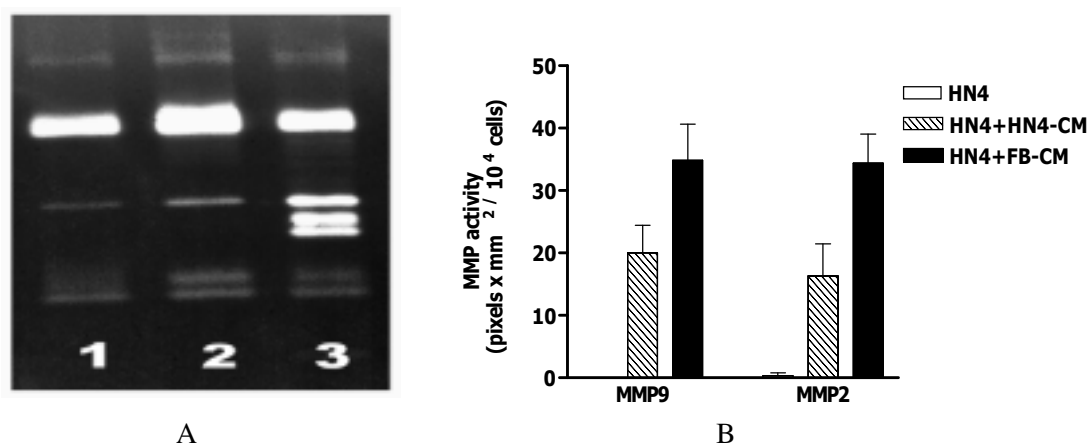
จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับ HN ชนิดต่างๆ หรือกับ HaCaT พบว่ามีผลกระตุ้นให้คัดหลั่ง MMP9 และ MMP2 มากกว่าสภาวะปกติ โดย MMP9 ที่สร้างเพิ่มขึ้นนั้น ส่วนมากจะได้จากเซลล์มะเร็งหรือ HaCaT ในขณะที่ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ที่สร้าง MMP2 มากขึ้นเมื่อทำ co-culture ในการทดลองนี้พบว่า HN4 และ HN31 ถูกกระตุ้นให้สร้าง MMP9 มากขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฟโบรบลาสต์ในสภาวะต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด ปกติจะคัดหลั่ง MMP9 ได้น้อยมากหรือเกือบไม่มีเลย นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่า ไฟโบรบลาสต์สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งทุกชนิดคัดหลั่ง MMP2 ชนิด activated form ได้มากขึ้น สำหรับเซลล์ HaCaT นั้นจะถูกไฟโบรบลาสต์กระตุ้นให้สร้าง MMP9 และ MMP2 ได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่มากเท่าเซลล์มะเร็ง

5. การศึกษากระบวนการ autocrine และ paracrine

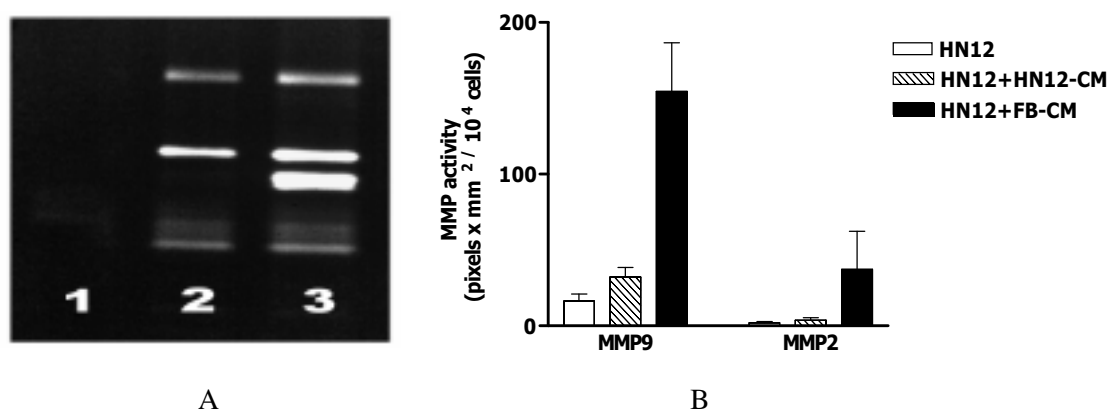
การศึกษานี้พบว่า HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT แสดงกระบวนการ autocrine ในการกระตุ้นตัวเองให้คัดหลั่ง MMP9 ในขณะที่ไฟโบรบลาสต์กระตุ้น HN4, HN12 และ HaCaT ให้สร้าง MMP9 มากขึ้นและกระตุ้น HN4, HN12, HN31 และ HaCaT คัดหลั่ง MMP2 ซึ่งเป็นการแสดงผลอันเนื่องมาจากกระบวนการ paracrine (รูป 40-44)



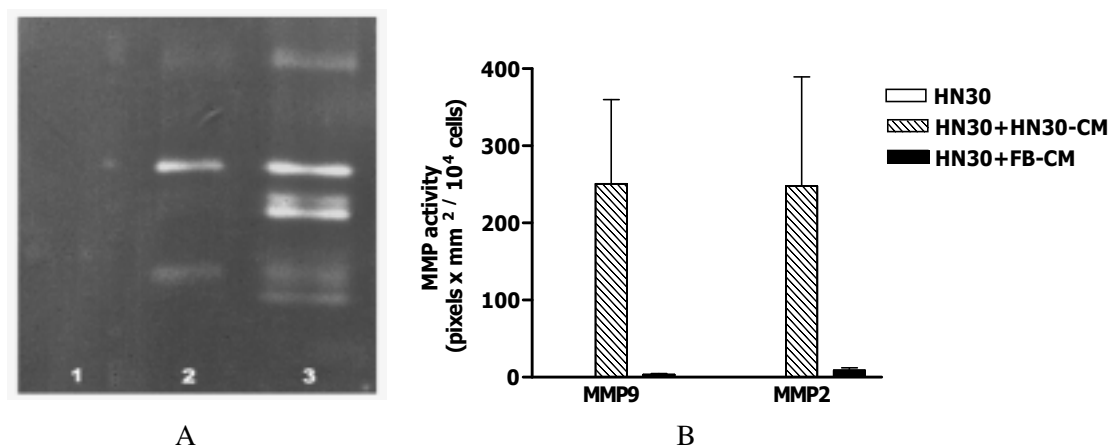
รูปที่ 40 zymogram(A) แสดงผลการกระตุ้นแบบ autocrine และ paracrine โดย A1=HaCaT, A2=HaCaT conditioned media(CM) ของ HaCaT, A3=HaCaT+CM ของไฟโบรบลาสต์ B แสดงค่า activity ของ MMP9 และ MMP2 ที่คำนวณได้จาก gel A



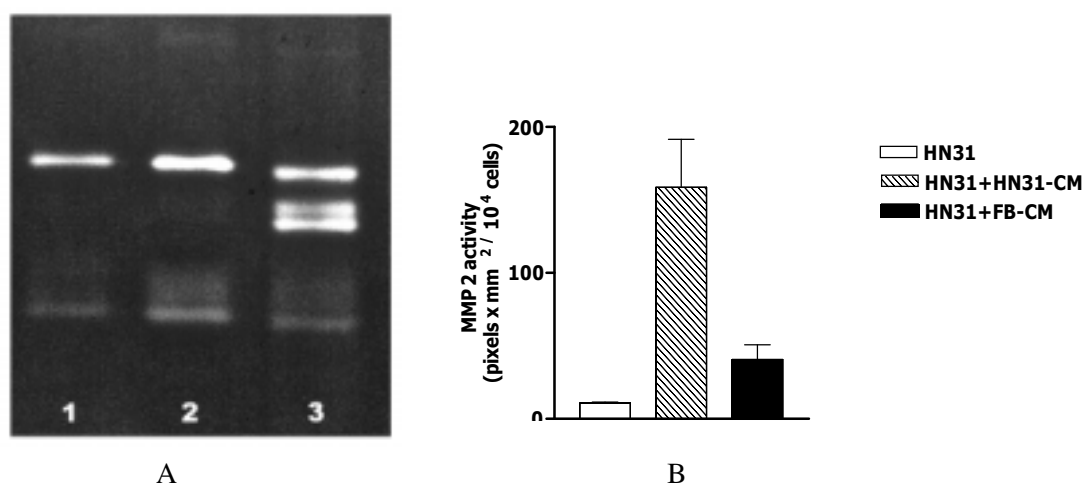
รูปที่ 41 zymogram(A) แสดงผล autocrine และ paracrine โดย A1=HN4, A2=HN4 +CM ของ HN4, A3=HN4+CM ของไฟโบรบลาส
B แสดงค่า activity ของ MMP9 และ MMP2 ที่คำนวณจากgel A



รูปที่ 42 zymogram(A) แสดงผล autocrine และ paracrine โดย A1=HN12, A2=HN12+ CM ของ HN12, A3=HN12+CM ของไฟโบรบลาส
B แสดงค่า activity ของ MMP9 และ MMP2 ที่คำนวณจากgel A



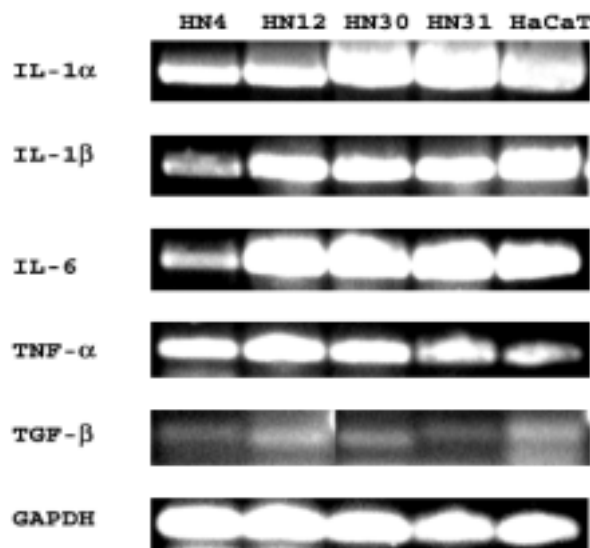
รูปที่ 43 zymogram(A) แสดงผล autocrine และ paracrine โดย A1=HN30, A2=HN30 conditioned media(CM) ของ HN30, A3=HN30+CM ของไฟโบรบลาส B แสดงค่า activityของ MMP9 และ MMP2ที่คำนวณได้จากgel A



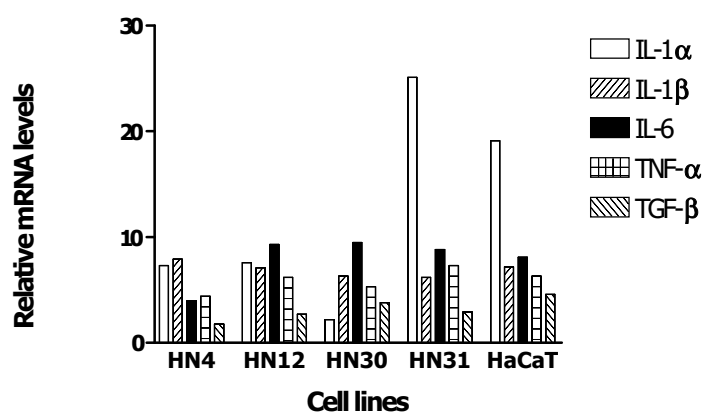
รูปที่ 44 zymogram(A) แสดงผล autocrine และ paracrine โดย A1=HN31, A2=HN31 conditioned media(CM) ของ HN31, A3=HN31+CM ของไฟโบรบลาส B แสดงค่า activityของ MMP9 และ MMP2ที่คำนวณได้จากgel A

6. การสร้าง mRNA ของไซโตไคน์

ในการทดลองนี้พบว่าเซลล์ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT มีการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ 5 ชนิดคือ IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α และ TGF- β โดยไม่พบการ แสดงออกของ HGF และพบว่า mRNA ของ TGF- β มีน้อยกว่าไซโตไคน์ ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 45 และ 46)



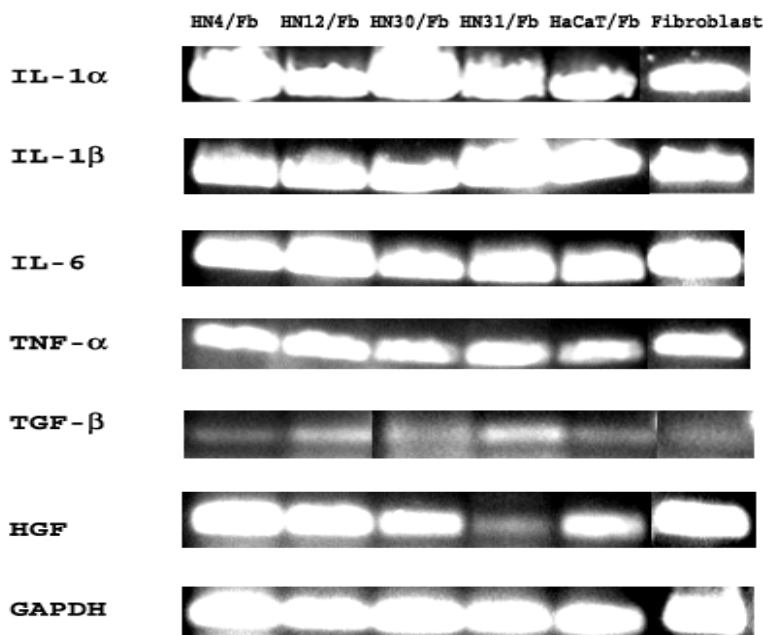
รูปที่ 45 การแสดงออกของ mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์มะเร็งรังสีศีรษะและลำคอและเซลล์ HaCaT



รูปที่ 46 ระดับการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์มะเร็งรังสีและเซลล์ปกติโดยปริมาณที่แสดงเป็นค่าสัมพันธ์เมื่อเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของ GAPDH

7. ผลของไฟโบรบลาสต์ต่อการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์

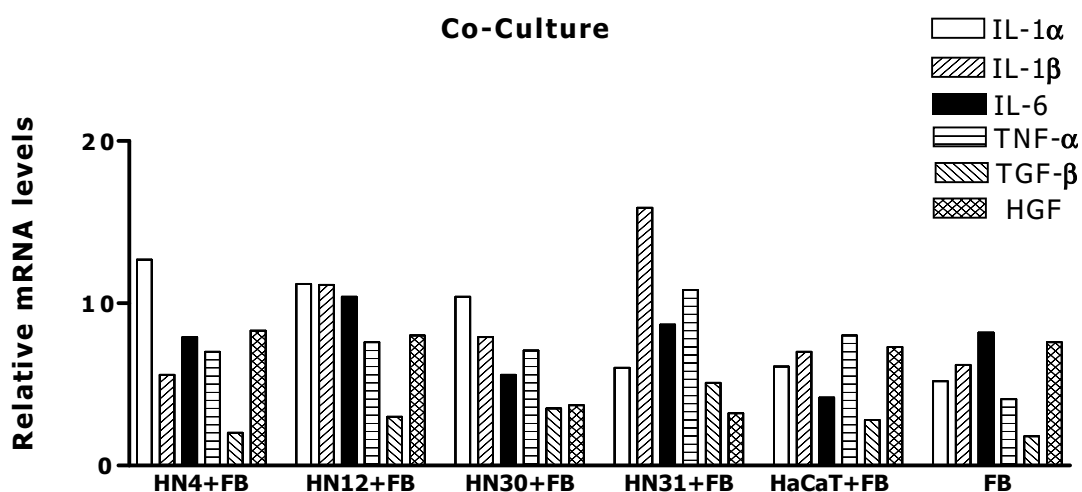
รูปที่47และ48เป็นภาพแสดงผลของไฟโบรบลาสต์ต่อการสร้างไซโตไคน์ โดยพบว่าไฟโบรบลาสต์ กระตุ้นการสร้าง mRNA ของ TNF α ในเซลล์ทุกชนิดที่นำมาศึกษา กระตุ้น การสร้าง mRNA ของ IL-1 α ในเซลล์ HN4, HN12 และ HN30 นอกจากนั้นยังสามารถ กระตุ้นการสร้าง mRNA ของ IL-1 β ใน HN4, HN12, HN30 และ HN31 และ TGF β ใน HN12, HN 30 และ HN 31



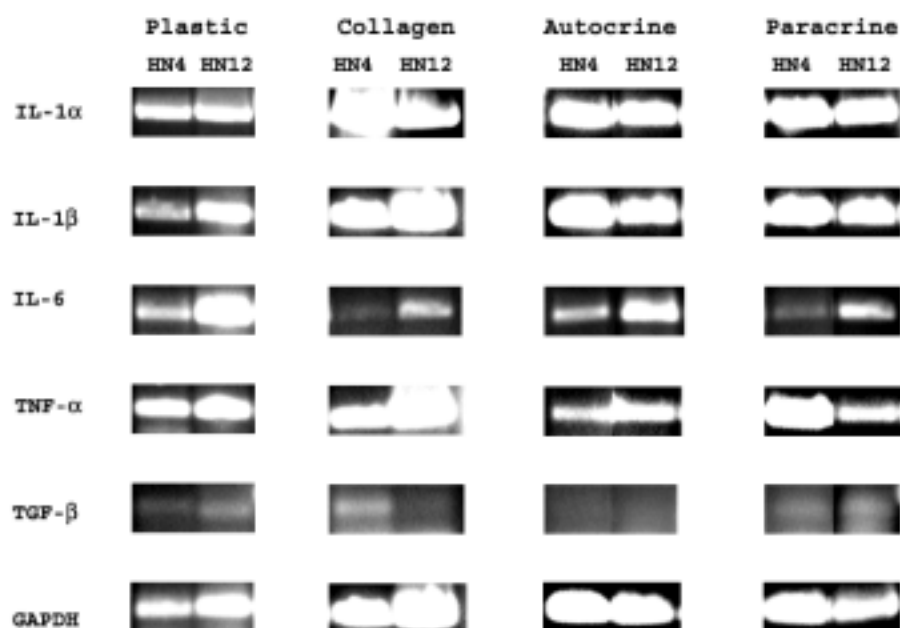
รูปที่47การแสดงผลของ mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์มะเร็งและ เซลล์ keratinocyte ปกติเมื่อเลี้ยงร่วมกับไฟโบรบลาสต์ (Fb); lane 1 =HN4+Fb, lane 2=HN12+Fb, lane3=HN30+Fb, lane4=HN31+Fb lane5=HaCaT+Fb และ lane6= Fb

8. ผลของ collagen, autocrine และ paracrine ต่อการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์

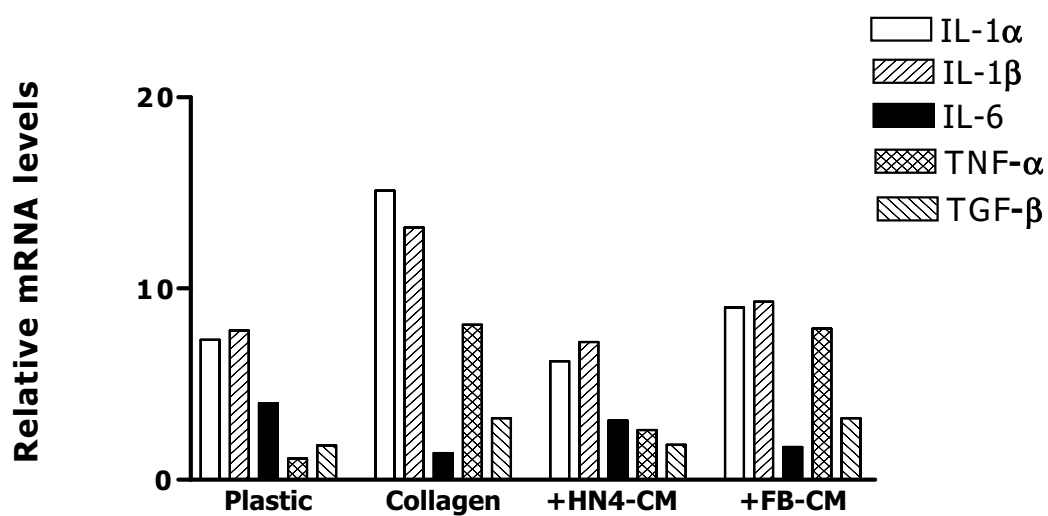
จากการทดลองพบว่า collagen ชนิดที่ I สามารถกระตุ้นให้เซลล์ HN4 และ HN12 สร้าง IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , และ TGF- β (เฉพาะ HN4) ได้มากขึ้น (รูปที่49-51) ในขณะที่กระบวนการ autocrine มีผลต่อการแสดงออกของ ไซโตไคน์ใน HN4 การศึกษาการกระตุ้นแบบ paracrine พบว่า conditioned media ของไฟโบรบลาสต์สามารถกระตุ้นให้เซลล์ HN4 สร้าง IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , และ TGF- β และกระตุ้น HN12 สร้าง TNF- α , และ TGF- β มากขึ้น



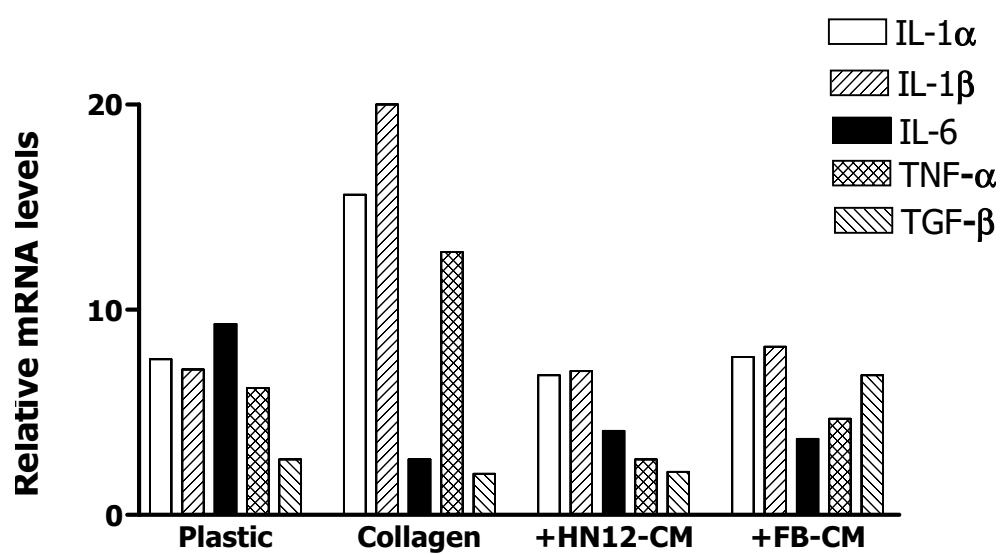
รูปที่ 48 ระดับการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์ HN และ HaCaT เมื่อเลี้ยงร่วมกับไฟโบรบลาส (FB) ปริมาณที่แสดงเป็น ค่าสัมพันธ์ที่เปรียบเทียบกับระดับ mRNA ของ GAPDH ของเซลล์แต่ละชนิด



รูปที่ 49 ผลของ collagen, autocrine และ paracrine ที่มีต่อการแสดงออก ของ mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์ HN4 และ HN12



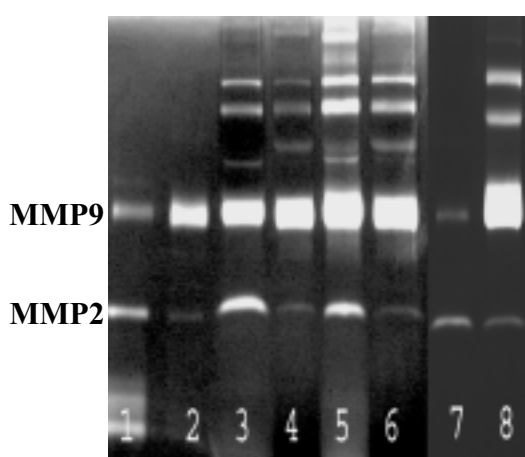
รูปที่ 50 ผลของ collagen, autocrine และ paracrine ต่อระดับ mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์ HN4 เมื่อเปรียบเทียบกับ การสร้าง GAPDH



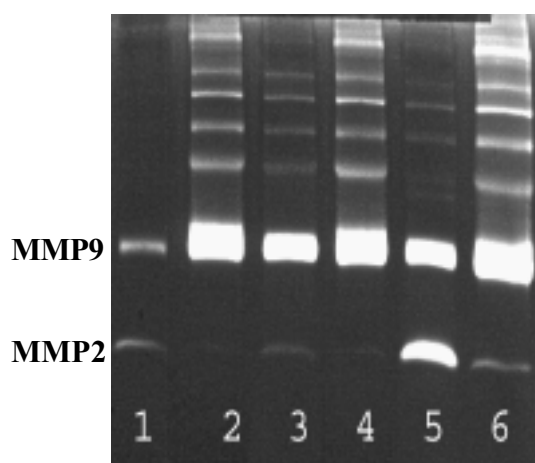
รูปที่ 51 ผลของ collagen, autocrine และ paracrine ต่อระดับ mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์ HN12 เมื่อเปรียบเทียบกับ การสร้าง GAPDH

9. ผลของcytokineต่อการสร้าง MMPs

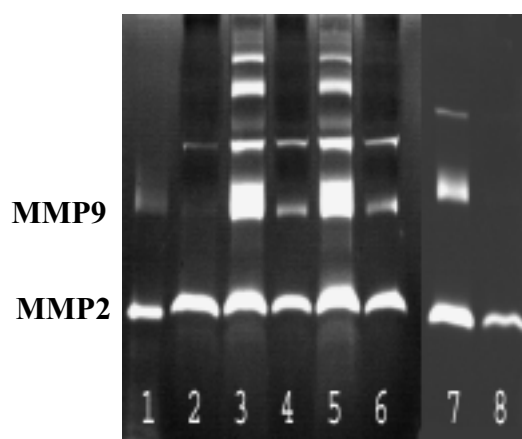
การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TGF- β และ HGF มีผลต่อการสร้าง MMP9 ของเซลล์ HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT ในขณะที่ IL-6 ให้ผลชัดเจนเฉพาะเซลล์ HN30 (รูปที่ 52 และ 53) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละคู่ระหว่าง HN4 กับ HN12 และ HN30 กับ HN31 พบว่า HN4 มีการตอบสนองต่อไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ในการสร้าง MMP9 ได้ดีกว่า HN12 ในขณะที่ HN30 จะถูกกระตุ้นโดย HGF, TNF- α และ TGF- β ส่วน HN31 ถูกกระตุ้นโดย IL-1 α และ IL-1 β สำหรับ HaCaT พบว่าตอบสนองต่อ TNF- α , TGF- β , IL-1 α และ HGF ในการสร้าง MMP9 ได้ดีมาก



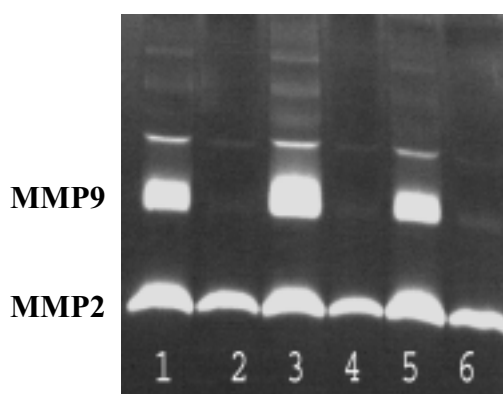
รูปที่ 52A zymogram แสดงผลของ ไซโตไคน์ต่อการสร้าง MMP2 และ 9 ในเซลล์ HN4 และ 12; lane 1=HN4, lane 2=HN12, lane 3=HN4+IL-1 α , lane 4=HN12+IL-1 α , lane 5=HN4+IL-1 β , lane 6=HN12+IL-1 β , lane 7=HN4+IL-6 และ lane 8=HN12+IL-6



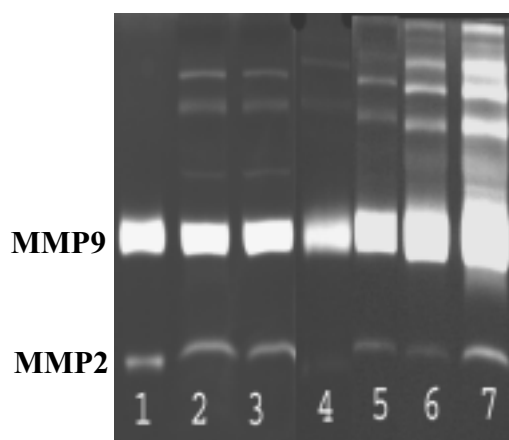
รูปที่ 52B zymogram แสดงผลของ ไซโตไคน์ต่อการสร้าง MMP2 และ 9 ในเซลล์ HN4 และ 12; lane 1=HN4+HGF, lane 2=HN12+HGF, lane 3=HN4+TNF- α , lane 4=HN12+TNF- α , lane 5=HN4+TGF- β , และ lane 6=HN12+TGF- β



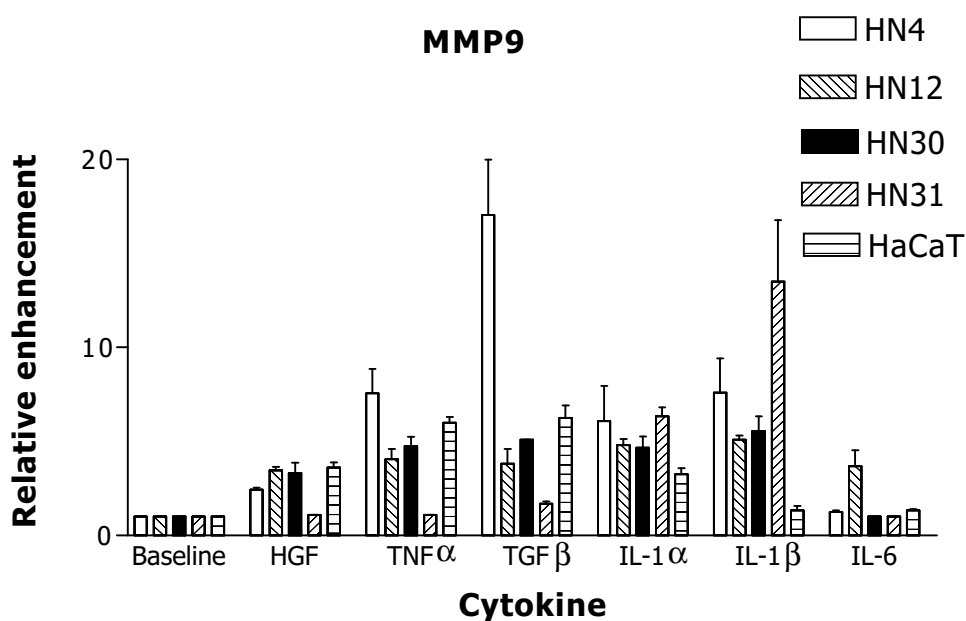
รูปที่ 52C zymogram แสดงผลของ cytokine ต่อการสร้าง MMP2 และ 9 ในเซลล์ HN30 และ 31; lane1= HN30, lane2=HN31, lane3=HN30 +IL-1 α , lane4=HN31+IL-1 α , lane5 =HN30 +IL-1 β , lane6=HN31+ IL-1 β , lane 7 =HN30+IL-6 และ lane8 = HN31+ IL-6



รูปที่ 52D zymogram แสดงผลของ ไซโตไคน์ต่อการสร้าง MMP2 และ 9 ในเซลล์ HN30 และ 31; lane1=HN30 +HGF, lane2=HN31+HGF, lane3=HN30+TNF- α , lane4=HN31 +TNF- α , lane5=HN30+ TGF- β , และ lane6 =HN31+TGF- β



รูปที่ 52E zymogram แสดงผลของ ไซโตไคน์ต่อการสร้าง MMP2 และ 9 ในเซลล์ HaCaT; lane1=HaCaT, lane2=HaCaT+ IL-1 α , lane3= HaCaT +IL-1 β , lane4=HaCaT +IL-6, lane5= HaCaT+HGF, lane6 = HaCaT+TNF- α และ lane7= HaCaT+TGF- β

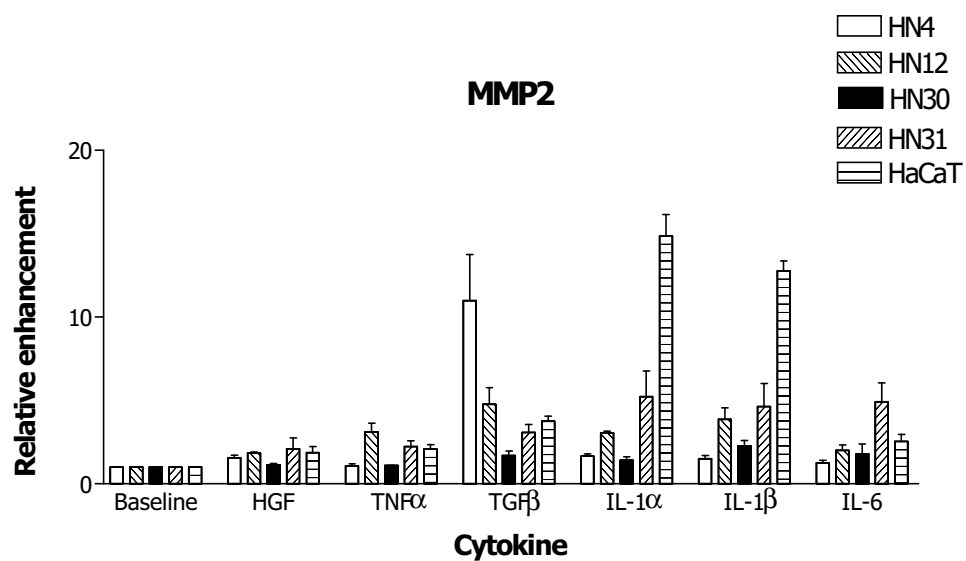


รูปที่ 53 ผลของไซโตไคน์ต่อการสร้าง MMP9 ของเซลล์มะเร็ง และเซลล์ HaCaT โดยค่าที่แสดงคือ mean และ SE ของ relative enhancement ที่เปรียบเทียบกับ baseline (n=3)

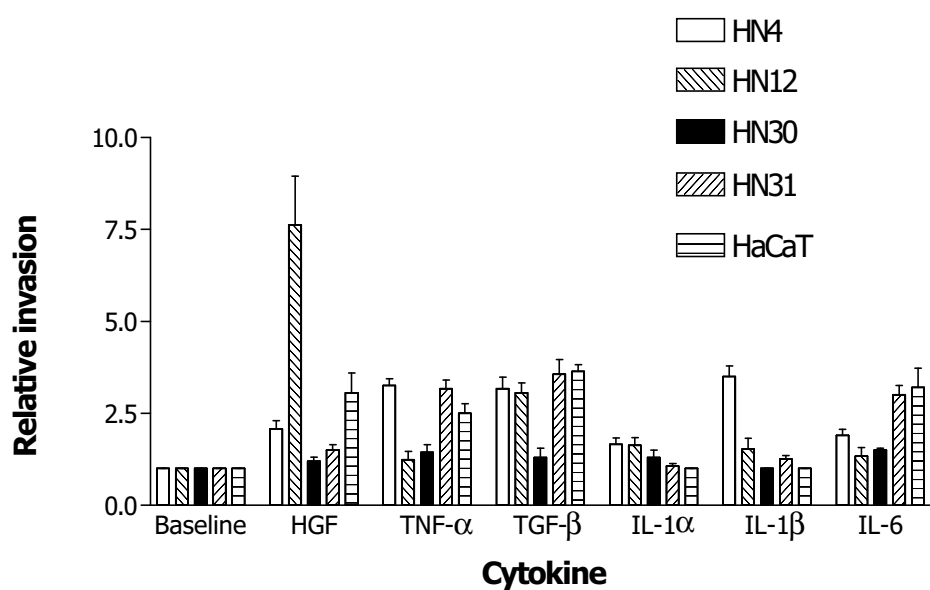
นอกจากจะมีผลต่อ MMP9 แล้ว ยังพบว่าไซโตไคน์สามารถกระตุ้นให้เซลล์ HN และ HaCaT สร้าง MMP2 ได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน (รูปที่ 53 และ 54) โดยพบว่า TGF-β, IL-1α, IL-β, IL-6, TNF-α และ HGF กระตุ้น HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT ให้สร้าง MMP2 มากขึ้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเซลล์แต่ละคู่แล้วพบว่า HN12 ให้ผลตอบสนองต่อไซโตไคน์ในการ activate MMP2 ได้ดีกว่า HN4 ในขณะที่ HN31 ให้ผลดีกว่า HN30 นอกจากนี้ยังพบว่า HaCaT ตอบสนองต่อไซโตไคน์ในการสร้าง MMP2 ได้ดี โดยเฉพาะกับ IL-1α และ IL-β

11. ผลของไซโตไคน์ต่อการรุกรานนอกกาย

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า HGF, TNF-α, TGF-β, IL-1α, IL-β และ IL-6 สามารถกระตุ้น HN4, HN12, HN30, HN31 และ HaCaT รุกรานผ่าน basement membrane ได้มากขึ้นหลายเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ baseline (รูปที่ 55) โดยพบว่า HGF ให้ผลเด่นชัดกับ HN12 และ HaCaT ในขณะที่ TGF-β, TNF-α และ IL-6 ให้ผลดีกับ HN4, HN12, HN31 และ HaCaT ส่วน IL-1-β ให้ผลดีกับ HN4 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเซลล์แต่ละคู่แล้วพบว่า HN4 ตอบสนองต่อไซโตไคน์ในการกระตุ้นให้เกิดการรุกรานได้ดีกว่า HN12 ในขณะที่ HN31 ถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์แล้วให้ผลต่อการรุกรานได้มากกว่า HN30



รูปที่ 54 ผลของไซโตไคน์ต่อการสร้างMMP2ของเซลล์มะเร็งและเซลล์ HaCaT โดยค่าที่แสดงคือ mean และ SE ของ relative enhancement ที่เปรียบเทียบกับ baseline (n=3)



รูปที่ 55 ผลของไซโตไคน์ต่อการการรุกรานของเซลล์มะเร็งและ HaCaT โดยค่าที่แสดงคือ mean และ SE (n=3) ของจำนวนเท้าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

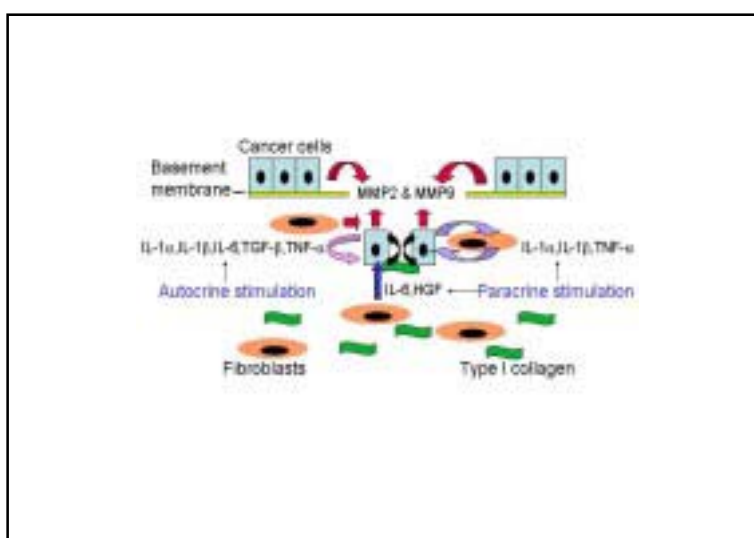
บทวิจารณ์

ผลการทดลองในเรื่อง Invasion และ migration ของเซลล์มะเร็ง (HN) และ keratinocyte (HaCaT) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งมีความสามารถรุกรานออกนอกกายได้ โดยพบว่าเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจาย (HN12 และ HN31) มีความสามารถในการรุกรานออกนอกกายได้มากกว่าเซลล์มะเร็งบริเวณเริ่มต้น (HN4 และ HN-30) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในมะเร็งปอด (19) และ มะเร็งตับอ่อน (20) ที่พบว่าเซลล์มะเร็งที่มีการแพร่กระจายสูงมีความสามารถรุกรานผ่าน Matrigel ได้มากกว่าเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำ การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอบนพลาสติกพบว่าเซลล์มะเร็งดังกล่าวมีการแสดงออกของ MMP2 และ MMP9 แต่ละชนิดที่แตกต่างกันและไม่สอดคล้องกับความสามารถในการรุกรานของเซลล์ซึ่งเป็นการแสดงว่าในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นเซลล์มะเร็งชนิดที่มีความสามารถรุกรานสูงอาจไม่แสดง MMP9 หรือ MMP2 มากกว่าเซลล์ที่มีความสามารถในการรุกรานต่ำ ซึ่งผลการวิจัยนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานอื่นที่พบว่าเซลล์มะเร็งช่องปากที่มีความสามารถรุกรานสูงจะมีการแสดงออกของ MMP2 (8) หรือ MMP9 (21, 22) มาก เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่มีการรุกรานต่ำ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังเป็นที่ถกเถียงกันในเรื่องความสอดคล้องกันระหว่างระดับความรุนแรงของรอยโรคมะเร็งกับการแสดงออกของ MMPs (23, 24) การวิจัยนี้ให้ข้อเสนอแนะเช่นเดียวกับ Kasukawa และคณะ (25) ที่ว่าทั้ง MMP2 และ MMP9 มีบทบาทสำคัญต่อพฤติกรรมการรุกราน และการที่เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอทุกชนิดที่นำมาศึกษามีการคัดหลั่ง MMP2 จึงทำให้เชื่อว่า MMP2 อาจมีบทบาทต่อการรุกรานในระยะเริ่มต้นซึ่งเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารที่เหมาะสมในเวลาต่อมาจะส่งผลให้มีการสร้าง MMPs ได้มากขึ้น ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า collagen ชนิดที่ I มีความสามารถกระตุ้นการสร้าง MMP2 และ MMP9 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ 1 คู่ คือ HN4 และ HN12 โดยพบว่ามีกระบวนการกระตุ้นให้สร้าง MMP9 มากอย่างชัดเจนในเซลล์มะเร็ง ที่รุกราน (HN12) ในขณะที่ Matrigel ไม่สามารถกระตุ้น MMP2 และ MMP9 ให้ active มากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในมะเร็งเต้านม (28) และ endothelial cell (29) ที่เชื่อว่ากลไกในการกระตุ้น MMP2 โดย collagen ชนิดที่ I นั้นเกิดจากการทำปฏิกิริยาของ integrin $\alpha\beta$ กับ native collagen และส่งผลให้มีการกระตุ้น MMP1 และ MT-MMP แล้วย่อย collagen ให้อยู่ในสภาพ denature ทำให้มีการเปิดเผย integrin binding motif (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) ที่สามารถทำปฏิกิริยา $\alpha\beta_3$ ซึ่งจะกระตุ้น MMP2 (30-32) อย่างไรก็ตามกลไกในการกระตุ้น MMP9 โดย collagen ชนิดที่ I ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและมีรายงานในเรื่องดังกล่าวน้อย การศึกษาโดยใช้ keratinocyte จากผิวหนังพบว่า collagen ชนิดที่ I สามารถกระตุ้น MMP9 ในขณะที่ collagen ชนิดที่ IV ลดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว (33) ซึ่งเชื่อว่าการกระตุ้น MMP9 อาจเกิดจากผลทางอ้อมอันเนื่องจากการกระตุ้น MMP2 (34) อนึ่ง การศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์มะเร็งช่องปากพบว่ารอยโรคและเซลล์มะเร็งที่มีการรุกรานและแพร่กระจายมีการแสดงออกของ integrin α_2 , α_3 , α_5 และ α_6 มากขึ้น (35) ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่า integrin น่าจะมีบทบาทในการรุกรานและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การศึกษาครั้งนี้พบว่าการเลี้ยงไฟโบรบลาสต์กับเซลล์มะเร็งมีผลกระตุ้นการคัดหลั่ง MMP9 ได้มากขึ้นใน HN4 และ HN30 และกระตุ้น MMP2 ใน HN31 อันเป็นการแสดงว่าไฟโบรบลาสต์และเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคามีอันตรกิริยาร่วมกันในการกระตุ้น MMPs ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นที่ศึกษาโดยใช้เซลล์มะเร็งชนิดอื่นและเซลล์มะเร็งช่องปาก (36-39) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการกระตุ้น MMPs โดยเซลล์มะเร็งและไฟโบรบลาสต์มีความแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดและการที่ conditioned media ของไฟโบรบลาสต์หรือเซลล์มะเร็ง (HN4, HN12) สามารถกระตุ้นการสร้าง MMPs ได้มากขึ้นเป็นการแสดงว่ากระบวนการ autocrine และ paracrine เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น (36, 38, 40) การตรวจหาระดับการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ในเซลล์ชนิดต่างๆพบว่าเซลล์มะเร็งสามารถสร้าง IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α ,

TGF- β ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wood และคณะ (41) และสนับสนุนสมมติฐานที่เชื่อว่าไซโตไคน์มีบทบาทในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (42) นอกจากนั้นการวิจัย ครั้งนี้พบว่าไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกสามารถแสดงออก mRNA ของ IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β และ HGF เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงาน (43-45) การเพาะเลี้ยงเซลล์ HN4 และ HN12 บน collagen ชนิดที่ I พบว่ามีการกระตุ้นการแสดงออก mRNA ของ IL-1 α , IL-1 β และ TNF- α ได้ชัดเจนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ HN12 อันเป็นการแสดงว่า extracellular matrix มีบทบาทต่อการสร้างไซโตไคน์บางชนิดในเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากเซลล์ปกติที่มีรายงานว่า collagen fibronectin และ laminin ไม่มีผลกระตุ้นการคัดหลั่งไซโตไคน์ในเซลล์ดังกล่าว (46) นอกจากนั้นการวิจัยนี้พบว่า HN4 มีกระบวนการ autocrine ในการกระตุ้น TNF- α มากขึ้นในขณะที่กระบวนการ paracrine อันเกิดจากสารใน conditioned media ของไฟโบรบลาสต์มีผลกระตุ้นการแสดงออก IL-1 α , IL-1 β และ TGF- β นอกเหนือจาก TNF- α ส่วน HN12 พบว่ามีการกระตุ้นให้สร้าง mRNA ของ TGF- β มากในกระบวนการ paracrine ผลการวิจัยนี้แสดงว่า autocrine และ paracrine มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นดังกล่าว ดังนั้นจึงทำให้เชื่อว่าสารใน conditioned media ที่มีบทบาทในการ กระตุ้น activity ของ MMPs นั้นน่าจะเป็นไซโตไคน์ (47-52) อนึ่งข้อที่น่าสังเกตจากการวิจัยครั้งนี้คือเซลล์มะเร็งที่ปกติมีการคัดหลั่ง MMP9 น้อย (HN4 และ HN31) จะถูกกระตุ้นให้สร้าง MMP9 ได้มากขึ้นชัดเจน

การศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งและ HaCaT พบว่า HGF, TNF- α , TGF- β และ IL-6 สามารถกระตุ้นการรุกรานของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น (49,51-55) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดสำหรับกลไกที่ไซโตไคน์กระตุ้นการสร้าง MMPs และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่า IL-1 β สามารถกระตุ้น MMP9 ด้วยกระบวนการที่อาศัย Protein kinase C (56) IL-6 กระตุ้นให้มีการสร้าง MMP9 โดยกระตุ้น c-jun, jun B และ c-fos หรือด้วยการ binding ของ AP1 กับ DNA (57) TGF- β และ TNF- α มีผลกระตุ้น MMP9 ในระดับ transcription โดยมีการกระตุ้น promotor ตรงลำดับ base ที่ -474 และ -601 ซึ่งเป็น NF-KB binding site ของ TGF- β และ TNF- α ตามลำดับ (58) อนึ่ง TGF- β อาจมีผลต่อการสร้าง MMPs ด้วยการทำให้ mRNA ของ MMPs มีเสถียรภาพมากขึ้นหรือไปเพิ่มเสถียรภาพของ ProMMPs (59) HGF สามารถกระตุ้น EIAF ซึ่งเป็น transcription factor และมีผลกระตุ้น gene ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง MMPs (60) นอกจากนั้น HGF อาจกระตุ้นให้เกิดการรวมตัว (clustering) ของ integrin และมีผลให้เกิด lamellipodia ซึ่งเอื้อให้เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่และรุกรานได้มากขึ้น (61) การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโดยทั่วไปเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอมีความสามารถในการแสดงออกของ gene ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง MMP2 โดยจะพบว่าเซลล์มะเร็งชนิดนี้มีการคัดหลั่ง MMP2 เสมอและอาจไม่พบการคัดหลั่ง MMP9 ใน cell line บางชนิด จึงทำให้เชื่อว่าการแสดงออกของ MMPs ชนิดใดชนิดหนึ่งอาจไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของรอยโรคที่เป็นต้นกำเนิดของเซลล์มะเร็งที่นำมาศึกษา กล่าวคือโดยภาพรวมแล้วเมื่อเซลล์มะเร็งเจริญเติบโตและมีการ สร้าง MMPs มากขึ้นเอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่สลาย basement membrane ซึ่งเป็น extracellular matrix ที่กั้นระหว่าง epithelium และ connective tissue และมีผลทำให้เซลล์มะเร็งรุกรานผ่านชั้นเยื่อหุ้มเข้าสู่เนื้อเยื่อถัดไปได้โดยการวิจัยนี้พบว่า basement membrane ไม่มีผลกระตุ้นการสร้าง MMPs ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่นำมาศึกษา เซลล์มะเร็งเมื่อรุกรานเข้ามาในชั้น เนื้อเยื่อถัดไปจะมีโอกาสเกิดอันตรกิริยากับ extracellular matrix และเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นดังกล่าวซึ่งในสภาวะปกติแล้วจะไม่มีโอกาสสัมผัส นอกจากนั้นการศึกษานี้พบว่า collagen ชนิดที่ I รวมทั้งไฟโบรบลาสต์สามารถกระตุ้น MMPs และส่งเสริมการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็นไปในลักษณะแบบ autocrine และ paracrine โดยเชื่อว่าไซโตไคน์เป็นสารสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีความสามารถในการตอบสนองการกระตุ้นได้แตกต่างกัน โดยพบว่าเซลล์มะเร็งที่ได้จาก

บริเวณต่อมน้ำเหลืองมีแนวโน้มในการตอบสนองที่เอื้อให้เกิดการรุกรานได้มากกว่าเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงได้จากอวัยวะเริ่มต้น นอกจากนั้นยังพบว่าไซโตไคน์มีความสามารถกระตุ้นไฟโบรบลาสต์ให้สร้างMMPsได้ ซึ่งแสดงว่าไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ที่มีความสามารถหนึ่งย่นำให้เซลล์มะเร็งสร้างMMPsโดยอาศัยไซโตไคน์ ดังนั้นผลการวิจัยนี้สนับสนุนแนวคิดที่ว่า การรุกรานของเซลล์มะเร็งเป็นกระบวนการที่มีหลายขั้นตอน และเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของgeneในเซลล์มะเร็งและต้องมี สภาพแวดล้อม (microenvironment) ของเซลล์มะเร็งที่เหมาะสม (5-7) แนวความคิดดังกล่าวทำให้เชื่อว่าการป้องกันการรุกรานของมะเร็งนอกจากจะจัดการโดยตรงกับเซลล์มะเร็งแล้วยังอาจกระทำได้โดย การทำให้สภาพแวดล้อม ของเซลล์มะเร็งไม่เอื้อให้เกิดการรุกราน อาทิ การจัดการไฟโบรบลาสต์โดยการฉายาหรือ gene therapy เพื่อให้มันไม่สามารถกระตุ้นการสร้างMMPsหรือหนึ่งย่นำให้เซลล์มะเร็งมีการรุกรานได้มากขึ้น โดยผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ด้วยแผนภาพในรูปที่ 56



รูปที่56 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็ง extracellular matrix ไฟโบรบลาสต์ และไซโตไคน์ในการกระตุ้นการสร้าง MMPs และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.นพ.วิจารณ์ พานิช ศ.ดร.สถิตย์ ลีวิสิษฐ รศ.ทพ. ประทีป พันธุมนิช รศ.ทพ.จีรศักดิ์ นพคุณ Dr. Silvio Guskind Dr. Vyomesh Patel Dr. Hynda Kleinman และภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

1. Deerasamee S, Martin N, Sontipong S, Sriamporn S, Sriplung H, Srivatanakul P, Vatanasapt V, Parkin D, Ferlay J (2001). Cancer registration in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 2, IACR Supplement: 79-84.
2. Rao DN, Shroff PD, Chattopadhyay G, Dinshaw KA (1998) Survival analysis of 5595 head and neck cancers results of conventional treatment in a high-risk population. *Br J Cancer* 77:1514-1518.
3. Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S (1995). Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl* 77: 325-331.
4. Akkayanont P, Chungpanich S, Sriplung H (1997). Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a review of 1022 cases in southern Thailand. *J Dent Assoc Thai* 47:208-214.
5. Engers R, Gabbert HE (2000). Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 682-692.
6. Johansson N, Ahonen M, Kahari VM (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57:5-15.
7. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM (1999). Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncology* 35: 227-233.
8. Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M (1997). Possible contribution of active MMP2 to lymph node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral squamous cancer cell lines. *Int J Cancer* 70: 120-127.
9. Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Hornamm K (2000). Serum levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 20:3045-3050.
10. Koontongkaew S, Jipukdeebodindra S (1998). Synthesis of matrix metalloproteinases by cell lines derived from primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck. *Thai J Oral Maxillofac Surg* 12:3-9.
11. Tlsty TD, Hein PW (2001). Know the neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Gen Dev* 11: 54-59.
12. Reynold JJ, Meikle MC (1997). Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000 14: 144-157.
13. Curran S, Murray GI (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630.
14. Kibbey MC (1994). Maintenance of the EHS sarcoma and matrigel preparation. *J Tissue Cult Methods* 16:227-230.
15. Bollag DM, Edelstein SJ (1991). Protein methods. New York, Wiley-Liss, pp 60-62.
16. Hoffman MP, Kibbey MC, Letterio JJ, Kleinman HK (1996). Role of laminin-1 and TGF- β 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). *J Cell Sci* 109:2013-2021.
17. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN (1987). A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47:3239-3245.
18. Fisher SJ, Werb Z (1995). The catabolism of extracellular matrix components. In: *Extracellular matrix: a*

- practical approach*. Haralsop MA, Hassell JR, editors. New York: Oxford University Press, pp 261-287.
19. He C, He P, Lin LP, Zhu YS (2001). Analysis of expression of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 180-186.
 20. Yang X, Staren ED, Howard JM, Iwamura T, Bartsch JE, Appert HE (2001). Invasiveness and MMP expression in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* 98: 33-39.
 21. Juarez J, Clayman G, Nakajima M, Tanabe KK, Saya H, Nicolson GL, Boyd D (1993). Role and regulation of expression of 92-kDa type-IV collagenase (MMP-9) in 2 invasive squamous cell carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int J Cancer* 55: 10-18.
 22. O-Charoenrat P, Evans PR, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S (2000). Overexpression of epidermal growth factors receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 86: 307-317.
 23. Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M (1993). Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 99: 18-23.
 24. Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, Sorsa T, Salo T (1998). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 77: 2239-2245.
 25. Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M (1992). Production of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase/type IV collagenase) and 3 (stromelysin) by cultured oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 21: 221-224.
 26. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY (2000). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 36: 207-213.
 27. Aznavoorian S, Moore BA, Alexander-Lister DA, Hallit SL, Windsor LJ, Engler JA (2001). Membrane type I-matrix metalloproteinase-mediated degradation of type I collagen by oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Res* 61: 6264-6275.
 28. Thompson EW, Yu M, Bueno J, Jin L, Maiti SN, Palao-Marco FL, Pulyaev H, Tamborlane JW, Wapnir I (1994). Collagen induced MMP-2 activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31: 357-370.
 29. Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998). Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 3604-3610.
 30. Invaska J, Heino J (2000). Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57: 16-24.
 31. Ellerbroek SM, Fisherman DA, Kearns AS, Bafetti LM, Stack MS (1999). Ovarian carcinoma regulation of matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1 matrix metalloproteinase through $\beta 1$ integrin. *Cancer Res* 59: 1635-1641.
 32. Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, Breitkopf K, Steurer P, Klein CE, Krieg T, Mauch C (1999). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type I matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol*

Chem 274:21056-21062.

33. Sarret Y, Woodley DT, Goldberg GS, Kronberger A, Wynn KC (1992). Constitutive synthesis of a 92-kDa keratinocyte-derived type IV collagenase is enhanced by type I collagen and decreased by type IV collagen matrices. *J Invest Dermatol* 99: 836-841.
34. Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S (1995). Activation of progelatinase B(MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 55: 2548-2555.
35. Shinohara M, Nakamura S, Sasaki M, Kurahara S, Ikebe T, Harada T, Shirasuna K (1999). Expression of integrins in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Am J Clin Pathol* 111: 75-88.
36. Lengyel E, Gum R, Juarez J, Clayman G, Seiki M, Sato H, Boyd D (1995). Induction of Mr 92,000 type IV collagenase expression in a squamous cell carcinoma cell line by fibroblasts. *Cancer Res* 55: 963-967.
37. Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Muschel RJ (1994). Induction of fibroblast 92 kDa gelatinase/ type IV collagenase expression by direct contact with metastatic tumor cells. *J Cell Sci* 107: 477-486.
38. Sato T, Iwai M, Sakai T, Sato H, Mori Y, Ito A (1999). Enhancement of membrane-type 1-matrix metalloproteinase(MT-MMP) production and sequential activation of progelatinase A on human squamous carcinoma cells co-cultured with human dermal fibroblasts. *Br J Cancer* 80: 1137-1143.
39. Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, Kanzaki J (2000). Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Letters* 150:15-21.
40. Hyuga S, Nishikawa Y, Sakata K, Tanaka H, Yamagata S, Sugita K, Saga S, Matsuyama M, Shimizu S (1994). Autocrine factor enhancing the secretion of Mr 95,000 gelatinase (matrix metalloproteinase 9) in serum-free medium conditioned with murine metastatic colon carcinoma cells. *Cancer Res* 54: 3611-3616.
41. Wood KV, El-Naggar A, Clayman GL, Grimm EA (1998). Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer Res* 58: 3132-3141.
42. Siragusa T, Miller AR, Belluco C, Nitto D, Lise M, Jessup JM (2000). The role of circulation cytokines in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 5: 217-228.
43. Tamuara M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H, Daikuhara Y (1993). Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 α and -1 β and tumor necrosis factor- α by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 268: 8140-8145.
44. Tipton DA, Dabbous MK (1998). Autocrine transforming growth factor beta stimulation of extracellular matrix production by fibrotic human gingiva. *J Periodontol* 69:609-619.
45. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M (1999). In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblast, osteoblast and monocyte. *J Oral Maxillofac Surg* 57: 409-419.
46. Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K (2000). Interleukin-1 α -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. *J Dent Res* 79: 1423-1430.

47. Mann EA, Hibbs M, Wang WZ, Spiro JD, Clawson M, Bowik C, Chen LL (1995). Cytokine regulation of gelatinase production by head and neck squamous cell carcinoma: the role of tumor necrosis factor- α . *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 203-209.
48. MacDougall JR, Bani MR, Muschel RJ, Kerbel RS (1999). "Proteolytic switching": opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br J Cancer* 80:504-512.
49. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hinda K, Ono M, Kohgo T, Nakamura M, Notami KI, Fukuda H, Totsuka Y, Yoshida K, Fujinaga K (2000). Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* 21: 1079-1085.
50. Bennett JH, Morgan MJ, Whawell SA, Atkin P, Robin P, Furness J, Speight PM (2000). Metalloproteinase expression in normal and malignant oral keratinocytes: stimulation of MMP-2 and -9 by scatter factor. *Eur J Oral Sci* 108: 281-291.
51. Welch DR, Fabra A, Nakajima M (1990). Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7678-7682.
52. Gohji K, Nomi M, Hara I, Arakawa S, Kamidono S (1998). Influence of cytokines and growth factors on matrix metalloproteinase-2 production and invasion of human renal cancer. *Urol Res* 26: 33-37.
53. Hasina R, Matsumoto K, Taniura NM, Kato I, Sakuda M, Nakamura T (1999). Autocrine and paracrine motility factors and their involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line. *Br J Cancer* 80: 1708-1717.
54. Nishino H, Miyata M, Hitamura K (1998). The effect of interleukin-6 enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells in vitro. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255: 468-472.
55. Johansson N, Ala-aho R, Uitto VJ, Grenman R, Fusenig NE, Lopez-Otin C, Kahari VM (2000). Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Sci* 113: 227-235.
56. Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansson H (1993). Interleukin-1 β and transforming growth factor- α / epidermal growth factor induce expression of Mr 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 268: 19143-19151.
57. Solis-Herruzo J, Rippe RA, Schrum LW, Torre PDL, Garcia I, Jeffery JJ, Munoz-Yague T, Brenner DA (1999). Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 274:30919-30926.
58. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL (2001). Transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 276:22341-22350.
59. Sehgal I, Thompson TC (1999). Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor- β 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 10:407-416.

60. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, Ono M, Kohgo T, Nakamura M, Notani KI, Fukuda H, Totsuka Y, Yoshida K, Fujinaga K (2000). Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* 21: 1079-1085.
61. Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Ando M, Bertotti A, Comoglio PM, Boccaccio C (2000). HGF/ scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *FASEB J* 14: 1629-1640.