



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบ myosin ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดแพร่
กระจาย

โดย ดร. ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง

เสร็จสิ้นโครงการ ธันวาคม พ.ศ. 2543

สัญญาเลขที่ RSA/08/2540

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบ myosin ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดแพร่กระจาย

ผู้วิจัย

สังกัด

ดร. ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง

ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รหัสโครงการ: RSA/08/2540

ชื่อโครงการ: การตรวจสอบ myosin ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดแพร่กระจาย

ชื่อนักวิจัย: ดร. ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง

E-mail address: scrth@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: พ.ศ. 2540-43

การแพร่กระจายของมะเร็ง (cancer metastasis) เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง การยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งจึงอาจช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งได้

มะเร็งที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงมีคุณสมบัติแตกต่างไปจากมะเร็งชนิดที่ไม่แพร่กระจาย หรือ ชนิดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำหลายประการ คุณสมบัติบางประการที่เปลี่ยนไป อาทิเช่น การเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility), การหลั่งโปรติเอส, การชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และ การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ ซึ่งเชื่อว่า myosin activity ภายในเซลล์อาจถูกกระตุ้น และ อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายออกไปได้

Myosin activity ถูกกระตุ้นได้ด้วยขบวนการ phosphorylation ที่บน subunit ย่อยที่ชื่อว่า MRLC (myosin regulatory light chain) ดังนั้น ในโครงการนี้ เราได้ทำการศึกษาว่ามีการกระตุ้น MRLC phosphorylation ในเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการแพร่กระจายหรือไม่ และการกระตุ้น MRLC phosphorylation นี้มีความสำคัญต่อความสามารถในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งชนิดแพร่กระจายอย่างไร โดยเราได้ยับยั้งขบวนการ MRLC phosphorylation ด้วย chemical inhibitor แล้วตรวจสอบผลกระทบต่อการบุกรุกผ่าน matrigel ของเซลล์มะเร็งชนิดแพร่กระจาย *in vitro*

จากการศึกษาเซลล์มะเร็ง rat prostatic adenocarcinoma ชนิดแพร่กระจาย 2 ชนิด โดยใช้ chemical inhibitor 2 ชนิด เราพบว่า การยับยั้ง MRLC phosphorylation มีผลทำให้การบุกรุกของเซลล์มะเร็งลดลง โดยที่มิได้มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อ การดำรงชีวิตของเซลล์ (cell survival), การหลั่ง gelatinase และ การเกาะติดกับพื้นผิวของ matrigel (adhesion) แต่ความสามารถในการบุกรุกที่ลดลงนี้ เป็นเพราะเซลล์มะเร็งมีความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility) ลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับความรู้เกี่ยวกับบทบาทของ myosin ในเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นที่ทราบดี

Keywords: cancer, metastasis, invasion, myosin, phosphorylation

Project Code: RSA/08/2540

Project Title: Myosin in metastatic breast carcinomas: Its possible roles in metastasis and its use as anticancer drug target

Investigator: Dr. Rutaiwan Tohtong

E-mail address: scrth@mahidol.ac.th

Project Period: 1997-2000

Cancer metastasis is the major cause of death among cancer patients. Inhibition of this process should serve as an effective strategy to reduce death rate in cancer patients.

Highly metastatic cancer cells are different from poorly-metastatic and non-metastatic ones in a number of ways. Some of these include increased motility, protease secretion, angiogenesis and cell shape change, all of which imply increased myosin activity, rendering cancer cells to acquire the metastatic phenotype.

Myosin activity is stimulated by phosphorylation of the regulatory subunit, namely the MRLC (myosin regulatory light chain). In this project, we attempted to understand if MRLC phosphorylation is activated in metastatic cancer cells, and how this activation attributes to cancer invasiveness by assessing the effect of inhibiting MRLC phosphorylation on cancer cell invasion *in vitro* using chemical inhibitors.

Data from 2 prostatic adenocarcinoma cell lines with different metastatic potentials and 2 MLCK inhibitors showed a consensus result that reduction of MRLC phosphorylation parallels a decrease in cancer cell invasion without significant effects on cell survival, gelatinase secretion and adhesion to matrigel surface; but with marked reduction in cellular motility. These data are, nevertheless, not unexpected given the well-defined role of MRLC phosphorylation in normal cells.

Keywords: cancer, metastasis, invasion, myosin, phosphorylation

บทนำ

การแพร่กระจายของมะเร็งเป็นขบวนการหลายขั้นตอน ขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญคือ การบุกรุกของเซลล์มะเร็งออกจากอวัยวะที่อยู่เดิม ผ่านเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายออกไปสู่ที่ใหม่ มีการศึกษาเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งระยะแรก (early stages) กับ ระยะปลาย (late stages) พบว่า เซลล์มะเร็งระยะปลาย ซึ่งส่วนมากได้มีการบุกรุกเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือ ได้แพร่กระจายออกไป แล้วนั้น มีคุณสมบัติที่จำเป็นต่อการบุกรุกเพิ่มขึ้น อาทิเช่น มีการเคลื่อนที่ได้ดีขึ้น, สามารถหลั่งโปรติเอสสำหรับย่อยสลายเนื้อเยื่อเพื่อเปิดทางให้เซลล์มะเร็งสามารถเคลื่อนที่ไปได้มากขึ้น, ชักนำให้มีการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่เพื่อมาหล่อเลี้ยงก้อนมะเร็ง, ทนต่อการกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และ มีการสร้างสารเกาะติด (adhesion molecules) ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมใหม่ (1,2) นอกจากนี้ เซลล์มะเร็งที่สามารถแพร่กระจายได้ยังมีรูปร่าง และ การเรียงตัวของ cytoskeletal proteins ที่ต่างไปจากเดิม กล่าวคือ มักจะมีโครงสร้างที่ช่วยในการเคลื่อนที่ เช่น filopodia และ lamellipodia เพิ่มขึ้น และ การเรียงตัวของ cytoskeletal proteins ที่ไม่เป็นระเบียบ บ่งชี้ว่าโปรตีนเหล่านี้อยู่ในภาวะทำงานอย่างต่อเนื่อง (3)

คุณสมบัติที่เปลี่ยนไปเหล่านี้ ชี้แนะว่ามี myosin activity เพิ่มขึ้นในเซลล์ Myosin activity ถูกกระตุ้นด้วยขบวนการ phosphorylation ที่ subunit ย่อย (MRLC, myosin regulatory light chain) โดยเอนไซม์ MLCK (myosin light chain kinase) (4) จากการศึกษาใน human glioma cells พบว่า เมื่อใส่ MLCK inhibitor (สารที่ยับยั้ง MLCK ทำให้ MRLC phosphorylation ลดลง) ลงไป ทำให้เซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลง ควบคู่ไปกับการลดจำนวน stress fiber และ การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ โดยที่ไม่มีผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ (cell viability) (5) ผลจากการทดลองนี้ แสดงว่า MRLC phosphorylation มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง และ ชี้แนะว่า การยับยั้ง MRLC phosphorylation อาจช่วยยับยั้งการบุกรุก และ/หรือ แพร่กระจายของมะเร็งได้โดยอาจมี

ผลข้างเคียงต่อ cell survival น้อยมาก และ อาจเปิดทางเลือกใหม่ในการบำบัดรักษามะเร็ง

แทนวิธีการที่ใช้กันอยู่เดิม คือ การใช้เคมีบำบัด, รังสีบำบัด และ การผ่าตัด

ในโครงการวิจัยนี้ เราได้เปรียบเทียบระดับของ MRLC phosphorylation ใน rat

prostatic adenocarcinomas 2 ชนิด ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายในสัตว์ทดลองต่างกัน

และ ตรวจสอบผลกระทบของการยับยั้งขบวนการ MRLC phosphorylation ต่อคุณสมบัติต่างๆ

ที่จำเป็นต่อการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ การเคลื่อนที่, การเกาะติด, การหลั่ง gelatinase,

การแบ่งเซลล์ และ การเรียงตัวของ actin-myosin filaments ภายในเซลล์

วิธีการทดลอง & อุปกรณ์

เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลองเป็น rat prostatic adenocarcinoma ที่เรียกว่า 'The Dunning Lines' ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่างๆที่มีต้นกำเนิดเดียวกัน แต่ได้ผ่านการคัดเลือกในหนู rat จนได้สายพันธุ์ต่างๆที่มีความสามารถในการแพร่กระจาย (*in vivo*) ต่างกัน (6) MLL จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการแพร่กระจาย (*in vivo*) และ ในการบุกรุก (โดยใช้ *in vitro* invasion assay) สูง ในขณะที่ AT-02 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถทั้ง 2 ประการอยู่ในระดับปานกลางถึงต่ำ (7)

เซลล์มะเร็งเหล่านี้ถูกเลี้ยงใน RPMI ที่มี 10% FBS (fetal bovine serum) ใน 5% CO₂ ที่ 37 °C

MLCK inhibitors

ในโครงการนี้ เราใช้ MLCK inhibitors 2 ชนิด คือ ML-7 (1-(5-Iodonaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine, Hydrochloride) และ ML-9 (1-(5-Chloronaphthalenesulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine Hydrochloride) จาก Toronto Research Chemicals, Inc. (Canada)

เบ็ดเตล็ด

Monoclonal anti-MRLC 20 Kd และ Polyclonal HRP-conjugated goat-anti-mouse IgM (μ -chain specific) จาก Sigma, FITC-conjugated mouse anti-rabbit IgG และ

Phalloidin-TRITC จาก Sigma, Transwell จาก Costar, Matrigel จาก Beckton-Dickinson, Fibronectin จาก BRL

วิธีการทดลอง

1) Invasion assay

เตรียม invasion chamber ที่จะใช้ โดยนำ transwell มาเคลือบที่ส่วน insert ด้วย 30 μ g matrigel /100 μ l อาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้น reconstitute ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 μ l ก่อนนำมาใช้ทดลอง

นำเซลล์มะเร็ง 30,000 เซลล์ในปริมาตร 200 μ l มาใส่ใน insert ที่เคลือบ matrigel ไว้แล้ว ส่วนใน lower chamber ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อผสม 25 μ g/ml fibronectin และ 10% FBS ในปริมาตร 0.6 ml จากนั้น บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง นำ insert ออกมาย้อมสีเซลล์ที่ติดอยู่ด้วย 0.5% crystal violet ใน 25% methanol เป็นเวลา 15 นาที, ล้างสีออก 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 5 นาที แล้วนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X

2) Motility assay

เหมือนกับ invasion assay แต่ไม่ต้องเคลือบ insert ด้วย matrigel ใช้ 150,000 เซลล์/หลุม แล้วบ่มไว้ 6 ชั่วโมงก่อนนับเซลล์บน insert ด้วยการย้อมสี crystal violet

3) Proliferation assay

นำเซลล์จำนวน 3000-5000 เซลล์ในปริมาตร 100 μ l ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10% FBS มาใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จากนั้นบ่มใน 5% CO₂ incubator ที่ 37 °C นาน

72 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย 0.5% crystal violet ใน 25% methanol เป็นเวลา 15 นาที

elute สีด้วย 0.1 M sodium citrate ใน 50% ethanol จากนั้น อ่านค่า OD 540 nm

4) Adhesion assay

เตรียม 96-well plate โดยเคลือบแต่ละหลุมด้วย 30 μ g matrigel /100 μ l อาหารเลี้ยงเชื้อ
เช่นเดียวกับใน invasion assay (1) แล้ว block พื้นผิว matrigel ด้วย 3% BSA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
ใน 5% CO₂ incubator ล้าง BSA ออกด้วย PBS 2 ครั้งแล้วปล่อยให้แห้งประมาณ 30 นาที

ใส่เซลล์จำนวน 3000-5000 เซลล์ในปริมาตร 100 μ l/หลุม แล้วบ่มใน 5% CO₂
incubator ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ที่ไม่เกาะติดทิ้งไป ย้อมเซลล์ที่เกาะด้วย
0.5% crystal violet ใน 25% methanol เป็นเวลา 15 นาที แล้ว destain ใน running tap water
เป็นเวลา 30 นาที แล้วนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X

5) Gelatin zymography

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี FBS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ
นั้น (conditioned media) มาตรวจสอบ gelatinase activity โดยแยกโปรตีนด้วย 7.5% SDS-
PAGE ที่ผสม 1mg/ml gelatin นำเจลมาล้างด้วย 2.5% triton X-100 2 ครั้งๆละ 30 นาที จาก
นั้นแช่เจลใน activation buffer ซึ่งประกอบด้วย 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM CaCl₂, 1
mM ZnCl₂, 10% triton X-100 และ 2% NaN₃ นาน 17 ชั่วโมงที่ 37 °C ย้อมเจลด้วย 0.5%
Coomassie blue แถบสีที่เกิดขึ้นเป็นผลของการย่อย gelatin โดยเอนไซม์ gelatinase

6) Urea-glycerol gel electrophoresis & Immunoblot

เตรียมโปรตีนจากเซลล์โดยเติมสารละลายที่มี 10% TCA และ 10 mM DTT แล้วแช่ไว้บน

น้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นปั่นใน microfuge เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วล้างตะกอนด้วย diethyl ether 3 ครั้งๆละ 2 นาที ปล่อยให้ diethyl ether ระเหยแล้วละลายตะกอนโปรตีนด้วย sample buffer ที่ประกอบด้วย 23 mM glycine, 8 M urea, 20 mM Tris base, 2% triton X-100, 100 mM DTT และ 0.004% bromophenol blue ปล่อยให้ละลาย 30 นาทีให้ละลาย แล้วปั่นแยกเอาส่วนที่ละลาย (supernatant) มาแยกโปรตีนโดยใช้ native PAGE ที่ประกอบด้วย 10% acrylamide, 0.5% bis-acrylamide และ 40% glycerol ที่ 370 V, 4 °C นาน 6 ชั่วโมง จากนั้น transfer โปรตีนไปบนแผ่น nitrocellulose โดยใช้สารละลายของ 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.6 ที่ 25 V นาน 1.5 ชั่วโมง

นำ blot มาแช่ใน blocking buffer (5% skim milk ใน TBST buffer) ค้างคืนที่ 4 °C จากนั้น ทำปฏิกิริยากับ 1:200 dilution ของ monoclonal anti-MRLC ใน blocking buffer นาน 1 ชั่วโมง ล้าง primary antibody ออกด้วยการล้างใน TBST buffer 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้ว ทำปฏิกิริยากับ 1:1000 dilution ของ HRP-conjugated goat anti-mouse IgM ใน blocking buffer นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST buffer 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วทำปฏิกิริยากับ ECL reagent 1 นาที ประทับ x-ray film

7) Fluorescence microscopy

(7.1) การย้อมดู myosin

เตรียมเซลล์โดยการเลี้ยงบน glass coverslip ใส่ ML-7 แล้วทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้น fix เซลล์ด้วย paraformaldehyde เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการ permeabilize เซลล์ด้วย 0.5% triton X-100 ใน TBS เป็นเวลา 20 นาที

จากนั้น incubate ใน blocking buffer ที่ประกอบด้วย 5% BSA ใน TBS เป็นเวลา 20 นาที แล้วตามด้วย 1:25 dilution ของ rabbit anti-myosin IgG (nonmuscle) ใน blocking

buffer เป็นเวลา 60-90 นาทีในที่มืด ล้าง primary antibody ออกด้วย blocking buffer และ TBS อย่างละครึ่ง แล้ว incubate กับ 1:200 dilution ของ FITC-conjugated mouse-anti-rabbit IgG เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด ล้างออกด้วย blocking buffer และ TBS อย่างละครึ่ง ดูเซลล์ได้กล้อง fluorescence microscope

(7.2) การย้อมดู actin

Incubate เซลล์ที่ permeabilized แล้วในสารละลายของ 50 $\mu\text{g/ml}$ fluorescein phalloidin conjugate ใน PBS เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วดูเซลล์ด้วย fluorescence microscopy

ผลการทดลอง

ผลของ MLCK inhibitors ต่อ การบุกรุก, การเคลื่อนที่, การแบ่งเซลล์ และ การเกาะติด

ML-7 สามารถยับยั้งการบุกรุก (invasion) ของเซลล์มะเร็ง rat prostatic adenocarcinoma ชนิด AT-02 ได้ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกได้ถึง 66.9% ในขณะที่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (motility) ถูกยับยั้ง 72.4% (รูปที่ 2) การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งเพียง 24.7% (รูปที่ 1) และ ความสามารถในการเกาะติด matrigel ไม่ถูกยับยั้ง (รูปที่ 3)

ML-7 สามารถยับยั้งการบุกรุก (invasion) ของเซลล์ MLL โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกได้ถึง 82.4 % ในขณะที่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (motility) ถูกยับยั้ง 60.7% (รูปที่ 9) การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งเพียง 20.5% (รูปที่ 8) และ ความสามารถในการเกาะติด matrigel ไม่ถูกยับยั้ง (รูปที่ 10)

ML-9 สามารถยับยั้งการบุกรุก (invasion) ของเซลล์ AT-02 โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกได้ถึง 52.8 % ในขณะที่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (motility) ถูกยับยั้ง 63.9 % (รูปที่ 5) การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งเพียง 20.7% (รูปที่ 4) และ ความสามารถในการเกาะติด matrigel ไม่ถูกยับยั้ง (รูปที่ 6)

ML-9 สามารถยับยั้งการบุกรุก (invasion) ของเซลล์ MLL โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกได้ถึง 63.9 % ในขณะที่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (motility) ถูกยับยั้ง 60.8% (รูปที่ 12) การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งเพียง 9.1% (รูปที่ 11) และ ความสามารถในการเกาะติด matrigel ไม่ถูกยับยั้ง (รูปที่ 13)

ผลของ Methotrexate ต่อการบุกรุก และ การแบ่งเซลล์

Methotrexate ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (1000 nM) สามารถยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ AT-02 ได้ 63.0 % ในขณะที่การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้ง 83.9 % (รูปที่ 7)

Methotrexate ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (1000 nM) สามารถยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ MLL ได้ 60.1 % ในขณะที่การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้ง 64.9 % (รูปที่ 14)

ผลของ MLCK inhibitors ต่อ gelatinase activity

บน gelatin zymogram ของเซลล์ MLL พบว่ามีแถบไฮโดรไลซิสที่ประมาณ 72 Kd ซึ่งแสดงถึง gelatinase activity ณ ตำแหน่งนั้น ทุกความเข้มข้นของ ML-7 ที่ใช้ไม่มีผลยับยั้ง gelatinase activity รวมทั้งความเข้มข้นของ ML-7 ที่ 75 μ M ซึ่งสามารถยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ MLL ได้

การทดสอบเซลล์ MLL กับ ML-9 ให้ผลเช่นเดียวกันกับ ML-7 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

การทดสอบผลของ ML-7 และ ML-9 ต่อการหลั่ง MMPs ของ เซลล์ AT-02 ไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจาก gelatinase activity มีระดับต่ำมากในเซลล์ AT-02

ผลของ MLCK inhibitors ต่อระดับของ MRLC phosphorylation

รูปที่ 16 แสดงการแยก phosphorylated variants ของ MRLC โดยใช้ urea-glycerol gel electrophoresis monoclonal anti-MRLC antibody ทำปฏิกิริยาอย่างเด่นชัดกับโปรตีนในบริเวณ 20 Kd จำนวน 3-4 แถบเป็นน้อยอย่างน้อย MRLC ทั่วไปมีขนาด ~ 20 Kd (4) ดังนั้น เราจึงเชื่อว่าแถบของโปรตีนที่บริเวณ 20 Kd นี้เป็น MRLC Pattern ของ MRLC นี้คล้ายคลึงกับการศึกษาของกลุ่มอื่น (5) นอกจากนี้ ยังมีแถบของโปรตีนปรากฏในบริเวณ 200 Kd ซึ่งสูงกว่า

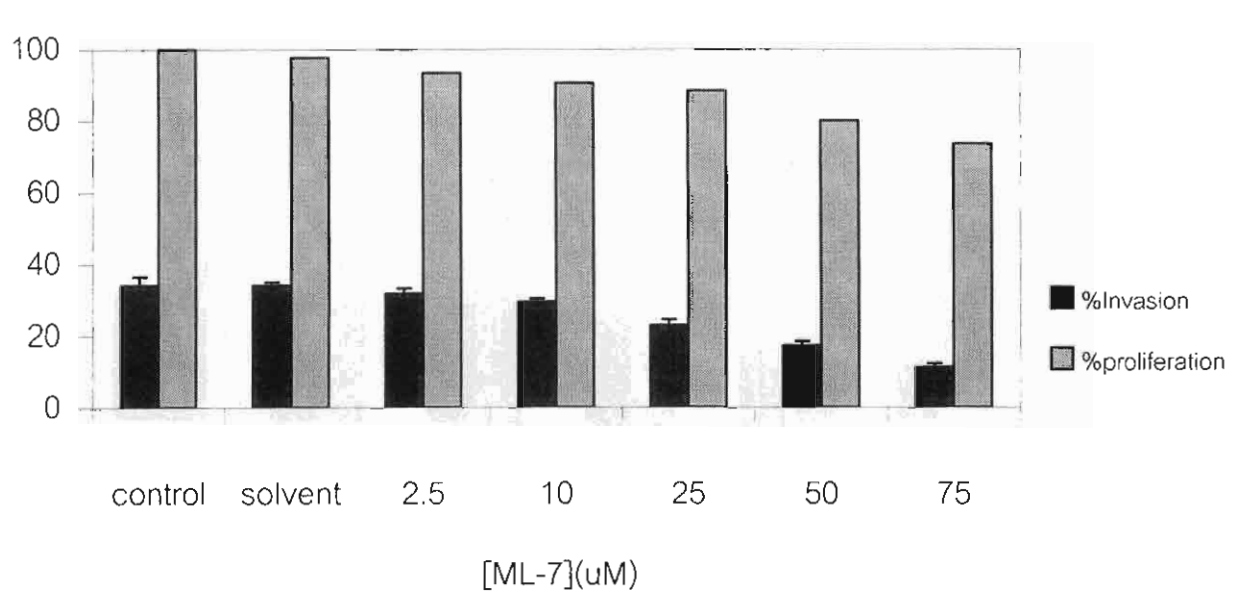
ขนาดของ MRLC มาก จึงน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยากับ MRLC ที่ยังจับเป็น complex อยู่กับ myosin heavy chain ซึ่งไม่ถูกสลายด้วย 8M urea

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ML-7 พบว่าความเข้มของแถบ MRLC variants เคลื่อนที่เร็วที่สุด จางลงเมื่อเทียบกับ control

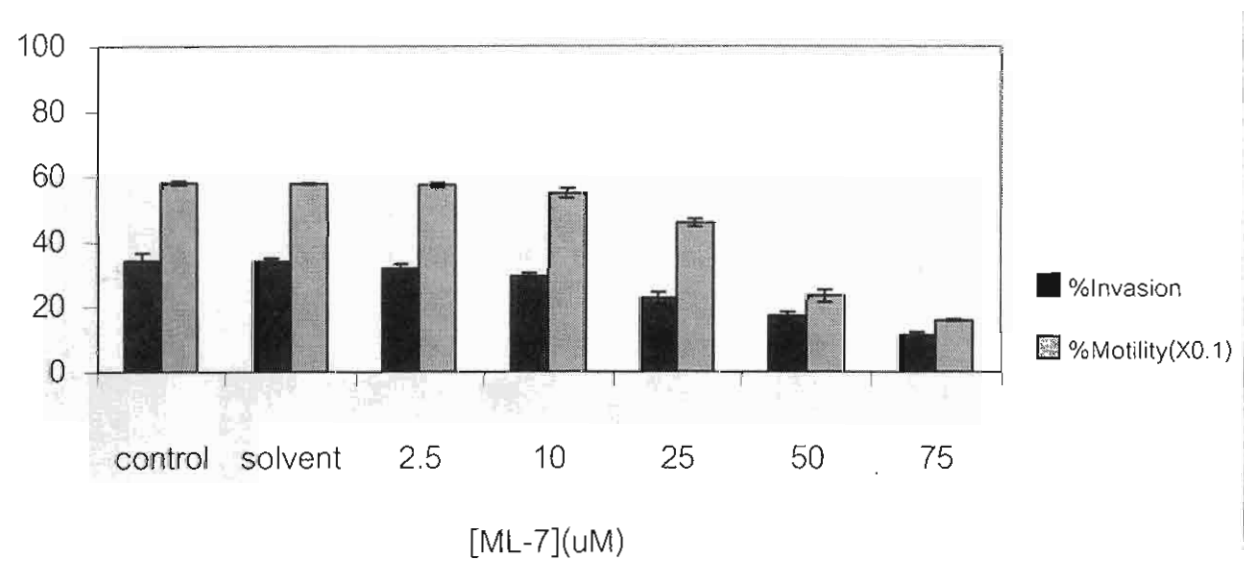
ผลของ MLCK inhibitor ต่อการเรียงตัวของ actin-myosin filament ภายในเซลล์

จากการศึกษาเบื้องต้นในเซลล์ MLL พบว่ารูปร่างของเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสกับ MLCK inhibitor (ML-7) เป็นรูปกระสวย และมี actin กับ myosin กระจายอยู่ทั่วเซลล์ โดยไม่มีการจับตัวเป็นเส้น (filament) อย่างเด่นชัด และ มีการสะสมของ actin กับ myosin มากในส่วนที่เป็น lamellipodia (รูปที่ 17, 21) เมื่อความเข้มข้นของ ML-7 เพิ่มขึ้น เซลล์หดตัวสั้นลงจากที่ส่วนใหญ่เป็นรูปกระสวย มาเป็นรูปกลม พร้อมกับมีจำนวน lamellipodia และ filopodia ลดลง (รูปที่ 20,24) การเรียงตัวของ actin และ myosin เห็นเป็นเส้น (stress fiber) ที่ชัดเจนขึ้น (รูปที่ 19,23) เซลล์สูญเสียการยึดเกาะกับพื้นผิว coverslip และการกระจุกตัวของ actin-myosin ใน lamellipodia กับ filopodia ลดลง (รูปที่ 18,22)

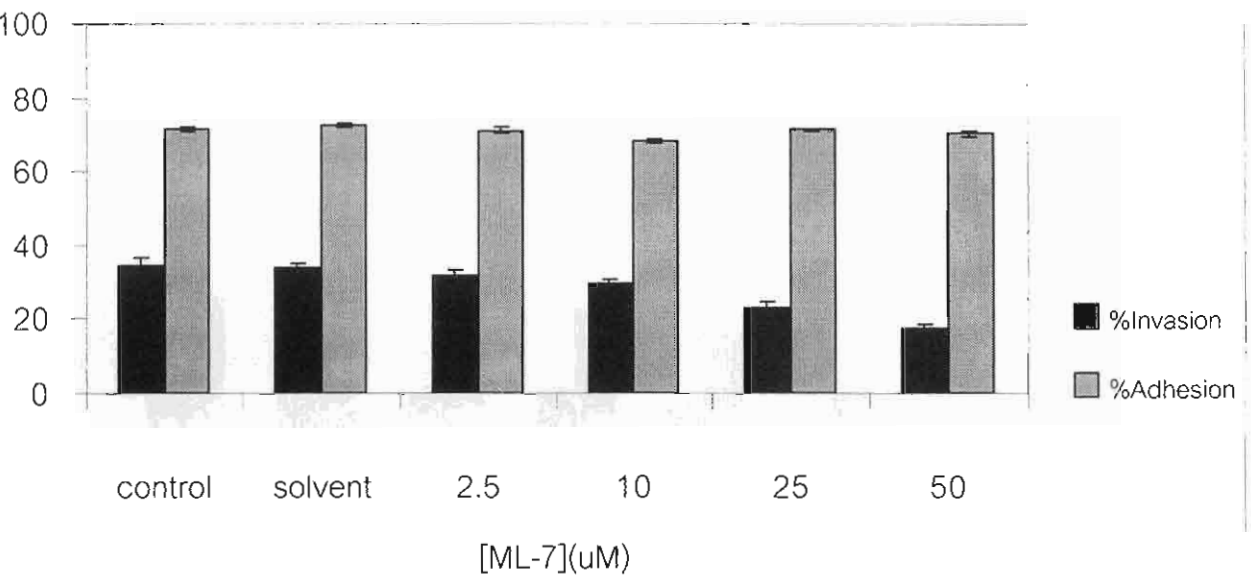
รูปที่ 1 ผลของ ML-7 ต่อ invasion และ proliferation ของ AT-02



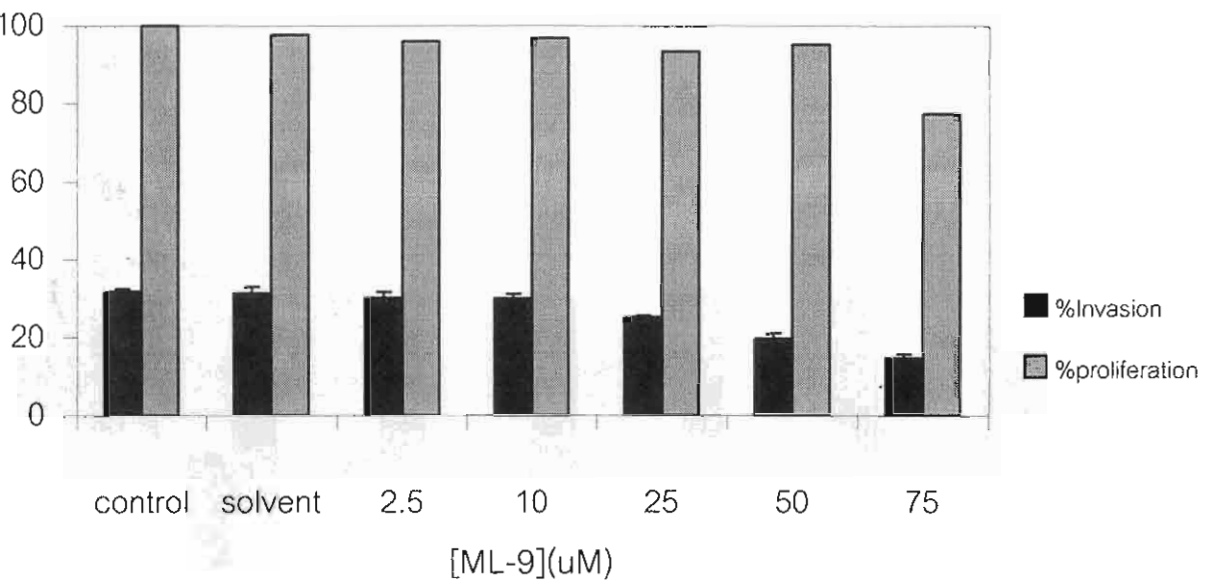
รูปที่ 2 ผลของ ML-7 ต่อ invasion และ motility ของ AT-02



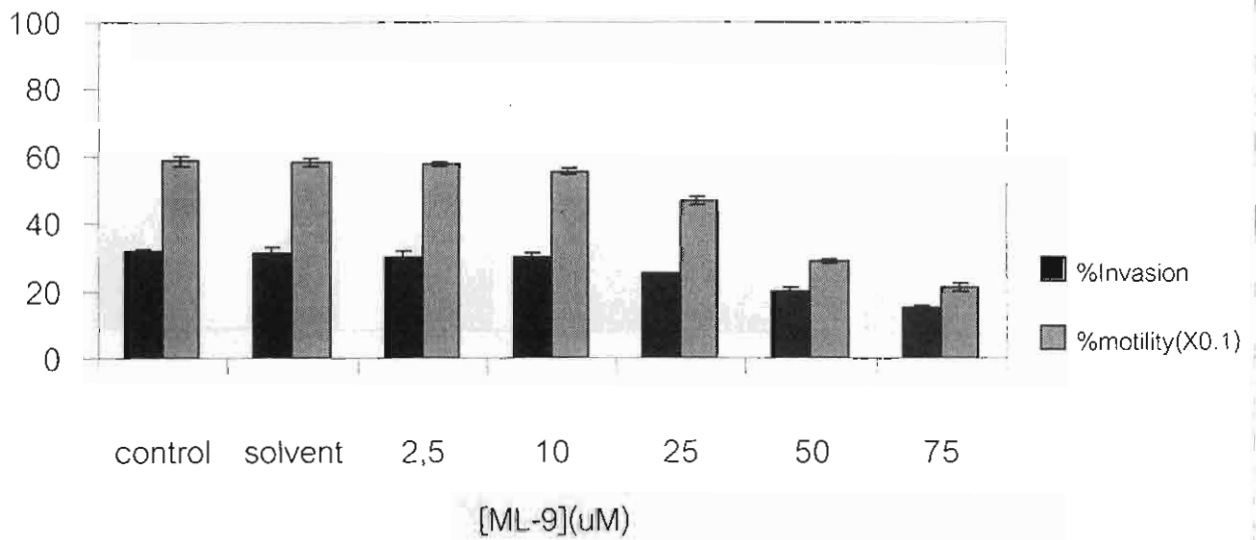
รูปที่3 ผลของ ML-7 ต่อ invasion และ adhesion ของ AT-02



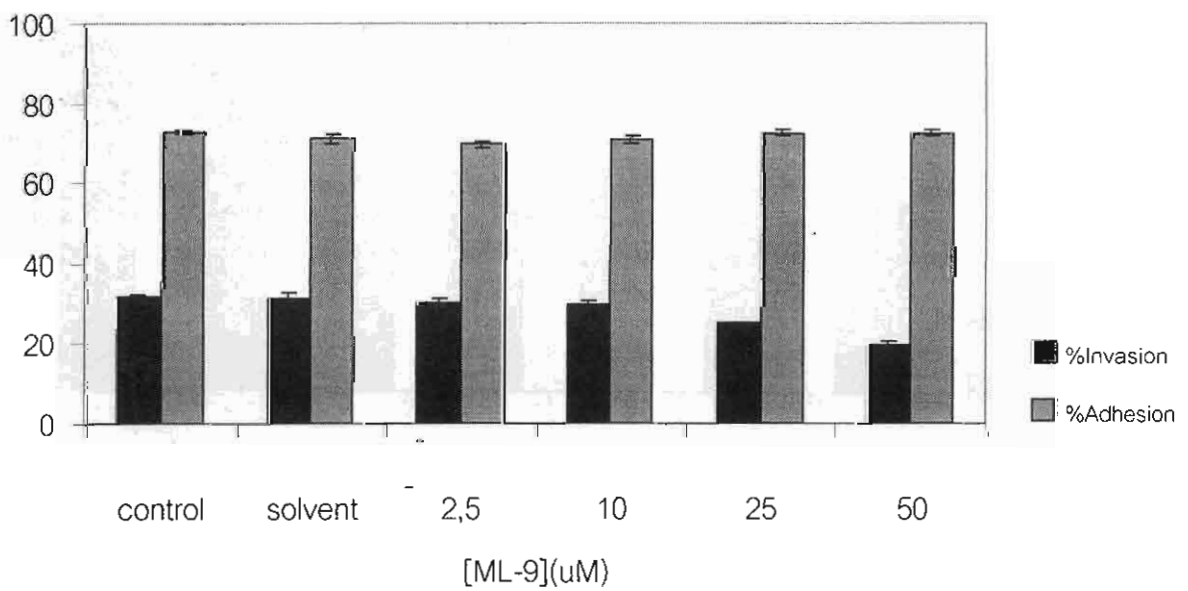
รูปที่4 ผลของ ML-9 ต่อ invasion และ proliferation ของ AT-02



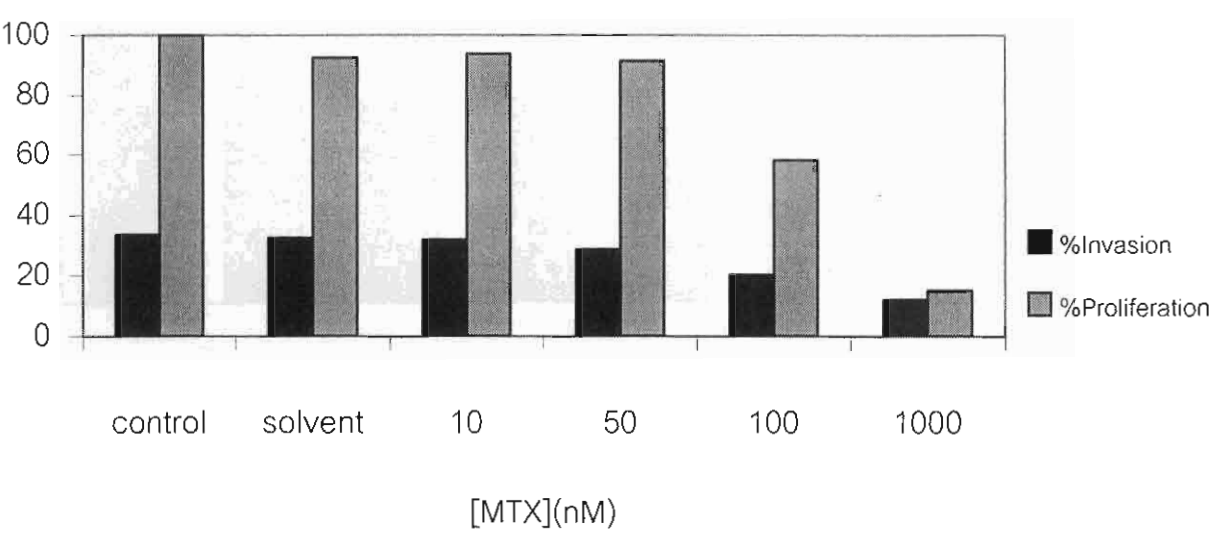
รูปที่ 5 ผลของ ML-9 ต่อ invasion และ motility ของ AT-02



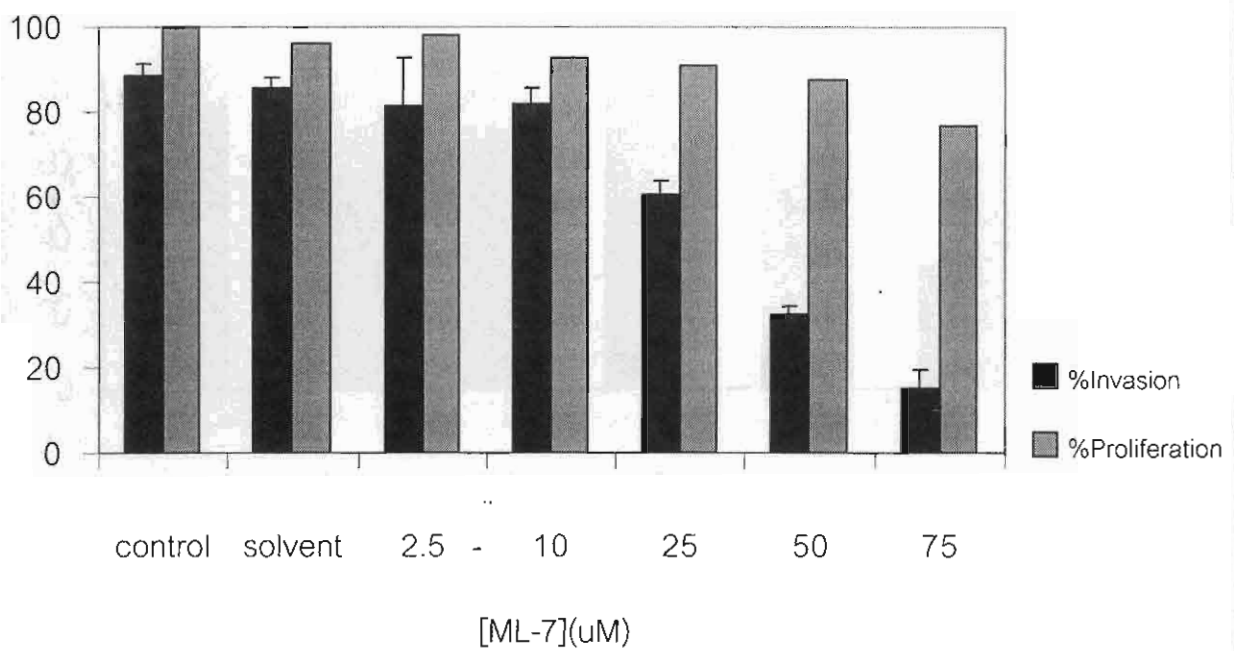
รูปที่ 6 ผลของ ML-9 ต่อ invasion และ adhesion ของ AT-02



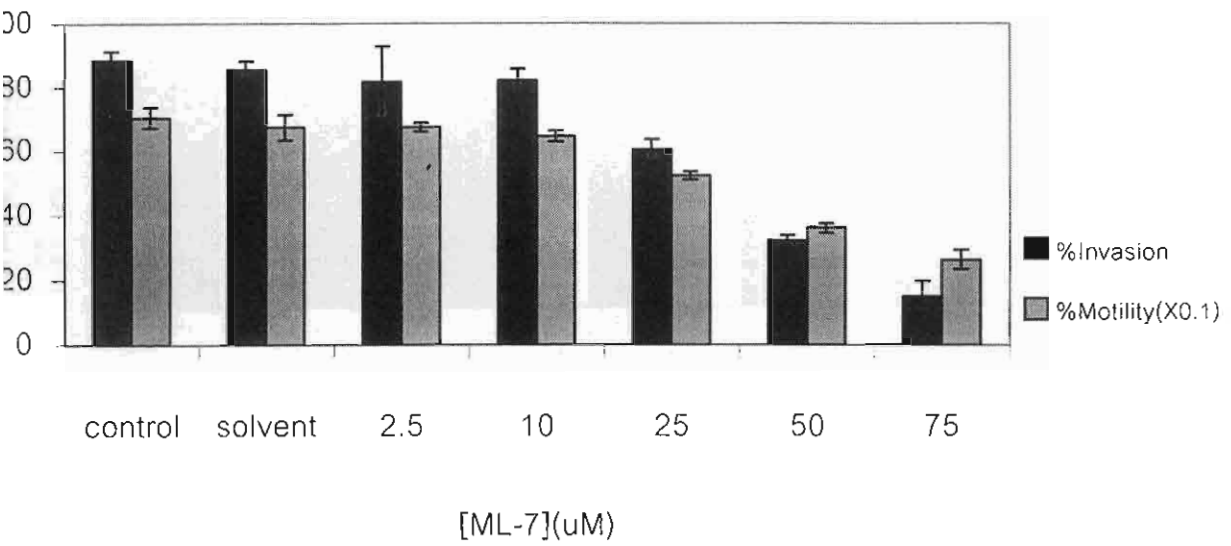
รูปที่ 7 ผลของ methotrexate ต่อ invasion และ proliferation ของ AT-02



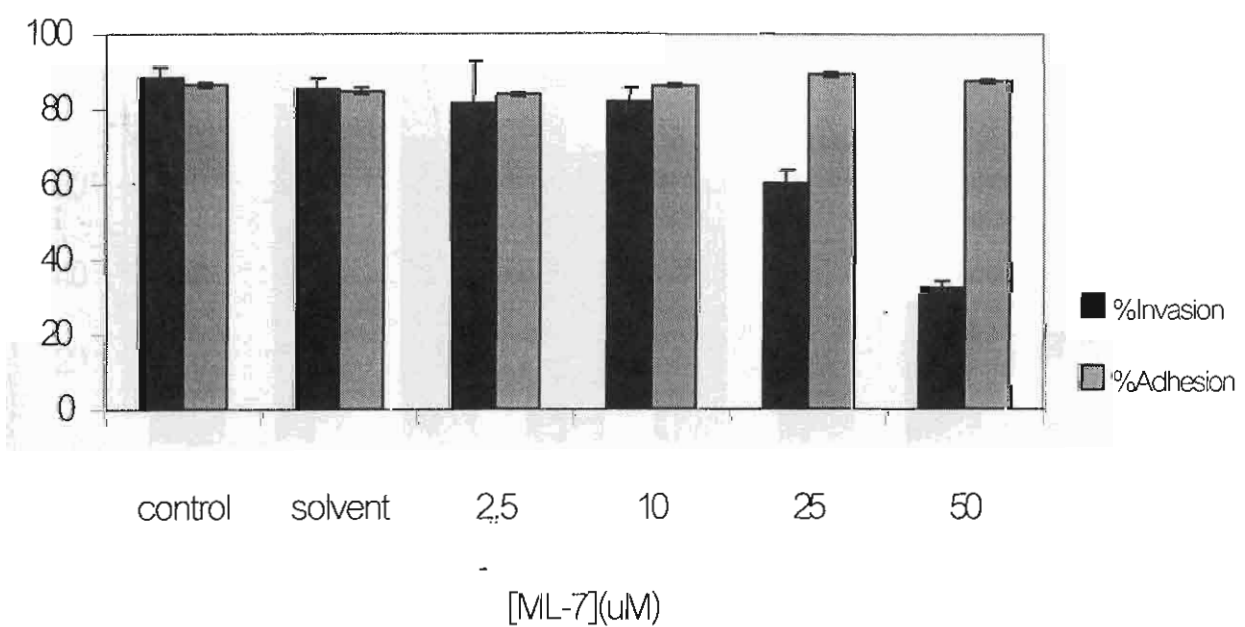
รูปที่ 8 ผลของ ML-7 ต่อ invasion และ proliferation ของ MLL



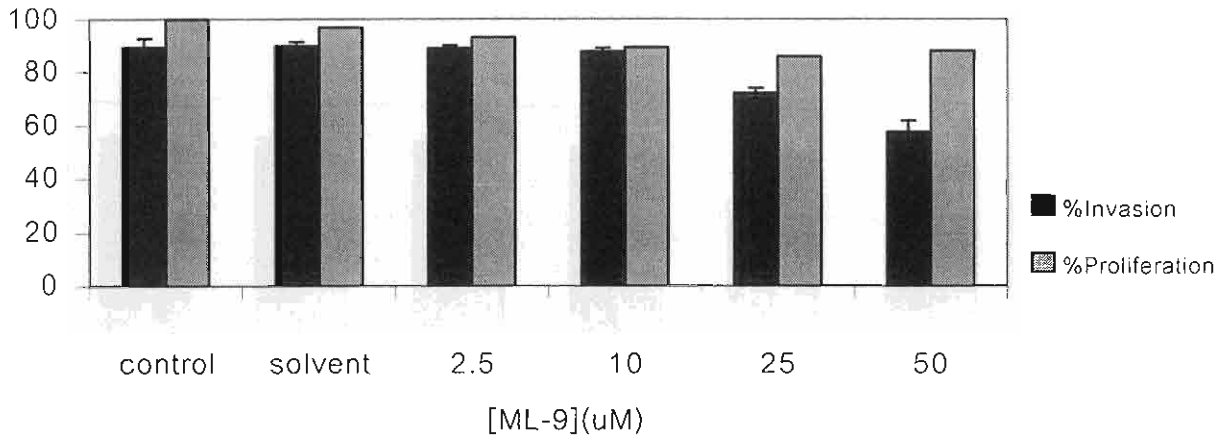
รูปที่ 9 ผลของ ML-7 ต่อ invasion และ motility ของ MLL



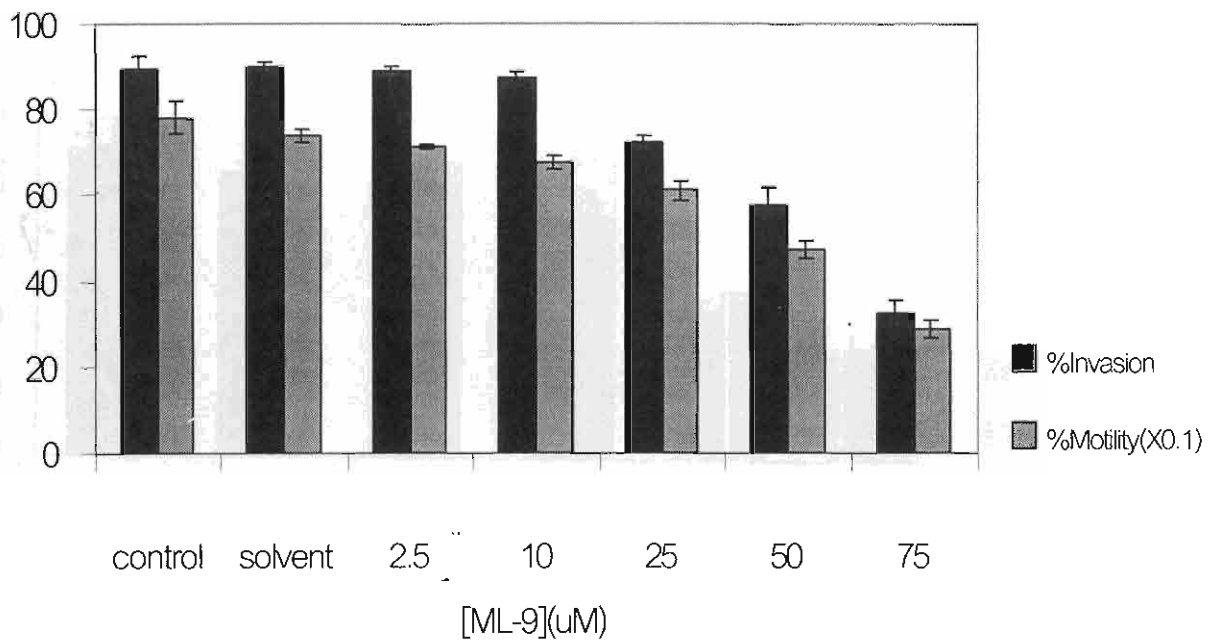
รูปที่ 10 ผลของ ML-7 ต่อ invasion และ adhesion ของ MLL



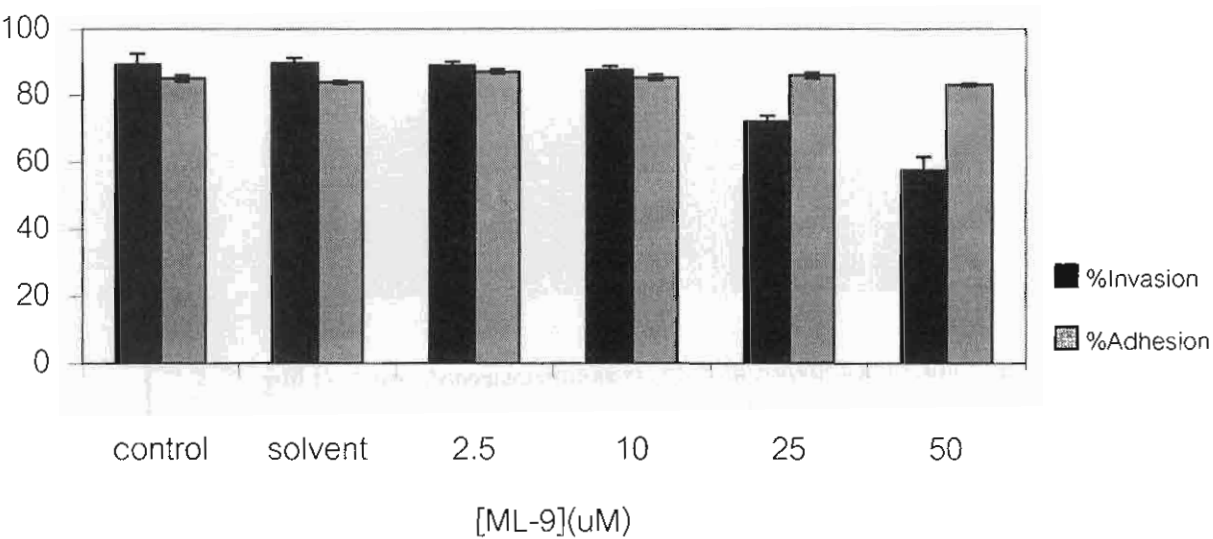
รูปที่ 11 ผลของ ML-9 ต่อ invasion และ proliferation ของ MLL



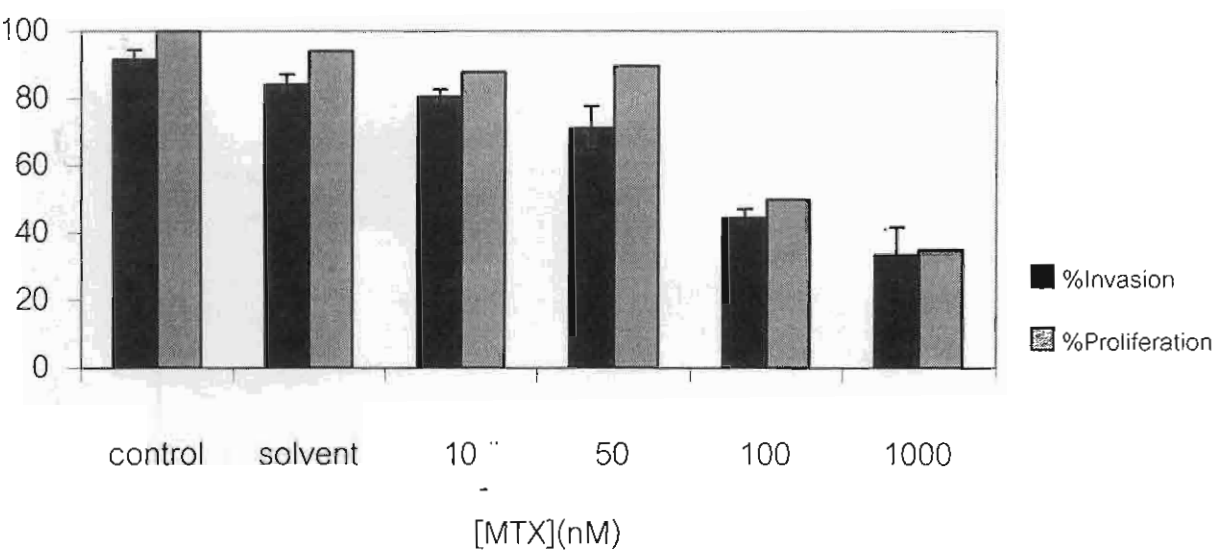
รูปที่ 12 ผลของ ML-9 ต่อ invasion และ motility ของ MLL

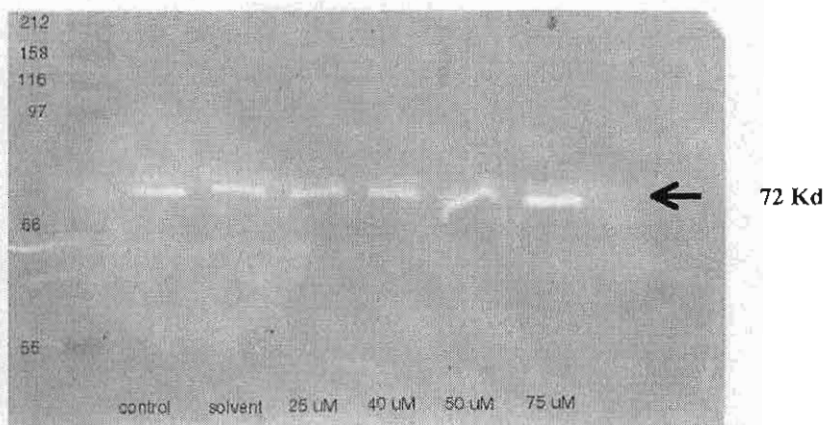


รูปที่ 13 ผลของ ML-9 ต่อ invasion และ adhesion ของ MLL

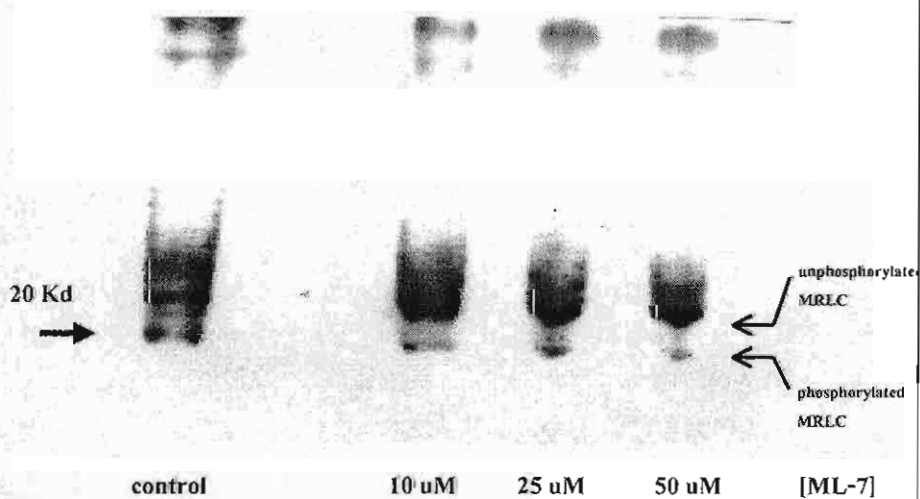


รูปที่ 14 ผลของ methotrexate ต่อ invasion และ proliferation ของ MLL





รูปที่ 15 Gelatin Zymogram เพื่อแสดงว่า ML-7 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีผลต่อ gelatinase activity ของเซลล์ MLL



รูปที่ 16 Urea-glycerol gel electrophoresis เพื่อแสดงว่า phosphorylated form ของ MRLC ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ ML-7 เพิ่มขึ้น

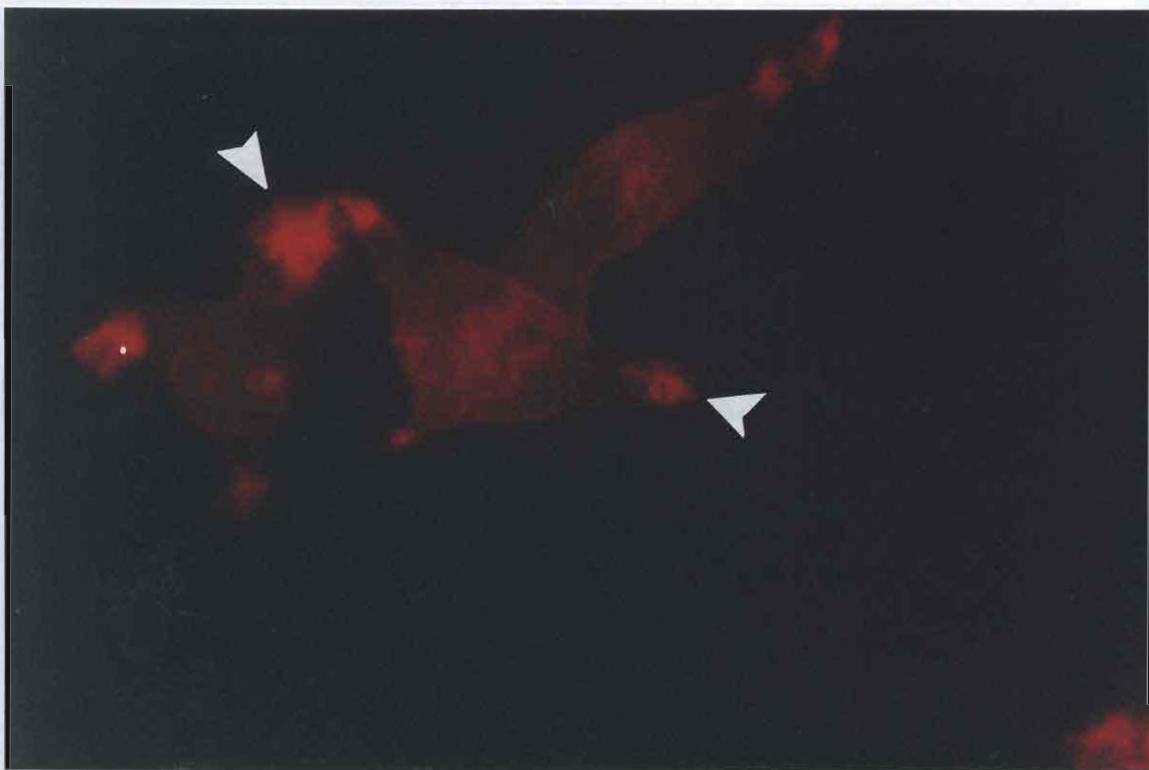


Fig. 17 เซลล์ MLL ย้อมสีด้วย Phalloidin-TRITC, กำลังขยาย 40X

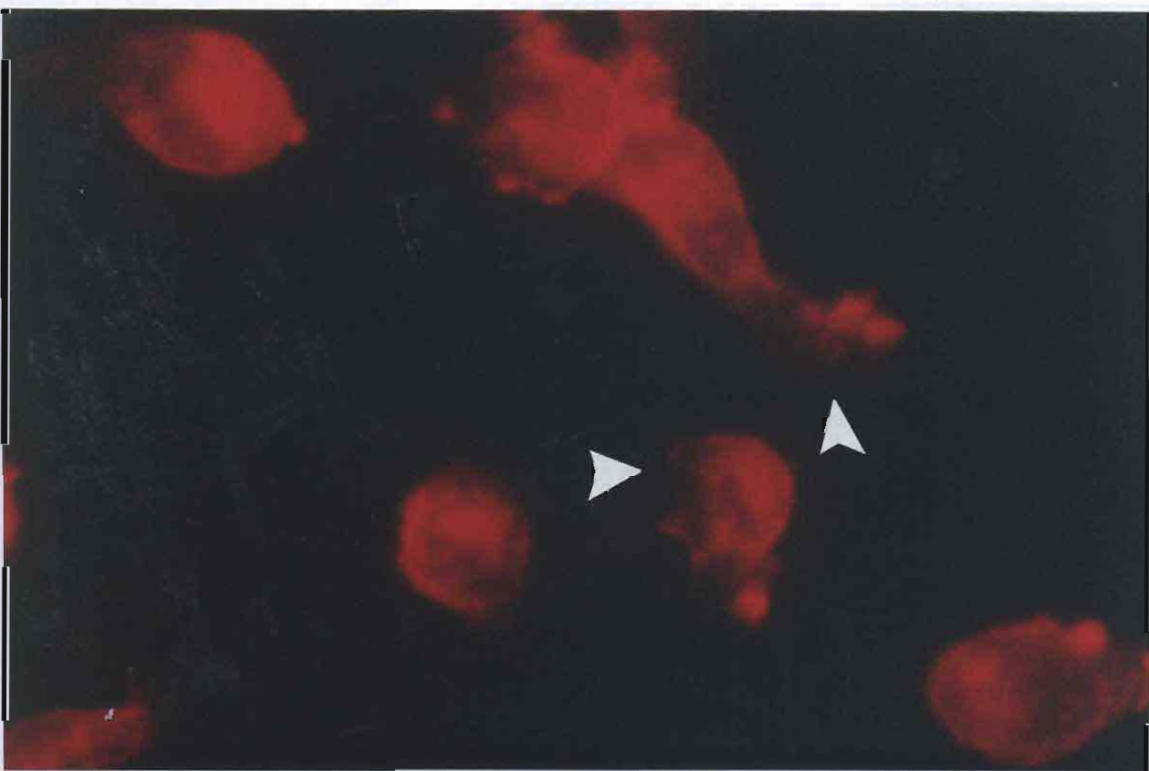


Fig. 18 เซลล์ MLL ในภาวะที่มี 10 μ M ML-7 ย้อมสีด้วย Phalloidin-TRITC, กำลังขยาย 40X

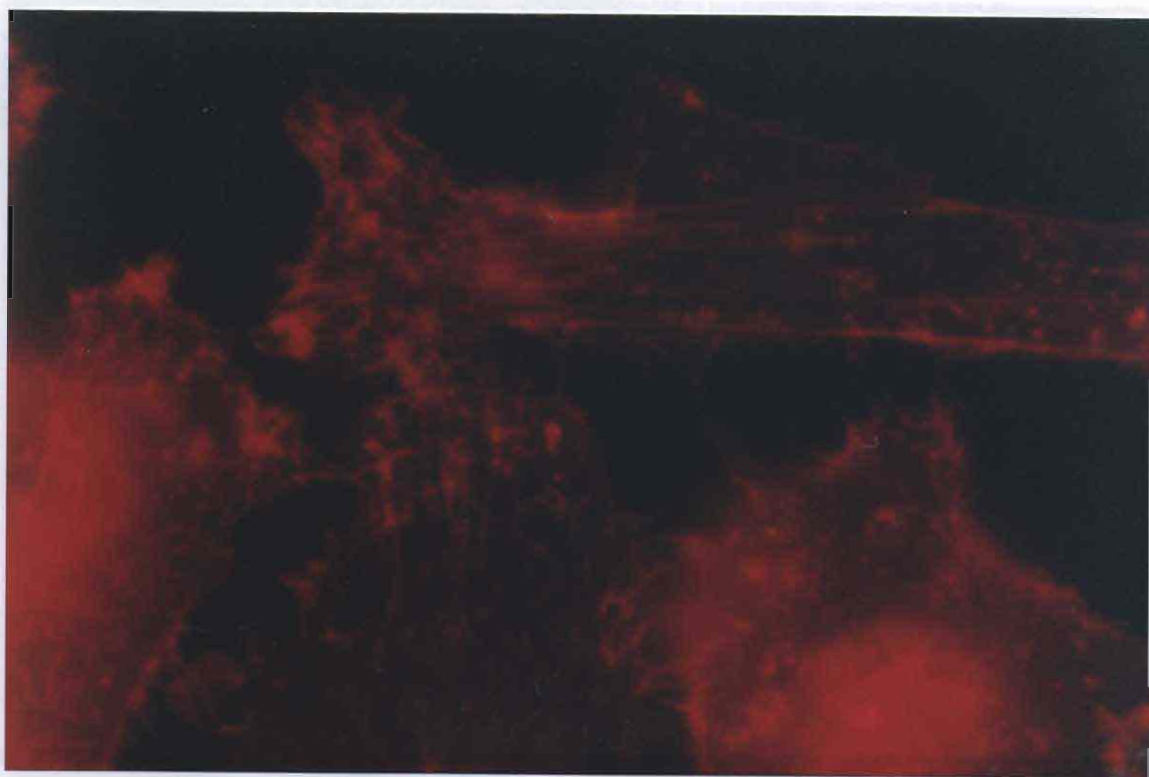


Fig. 19 เซลล์ MLL ในภาวะที่มี 25 μ M ML-7 ย้อมสีด้วย Phalloidin-TRITC, กำลังขยาย 100X

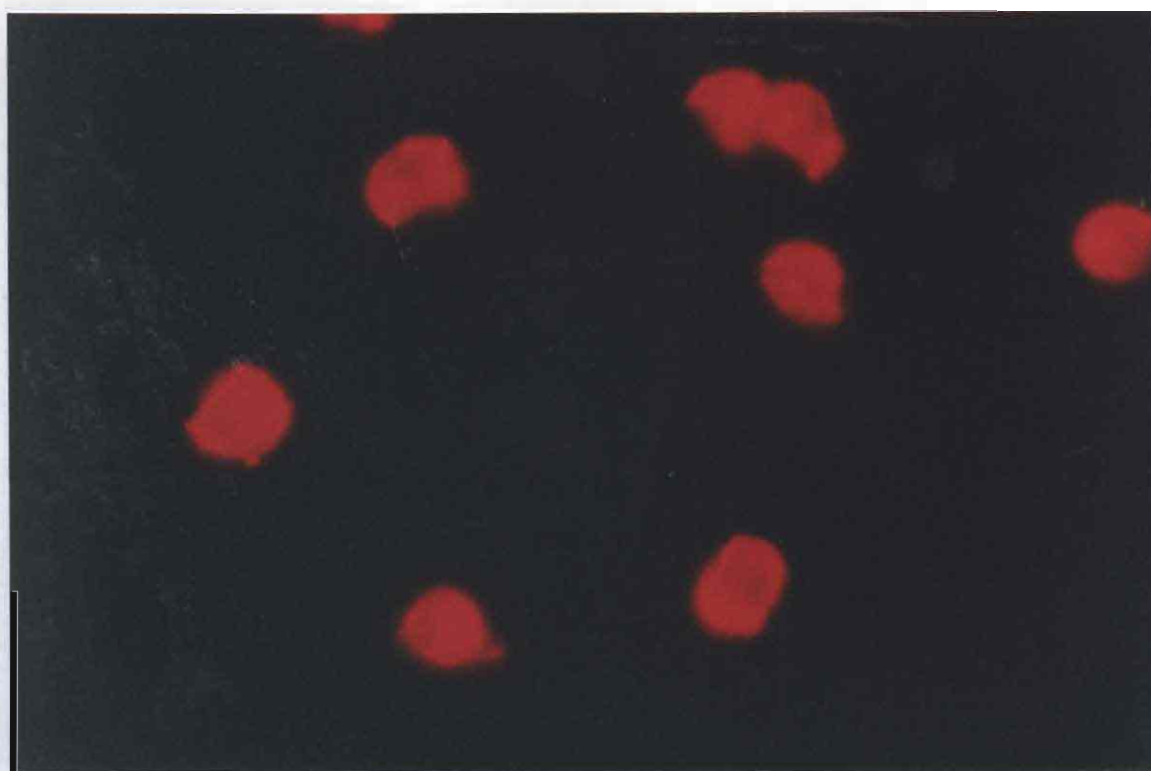


Fig. 20 เซลล์ MLL ในภาวะที่มี 50 μ M ML-7 ย้อมสีด้วย Phalloidin-TRITC, กำลังขยาย 40X

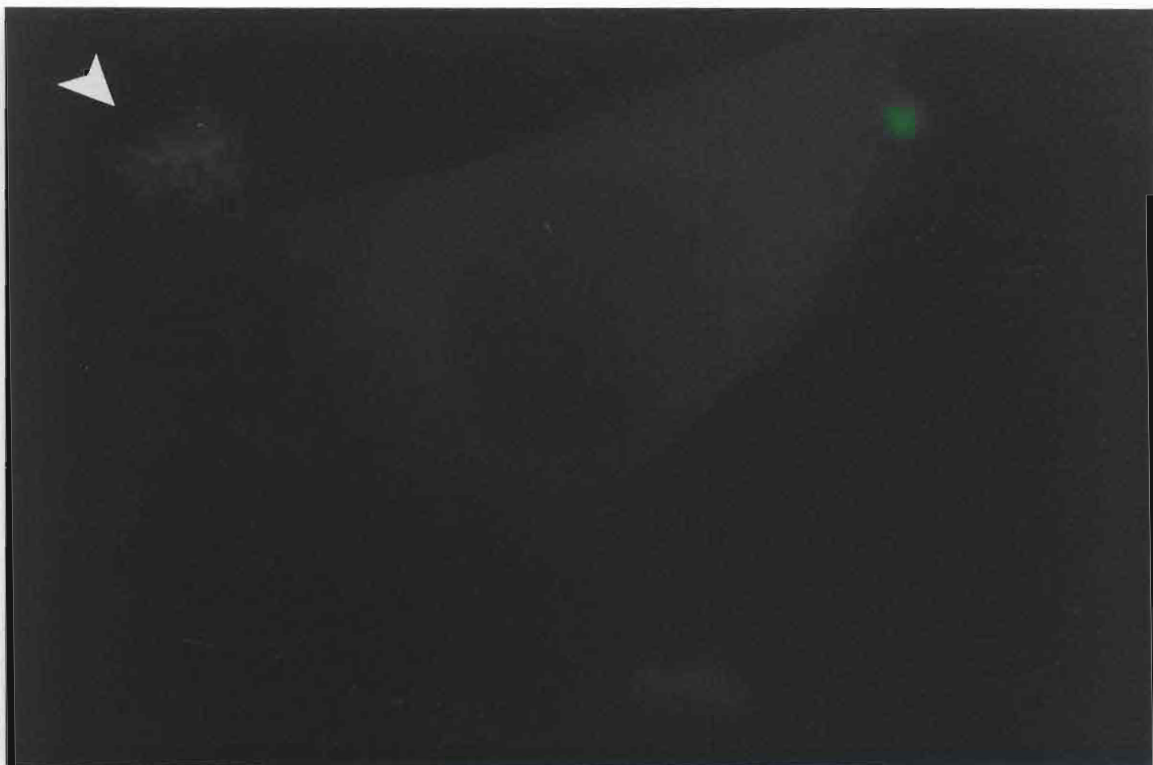


Fig. 21 เซลล์ MLL ย้อมสีด้วย Anti-myosin antibody, กำลังขยาย 100X

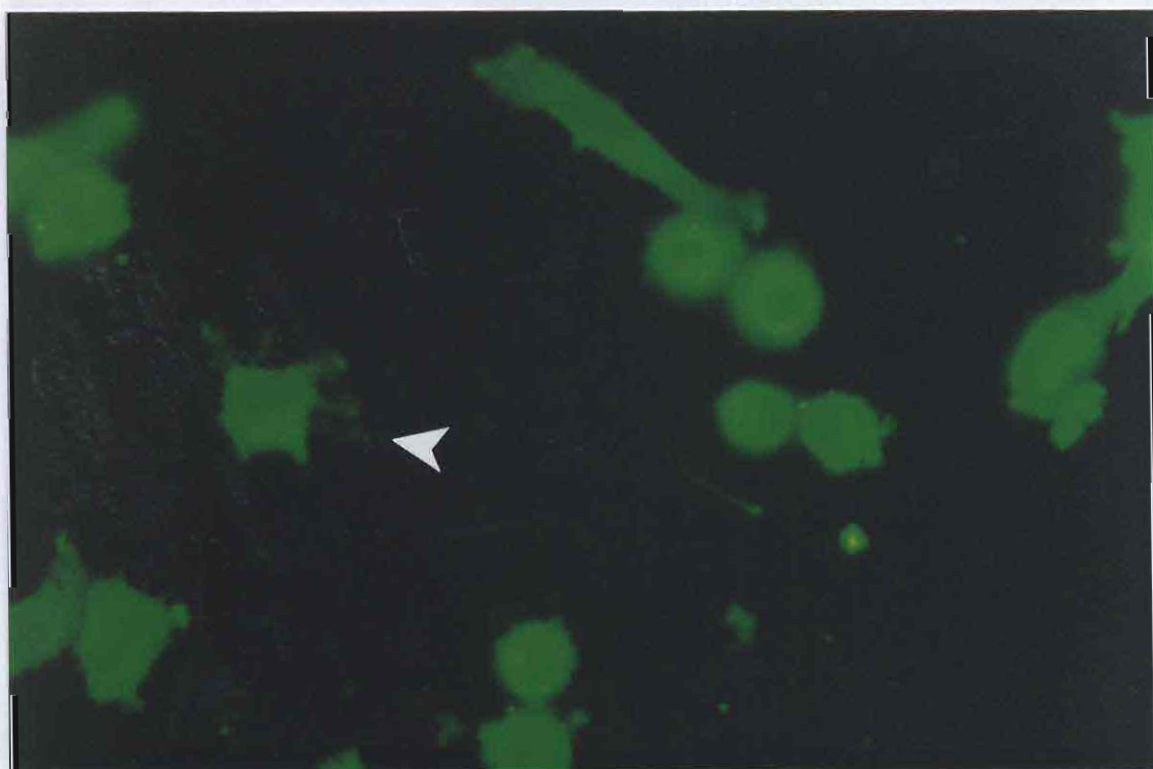


Fig. 22 เซลล์ MLL ในภาวะที่มี 10µM ML-7 ย้อมสีด้วย Anti-myosin antibody, กำลังขยาย 40X

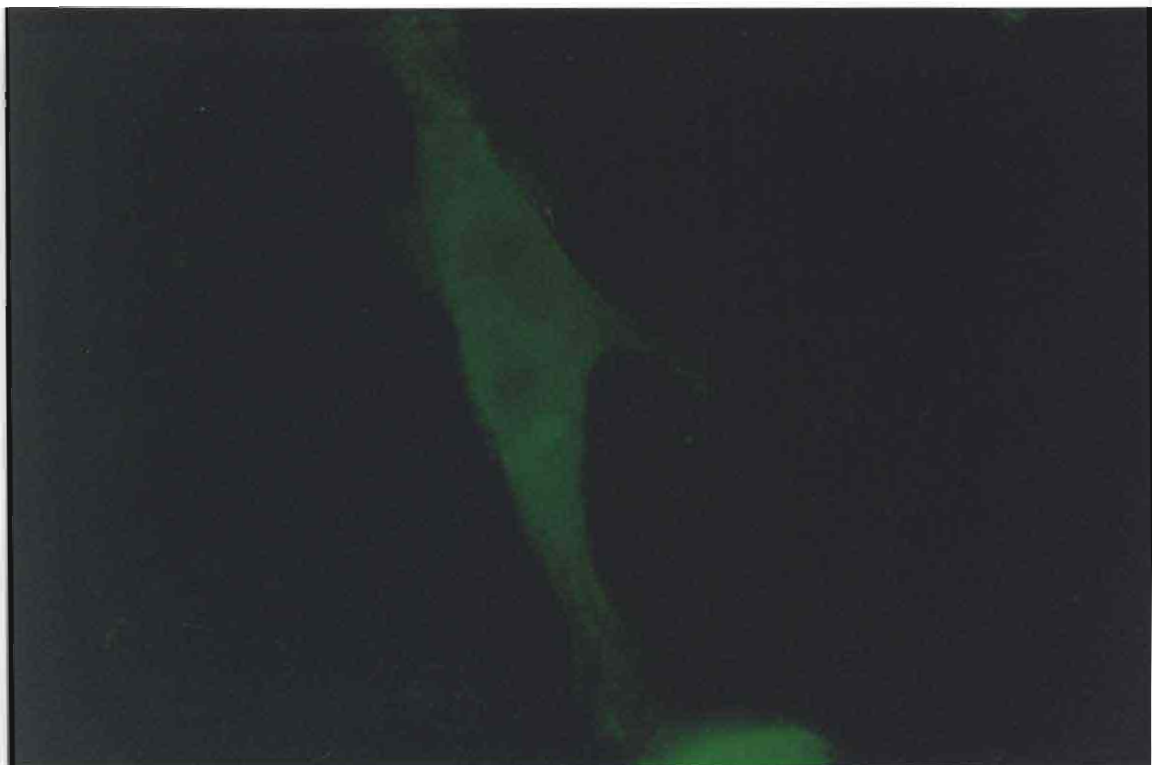


Fig. 23 เซลล์ MLL ในภาวะที่มี 25 μ M ML-7 ย้อมสีด้วย Anti-myosin antibody, กำลังขยาย 40X

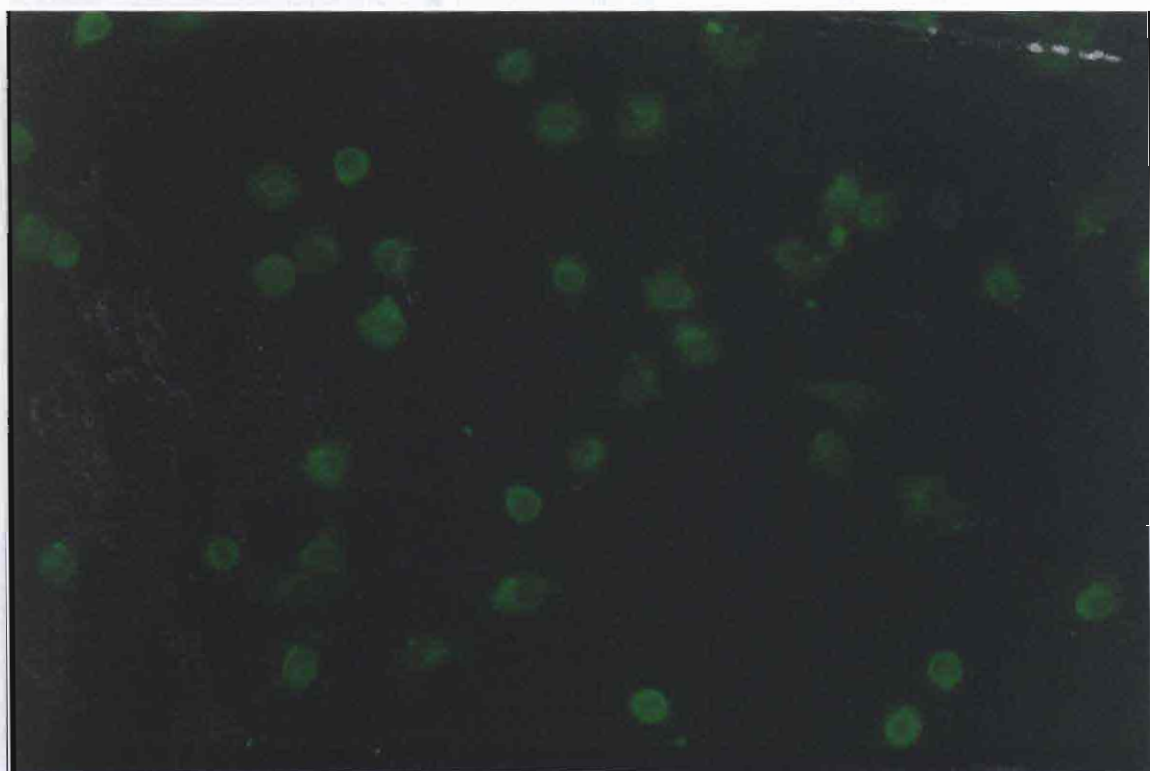


Fig. 24 เซลล์ MLL ในภาวะที่มี 50 μ M ML-7 ย้อมสีด้วย Anti-myosin antibody, กำลังขยาย 10X

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของ MLCK inhibitors ต่อระดับของ MRLC phosphorylation

การยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งชนิดแพร่กระจาย 2 ชนิด คือ AT-02 (moderately to poorly metastatic) และ MLL (highly metastatic) โดย MLCK inhibitors (ML-7 & ML-9) สอดคล้องกับการลดความเข้มของแถบ MRLC ที่เคลื่อนที่เร็วที่สุดบน urea-glycerol gel แถบของ MRLC ที่เคลื่อนที่เร็วนี้ คือ MRLC variant ที่มีประจุลบ (phosphorylated MRLC variant) ซึ่งเคลื่อนที่บน urea-glycerol gel ได้เร็วกว่า MRLC variant ที่ไม่มีประจุ (8) ดังนั้น การยับยั้งการบุกรุกโดย MLCK inhibitors ในการทดลองของเรา จึงน่าจะเกิดจากการยับยั้ง MRLC phosphorylation

จากรูปที่ 16, control มีแถบของ MRLC variants เกิดขึ้นอย่างน้อย 3-4 แถบ ซึ่งอาจอธิบายได้จากการที่มี MRLC ในรูป non-, mono- และ di-phosphorylated variants ซึ่งเกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ MLCK ที่ 2 ตำแหน่งบน MRLC (9-11) แถบอื่นๆที่เกิดขึ้น อาจเป็นผลมาจาก post-translational modification อื่นๆที่ทำให้ประจุของ MRLC เปลี่ยนไป เอนไซม์ kinase ชนิดอื่น เช่น PKC และ PKA ก็สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ MRLC ได้ แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดขึ้นได้จริง *in vivo* หรือไม่ และมีบทบาทอย่างไร (9-11)

ในเซลล์ที่สัมผัสกับ MLCK inhibitors จะมีจำนวน และ ความเข้มของ phosphorylated MRLC variants ลดลง (ดูกราฟที่ phosphorylated MRLC ที่จางลง) ซึ่งน่าจะเป็น mono- และ di-phosphorylated MRLC ที่เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตโดย MLCK แถบโปรตีนที่ยังเหลืออยู่ (ดูกราฟที่ unphosphorylated MRLC) อาจประกอบไปด้วย MRLC ที่ไม่มีประจุ หรือ MRLC ที่ถูกเติมประจุโดยเอนไซม์ชนิดอื่น

MLCK inhibitor ไม่น่าจะมีผลกระทบข้างเคียงต่อเอ็นไซม์ชนิดอื่น หรือมีน้อย เพราะ affinity (จากค่า K_i) ของ ML-7 ต่อ PKA และ PKC น้อยกว่า MLCK ถึง 70 และ 140 เท่าเป็นลำดับ และ affinity ของ ML-9 ต่อ PKA และ PKC น้อยกว่า MLCK ถึง 8.4 และ 14.2 เท่าเป็นลำดับ

ผลของ MLCK inhibitors ต่อความสามารถในการบุกรุก, การเคลื่อนที่, การแบ่งเซลล์ และ การเกาะติดผิวที่เคลือบด้วย matrigel

MLCK inhibitors ยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งควบคู่ไปกับการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell motility) (รูป 2,5,9 และ 12) ความเข้มข้นของ MLCK inhibitors สูงสุดที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกในเซลล์ AT-02 ได้ 66.9% (ML-7) และ 52.8% (ML-9) ในขณะที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ได้ 72.4% (ML-7) และ 63.9% (ML-9) ส่วนในเซลล์ MLL ความเข้มข้นของ MLCK inhibitors สูงสุดที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกได้ 82.4% (ML-7) และ 63.9% (ML-9) ในขณะที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ได้ 60.7% (ML-7) และ 60.8% (ML-9)

ผลกระทบของ MLCK inhibitors ต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์มีค่อนข้างน้อย เพราะ ที่ความเข้มข้นสูงสุดของ MLCK inhibitor ที่ใช้ (75 μ M) สามารถยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ได้เกินกว่า 50% ในทุกกรณี ในขณะที่ ความสามารถในการแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งไม่เกิน 25% (รูป 1,4,8 และ 11)

การยับยั้งการบุกรุกมิใช่ผลกระทบต่อความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวที่เคลือบ matrigel (รูป 3,6,10,13) ผลการทดลองของเราต่างจากผลการทดลองของ Guillespi *et al.* (5) ที่ใช้ glioma cell lines กับ MLCK inhibitors 2 ชนิด คือ ML-7 และ KT-5926 ที่แสดงว่า

MLCK inhibitors สามารถยับยั้งทั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการเกาะติดพื้นผิวที่เคลือบ vitronectin โดยไม่มีผลกระทบต่อ การแบ่งเซลล์ ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้เซลล์ต่างชนิดกัน หรือ จากการใช้ vitronectin อย่างเดียว แทนการใช้ matrigel ซึ่งเป็นสารผสม Vitronectin เป็น integrin receptor ชนิดหนึ่ง และ เป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งของ matrigel การใช้ MLCK inhibitors อาจทำลายการเกาะติดที่ใช้โมเลกุลของ integrin แต่อาจไม่ได้ทำลายการเกาะติดที่ใช้โมเลกุลชนิดอื่นๆ โมเลกุลเหล่านี้ อาจจับกับองค์ประกอบอื่นของ matrigel และทำให้เซลล์ยังสามารถเกาะติดได้ในภาวะที่มี MLCK inhibitors

ML-7 มี affinity ต่อ MLCK มากกว่า ML-9 ประมาณ 10 เท่า (ค่า K_i ของ ML-7 กับ ML-9 ต่อ MLCK คือ 0.3 กับ 3.8 μM ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม เราไม่ได้เห็นความต่างของผลกระทบทางชีวภาพของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ (17)

ดังนั้น เราจึงสรุปว่า MLCK inhibitors สามารถยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งชนิดแพร่กระจายได้ โดยยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ แต่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ค่อนข้างน้อย และ แทบไม่มีผลต่อการเกาะติดพื้นผิวที่เคลือบ matrigel เลย

ผลของ Methotrexate ต่อความสามารถในการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง

เพื่อแสดงว่า การที่ MLCK inhibitors สามารถยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง โดยมีผลต่อการแบ่งเซลล์ค่อนข้างน้อยนี้ เป็นคุณสมบัติพิเศษที่ทำให้ MLCK inhibitors มีข้อได้เปรียบกว่า cytotoxic drug ทั่วไป เราได้เปรียบเทียบการทดลองด้วยการใช้ methotrexate

การยับยั้งการบุกรุกของเซลล์โดย methotrexate สัมพันธ์โดยตรงกับการยับยั้งความสามารถในการแบ่งเซลล์ (รูป 7&14) โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดของ methotrexate ที่ใช้ (1000 nM) สามารถยับยั้งการบุกรุก และการแบ่งเซลล์ AT-02 ได้ 63.0% และ 83.9% ตามลำดับ ในขณะที่ สามารถยับยั้งการบุกรุก และการแบ่งเซลล์ MLL ได้ 60.1% และ 64.9% ตามลำดับ ค่า

IC₅₀ สำหรับการบุกรุก และ การแบ่งเซลล์มีค่าใกล้เคียงกันมากในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด (86.59 nM และ 104.30 nM ในเซลล์ AT-02; 66.43 nM และ 79.36 nM ในเซลล์ MLL) ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่า การยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งโดย methotrexate เป็นผลกระทบข้างเคียงที่เนื่องมาจากการยับยั้งการแบ่งเซลล์ มากกว่าที่จะเป็นการยับยั้งการบุกรุกแบบค่อนข้างจำเพาะ เช่นในกรณีของ MLCK inhibitor

ผลของ MLCK inhibitors ต่อการหลั่ง gelatinase ของเซลล์มะเร็ง

ใน conditioned medium ของเซลล์ MLL มี gelatinase activity ที่มีขนาดประมาณ 72 Kd เราคาดว่าน่าจะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับ 72 Kd MMPs ที่รายงานโดย Quax, et al. (13) อย่างไรก็ตาม เรายังไม่ได้พิสูจน์ว่า 72 Kd gelatinase ที่เราพบใน conditioned medium ของเซลล์ MLL เป็น MMP ชนิดเดียวกับที่กลุ่ม Quax et al. รายงานด้วยหรือไม่ ระดับของ matrix metalloproteinases (MMPs) ของเซลล์ในตระกูล Dunning นี้ สอดคล้องกับความสามารถในการแพร่กระจาย ซึ่งคาดว่าเกิดจากความสามารถในการผลิต และ หลั่ง MMPs เพิ่มขึ้น (13)

ความสามารถในการหลั่ง (secretion) MMPs อาจถูกควบคุมด้วย MRLC phosphorylation อย่างไรก็ตาม เราพบว่าการยับยั้ง MRLC phosphorylation ด้วย MLCK inhibitors มิได้ทำให้ gelatinase activity ของเซลล์ MLL ลดลง (รูป 15) ทั้งๆที่มีการพบว่า MRLC phosphorylation มีบทบาทสำคัญในการหลั่งสารหลายชนิดในเซลล์ปกติ เช่น การหลั่งฮิสตามีนจาก basophils (14)

ผลของ MLCK inhibitors ต่อรูปร่าง และ การเรียงตัวของ actin-myosin ในเซลล์มะเร็ง

เราพบว่า MLCK inhibitor มีผลกระทบต่อรูปร่างของเซลล์ และ การเรียงตัวของ actin-myosin filament ภายในเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ MLCK inhibitor เซลล์หดตัวสั้นลง พร้อมกับลดจำนวนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น lamellipodia และ filopodia ซึ่งสอดคล้องกับการลดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการศึกษาของ Guillespie, *et al.* (5) นอกจากนี้ เซลล์มีจำนวนของ actin stress fiber เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่มากจะมี actin-myosin filament ที่กระจาย เป็นภาพมัวๆ (fussy) ในขณะที่เซลล์ที่ไม่เคลื่อนที่จะมี actin-myosin filament ที่เรียงตัวเป็นเส้นเด่นชัด ที่เรียกว่า 'stress fibers' (15) ในภาวะที่มีการเคลื่อนที่ actin กับ myosin จะกระจุกตัวอยู่ในโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ เช่น lamellipodia และ filopodia มาก (รูป 17 และ 21) ในขณะที่ MLCK inhibitors ทำให้ actin และ myosin ไม่กระจุกตัวที่โครงสร้างเหล่านั้น (รูป 18 และ 22) ซึ่งสอดคล้องกับการเคลื่อนที่ที่ลดลง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ML-7 เซลล์มีรูปร่างกลม และ ในที่สุดหลุดออกจากพื้นผิวที่มันเกาะอยู่ ซึ่งอาจอธิบายได้ด้วยการที่ actin-myosin เป็นส่วนประกอบสำคัญของ focal adhesion ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จำเป็นต่อการยึดเกาะ และ เมื่อ MRLC phosphorylation ถูกยับยั้งโดย ML-7 ก็อาจทำให้การ form เป็น focal adhesion และ การยึดเกาะกับพื้นผิวเสียไป (16)

เอกสารอ้างอิง

1. Fidler, I.J. 1997. Molecular biology of cancer: Invasion and metastasis. In: Cancer: Principles & practice of Oncology, 5th ed. De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. eds. pp. 135-221, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
2. Meyer, T. & Hart, I.R. 1998. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur. J. Cancer*, vol. 34, no. 2, pp. 214-221.
3. Raz, A. & Ben-Ze'ev, A. 1987. Cell-contact and architecture of malignant cells and their relationship to metastasis. *Cancer and metastasis review*, vol. 6, pp. 3-21
4. Sellers, J.R. & Adelstein, R.S. 1987. Regulation of contractile activity. In: The enzymes, vol. 13, pp. 381-418. Academic press, New York.
5. Gillespie, G.Y., Soroceanu, L., Manning, T.J. Jr., Gladson, C.L., Rosenfeld, S.S. 1999. Glioma migration can be blocked by nontoxic inhibitors of myosin II. *Cancer Res.*, vol. 59, no. 9, pp. 2076-82.
6. Isaacs, J.T., Isaacs, W.B., Feitz, W.F.J., Scheres, J. 1986. Establishment and characterization of seven dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. *The Prostate*, vol. 9, pp. 261-281.
7. Doyle, G.M., Sharief, Y., Mohler, J.L. 1992. Prediction of metastatic potential by cancer cell motility in the dunning R-3327 prostatic adenocarcinoma in vivo model. *J. Urol.*, vol. 147, pp. 514-518.
8. Perrie, W.T., Smillie, L.B., Perry, S.V. 1973. A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle. *Biochem J.*, vol. 135, pp. 151-156.

9. Sellers, J.R., Adelstein, R.S. 1987. Regulation of contractile activity. In: The enzymes, vol. 13, pp. 381-418. Academic Press, New York.
10. Kamm, K.E., Stull, J.T. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 25, pp. 593-620.
11. Tan, J.L., Ravid, S., Spudich, J.A. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 61, pp. 721-759.
12. Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M., Hidaka, H. 1987. Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 16, pp. 7796-7801.
13. Quax, P.H.A., de Bart, A.C.W., Schalken, J.A., Verheijen, J.H. 1997. Plasminogen-activator and matrix metalloproteinase production and extracellular matrix degradation by rat prostate cancer cells in vitro: correlation with metastatic behaviour in vivo. *The Prostate*, vol. 32, pp. 196-204.
14. Kitani, S., Teshima, R., Morita, Y., Ito, K., Matsuda, Y., Nonomura, Y. 1992. Inhibition of IgE-mediated histamine release by myosin light chain kinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 183, no. 1, pp. 48-54.
15. Bernard, H., Citi, S., et al. 1988. Modulation of cellular morphology and locomotion activity by antibodies against myosin. *J. Cell Biol.*, vol. 107, pp. 2181-2189.
16. Cooper, G.M. 1997. *The Cell: A molecular approach*, pp. 440-441.

Output

1. ผลงานตีพิมพ์ - กำลังเตรียม manuscript
2. เชิงวิชาการ- มีนักศึกษาระดับปริญญาโท 4 คน
3. เชิงสาธารณะ - จุดความสนใจในการทำวิจัยเรื่องการแพร่กระจายของมะเร็ง มีการรวมกลุ่มวิจัยกับ รามาธิบดี และ ม. ขอนแก่น, ให้คำปรึกษา และ train นักวิจัยของ CRI และ NSTDA ที่สนใจในการ identify สมุนไพรไทยที่มี anti-invasive property
4. จากเสนอผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการของ วทท.
 - Phattarasakul, K. & Tohtong, R. 1999 Myosin in cancer invasion. Abstract, 25th Congress on Science and Technology of Thailand. pp.
 - Phattarasakul, K. & Tohtong, R. 2000 Myosin in cancer invasion and metastasis. Abstract, 26th Congress on Science and Technology of Thailand. pp. 458
 - Promyart, P., Tontivateruengdech, J., Tohtong, R., Sutthipongchai, T. 2000 Role of MAPK in cancer invasion and metastasis. Abstract, 26th Congress on Science and Technology of Thailand. pp. 472.