

Abstract

Project Code : RSA5280007

Project Title : Role of metastasis suppressor RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) in the inhibition of cellular proliferation and invasion in cholangiocarcinoma cell lines

Investigator : Nisana Namwat, Ph.D.

E-mail Address : nisana@kku.ac.th, nnamwat@gmail.com

Project Period : 2 March 2009 to 1 March 2012

Cholangiocarcinoma (CCA), a primary cancer of the bile duct epithelium, primarily associated with chronic infection with the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* (Ov) that causes long-standing inflammation, the hallmark of carcinogenesis. Thus molecular mechanisms of CCA genesis and progression need to be studied in order to identify molecular targets for chemoprevention and treatment. Our study aimed to investigate the molecular pathways and the roles of biomolecules including the metastasis suppressor RECK (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs) and miR-21 (an oncogenic microRNA), which involve in chronic inflammation associated CCA progression.

Our data showed that chronic inflammation persistently occurred in CCA tissues presented by increasing of iNOS expression. The status of inflammation-related cytochrome P40, CYP2A6 and CYP2E1, were aberrant according to an increase of oxidative stress. Liver tissues of Ov plus NDMA treated hamsters showed high RECK expression in hyperplastic biliary duct epithelia, low RECK expression in precancerous lesions and no RECK expression in CCA. In human specimens, RECK was highly expressed in normal biliary cells, whereas intrahepatic CCA showed low levels of expression. Down-regulation of RECK correlated with tumor metastasis ($P < 0.01$) and shorter patient survival ($P < 0.02$). RECK expression levels were inversely correlated with MMP-2 and MMP-9 expression ($P < 0.05$). SiRNA RECK-depleted M139 CCA cells exhibited increased MMP-2/-9 gelatinase activities and invasiveness. Non-selective COX inhibitor, aspirin (500 μ M), demonstrated myriad effects in human CCA cell line, including growth suppression, enhanced phosphorylation of Akt/Erk/c-Jun, elevation of RECK expression, inhibition of MMP-2/-9 activity, and enhanced invasiveness.

Besides the altered profile of RECK, miR-21 expression was significantly upregulated in liver tissues of Ov plus NDMA treated hamsters at 2 months (hyperplastic lesion) and at 6 months when CCA had developed. MiR-21 was also upregulated in human CCA tissues and CCA cell. In patient's CCA tissues which miR-21 has been increased, we found that miR21 targeting genes such as the programmed cell death 4 (PDCD4) and RECK, had weaker staining in CCA tissues compared to the normal biliary duct. Knocking down miR-21 caused the reduction of CCA cells growth and migration ability. Cells with suppressing miR-21 showed an increase in expressions of many genes including STK40, KLHL15, GPR64, ZBTB47, CYBD1, FBX2, FNIP1, SOX7, APAF1, TNRC6B, TPRG1L, SH3GLB1, SOX6, GPR180 and ANKRD46, which possibly controls cancer growth and metastasis.

Our data suggest that the molecular biology network of miR-21 might play role in the genesis Ov-associated CCA. Modulation of aberrantly expressed miR-21 and miR-210 may be a useful strategy to inhibit tumor cell phenotypes or improve response to chemotherapy including prevention of carcinogenesis.

Keywords : cholangiocarcinoma, RECK, metastasis, NSAIDs, miR-21

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : **RSA5280007**

ชื่อโครงการ : การศึกษาบทบาทของ metastasis suppressor protein RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ชื่อนักวิจัย : Nisana Namwat, Ph.D.

E-mail Address : nisana@kku.ac.th, nnamwat@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 มีนาคม 2552 ถึง 1 มีนาคม 2555

มะเร็งท่อน้ำดี เป็นโรคมะเร็งปฐมภูมิของเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี สาเหตุเกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังซึ่งนำไปสู่กระบวนการก่อมะเร็ง การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของมะเร็งท่อน้ำดีจะทำให้ทราบโมเลกุลเป้าหมายที่จะนำมาประยุกต์ในการป้องกันและรักษาได้ วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อค้นหาวิถีและบทบาทของโปรตีน RECK (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs) ซึ่งเป็น metastasis suppressor และไมโครอาร์เอ็นเอ miR-21 ซึ่งเป็น oncogenic microRNA โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรัง

ผลการศึกษาแสดงพบว่า ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน iNOS ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเรื้อรัง สภาวะการอักเสบเรื้อรังสัมพันธ์กับการทำงานที่ผิดปกติของเอนไซม์ ไฮโดรโครม พี 450 ชนิด CYP2A6 และ CYP2E1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการก่อมะเร็งชนิด NDMA การทดลองในแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีด้วยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ Ov ร่วมกับให้สารก่อมะเร็ง NDMA พบว่า โปรตีน RECK มีระดับเพิ่มขึ้นในเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดีที่เปลี่ยนแปลงเป็น hyperplasia จากนั้นจะมีปริมาณลดลงในระยะที่เป็น precancerous lesions และไม่มี การแสดงออกเลยในระยะที่เป็นมะเร็ง การศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียืนยันว่า โปรตีน RECK มีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตับบริเวณข้างเคียง และสัมพันธ์กับสภาวะการแพร่กระจาย ($P < 0.01$) และอัตราการรอดชีพที่สั้นลง ($P < 0.02$) ระดับการแสดงออกของโปรตีน RECK สัมพันธ์กับการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ($P < 0.05$) การทดลองโดยใช้ siRNA ยับยั้งการทำงานของ RECK mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M139 พบว่าทำให้เพิ่มการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 ในการย่อยเจลาติน และเพิ่มการบุกรุกของเซลล์มะเร็งอีกด้วย การใช้ยาต้านอักเสบชนิด aspirin ขนาด $500 \mu\text{M}$ ต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ลดปริมาณฟอสเฟตโปรตีนชนิด Akt/Erk/c-Jun เพิ่มปริมาณโปรตีน RECK ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2/-9 และยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้

การศึกษานี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับ ไมโครอาร์เอ็นเอชนิด miR-21 ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน RECK โดยพบว่า การแสดงออกของ miR-21 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อตับของแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี ในระยะ 2 เดือน (hyperplastic lesion) และ 6 เดือน (CCA) ยังพบว่า miR-21 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยและมีความสัมพันธ์กับการลดลงของโปรตีน RECK และ PDCD4 การศึกษาด้วย siRNA ยับยั้งการทำงานของ miR-21 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนจำนวนหลายชนิดได้แก่ STK40, KLHL15, GPR64, ZBT47, CYBD1, FBX2, FNIP1, SOX7, APAF1, TNRC6B, TPRG1L, SH3GLB1, SOX6, GPR180 and ANKRD46 ซึ่งเกี่ยวข้องในการควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สรุปได้ว่าเครือข่ายการทำงานของ miR-21 มีผลต่อการควบคุมกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง หากสามารถจัดการลดระดับการทำงานของโปรตีนที่อยู่ภายใต้เครือข่ายของ miR-21 ได้ ก็น่าจะมีความเป็นไปได้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นได้ในอนาคต

คำหลัก : มะเร็งท่อน้ำดี RECK กระบวนการแพร่กระจาย ยาแอสไพริน miR-21