

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5980012

ชื่อโครงการ : การกระตุ้นการส่งสัญญาณของวิถีออโตฟาจี: ตัวควบคุมหลักในกระบวนการลุกลามและความไวต่อยาเคมีบำบัดของมะเร็งท่อน้ำดี

ชื่อนักวิจัย : Nisana Namwat, Ph.D.

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

ระยะเวลาโครงการ : 16 มิถุนายน 2559 to 15 มิถุนายน 2561

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งของเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินน้ำดี พบอุบัติการณ์สูงที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีอัตราการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองและหลอดเลือดสูง และมีการดำเนินโรคค่อนข้างช้า การรักษามะเร็งท่อน้ำดีโดยการให้ยาเคมีบำบัดรวมกับการผ่าตัดเป็นทางเลือกที่ดีกว่าได้รับการผ่าตัดเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกและปัจจัยการเกิดโรคของมะเร็งชนิดนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในระหว่างการเกิดเป็นมะเร็ง น่าจะเป็นแนวทางวิจัยที่ตรงเป้าประสงค์ ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีประสิทธิภาพ จากรายงานของเราที่ผ่านมาพบว่า ในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของโปรตีนในวิถี autophagy ที่สูงขึ้นและมีความสัมพันธ์กับภาวะขาดออกซิเจน (HIF-1 α) อัตราการรอดชีพที่สั้น รวมถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง จะเห็นได้ว่า autophagy เป็นวิถีที่มีบทบาทสำคัญในโรคมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของวิถีออโตฟาจีในมะเร็งท่อน้ำดีของสัตว์ทดลองและผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ รวมถึงบทบาทสำคัญของกระบวนการการดำเนินไปของโรคนี้

การศึกษาพบว่า การลดลงของวิถีออโตฟาจี (ดูจากการลดลงของ LC3 และการเพิ่มขึ้นของ p62) เป็นลักษณะที่พบได้ในระยะการเป็นมะเร็ง ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกที่สูงของโปรตีน LC3 มีอัตราการรอดชีพที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของร่วมกันของโปรตีน LC3 ที่สูงและโปรตีน p62 ที่ต่ำ (LC3+/p62-) มีอัตราการรอดชีพที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ การแสดงออกที่สูงของโปรตีน LC3 กับ p62 ที่ต่ำลง และ α -SMA ที่ต่ำลง (LC3+/p62- α -SMA-) หรือ การแสดงออกที่สูงของโปรตีน LC3 กับ p62 ที่ต่ำลง และ IL-6 ที่ต่ำ (LC3+/p62- IL-6 -) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถพยากรณ์อัตราการรอดชีพที่ยาวขึ้นของผู้ป่วยได้ ผลการศึกษาของเราจึงสนับสนุนบทบาทของ CAFs ที่ส่งเสริมการดำเนินไปของโรคมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดลงของวิถีออโตฟาจี

เราได้ทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของสารซีลีเนียม (Selenium และ Selenomethionine) พบว่าสารทั้งสองยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไปกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ autophagy นอกจากนี้เรายังได้ทดสอบการทำงานของ progranulin ด้วยเทคนิค siRNA transfection พบว่ามีการกระตุ้น autophagy และทำให้เซลล์หยุดการแพร่กระจายได้ เรายังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ Dihydroartemisinin (DHA) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ artemisinin ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่า DHA กระตุ้นการตายด้วย apoptosis และเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์อยู่ในระยะ sub G1 และจาก Human autophagy-related qRT² profiler PCR arrays พบว่า นอกจาก DHA จะกระตุ้น apoptosis แล้วยังกระตุ้น

autophagy ได้ด้วย โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นวิถี autophagy ที่เพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่ง DAPK1 ที่มีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย DAPK1 กระตุ้นวิถีออโตฟาจีผ่าน BECLIN1 ผ่านการยับยั้งการจับกับ BCL-2 ส่งผลให้เกิดการจับกันระหว่าง BECLIN1 และ VPS34 เรียกว่า BECLIN1-VPS34 (PI3KC3) autophagy interactome และยังพบว่า spautin-1 (หรือ SP-1 ซึ่งเป็น BECLIN-1 destabilization และเป็นสารยับยั้งวิถี autophagy) หรือ RNA interference (BECLIN1 RNAi silencing) สามารถยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยฤทธิ์ของ DHA จากผลการทดลองนี้ทำให้เห็นว่า DHA กระตุ้นการตายได้ทั้งวิถี apoptosis และวิถี autophagy และโปรตีน BECLIN1 มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกนี้ จึงสามารถสรุปได้ว่า DHA น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

คำหลัก : Autophagy, selenium, progranulin, dihydroartemisinin, Cholangiocarcinoma

ABSTRACT

Project Code : RSA5980012

Project Title : Activation of autophagysignaling pathways: key regulators of tumor progression and chemosensitivity in cholangiocarcinoma

Investigator : Nisana Namwat, Ph.D.

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

Project Period : 16 June 2016 to 15 June 2019

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer of bile duct epithelium. CCA is a major public health problem in northeast region of Thailand. CCA development with high infiltrating growth and high metastasis to lymph node and blood vessel that difficult to be diagnosing and therapy due to late detection and bad prognosis. Chemotherapeutic drugs combination with curative surgical restriction is the best option for advanced CCA than surgical resection alone. Thus, the molecular mechanisms and key factors of CCA, especially gene expression, need to be better understood in order to discover molecular targets for a potential chemoprevention and treatment. As our previously reported, human CCA tissues with highly expression of PI3K class 3 (PI3KC3) was significantly correlated with HIF-1 α expression, with shorter survival and with lymph node metastasis. Taking these results together, it was convincing that autophagy pathway has the important role in CCA. Thus, this study aim to investigate the alteration of autophagy pathway in sections of CCA patient tissues. Challenging autophagy inducers into CCA cell treatment were also investigated.

Results from our study showed the defective autophagy (based on decreases in LC3 or increases of p62) might favor for cancer progression. CCA patients with a high expression of LC3 had longer survival. CCA patients who were positive with co-expressed high of LC3 and low of p62 (LC3+/p62-) was longer overall survival than that of the other groups. Moreover, high of LC3 with low p62 with low α -SMA (LC3+/p62-/ α -SMA-) or high of LC3 with low p62 with low IL-6 (LC3+/p62-/ IL-6-) in cancer-associated fibroblasts (CAFs) predicted the longer survival of patients.

We examined the potential mechanisms of action of selenium (Se and SeMet) and found that both compounds suppressed CCA cell growth by inducing apoptosis and autophagy. Knockdown of progranulin (PGRN) also induced autophagy as similar to selenium. We examined the effect of dihydroartemisinin (DHA) in CCA cell lines and results showed that DHA-induced autophagic cell death due to apoptotic cell death, pro-apoptosis proteins, BAX and BAD, and autophagic related proteins, ATG12, ULK1, BNIP3 and DAPK1 were up-regulated. DAPK1 induces autophagy pathway through BECLIN 1 and disrupts its binding to BCL-2. The above results showed that in CCA cells, prompted by these findings, Selenium and DHA would be the potential therapy strategy for human CCA.

Keywords : Autophagy, selenium, progranulin, dihydroartemisinin, Cholangiocarcinoma