สัญญาเลขที่ RTA 5780012

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่ โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล

คณะผู้วิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ

รศ.ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ

ผศ. ดร. อุบล ชาอ่อน

ผศ.ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์

ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์

ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย

ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ดร. สุชาดา พิมเสน

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยขอนแก่นไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำและกิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล ภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ (RTA5780012) ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2557 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2560 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาแนวทางใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าที่กระบวนสำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ กระบวนการ glycosylation, กระบวนการสร้างพลังงาน และระบบนิเวศน์ของมะเร็ง รวมทั้งการเลือกเฟ้นศักยภาพในการรักษามะเร็งจากยาที่มีอยู่แล้ว ในภาพรวมโครงการดำเนินการวิจัยได้ตามแผนและได้ผลผลิตมากกว่าแผนที่วางไว้ โดยมีผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติในช่วงที่รายงาน 22 เรื่อง มีการนำเสนอผลงานของอาจารย์และนักศึกษา ในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติรวม 80 เรื่อง อาจารย์รุ่นเยาว์ในโครงการ 6 คน ได้เลื่อนตำแหน่งวิชาการเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์จำนวน 4 คน อยู่ในระหว่างรอผล 1 คนและอยู่ในระหว่างรวบรวมผลงาน 1 คน มีส่วนร่วมในการผลิตบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโทและเอก 15 คน อาจารย์ในโครงการได้พัฒนาศักยภาพในลักษณะกลุ่มวิจัย เน้นการทำงานเป็นทีมและเน้นคุณภาพของงานวิจัย มีการรวมตัวและช่วยเหลือเกื้อกูลด้านเทคนิคและความชำนาญ การเรียนรู้และประสานความร่วมมือด้านการวิจัยทั้งภายในและภายนอกกลุ่ม เป็นที่ยอมรับของนักวิจัยทั้งไทยและต่างประเทศ สามารถประสานและเชื่อมโยงงานวิจัยกับนักวิจัยทั้งระดับชาติและนานาชาติ เป็นผู้นำและเป็นตัวแทนของนักวิจัยในหลายโอกาส

อาจารย์-นักศึกษาในโครงการขอขอบคุณและขอบพระคุณ นักวิจัยไทยและต่างประเทศที่ให้ความร่วมมือในการวิจัยภายใต้โครงการนี้ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ และสถาบันมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่-เครื่องมือการวิจัยและวัสดุชีวภาพในการดำเนินการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้เกียรติและสนับสนุนงบประมาณในโครงการด้วยดีจนเสร็จสิ้นโครงการ

ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ
เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

สารบัญ

รายละเอียด	หน้า
คำนำและกิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญรูป	vi
สารบัญตาราง	xi
บทคัดย่อ	xii
Abstract	xiii
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	xiv
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
ระเบียบวิธีวิจัยโดยสรุป	5
ส่วนที่ 1 ผลงานวิจัย	8-118
แผนงานวิจัยที่ 1 มุ่งเป้าที่กระบวนการเติมหมู่น้ำตาล	8
โครงการที่ 1 บทบาทของ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี	8
1.1 การเพิ่มกระบวนการ O-GlcNAcylation ส่งเสริมการเคลื่อนที่และแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยการกระตุ้นการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-ΚB	8
1.2 Mass spectrometry ระบุโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วยกระบวนการ O-GlcNAcylation ที่ไม่มีรายงานมาก่อน และสัมพันธ์กับการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	13
1.3 O-GlcNAcylation กำกับการแสดงออกของ N-linked glycosylation ของไกลโคโปนตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ที่สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดีผ่าน FOXO3 และ MAN1A1	17
1.4 สภาวะน้ำตาลสูงเพิ่มกระบวนการ O-GlcNAcylation และความสามารถในการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยเพิ่มอัตราเร็วของ Hexosamine pathway และความเสถียรของ vimentin	24
โครงการที่ 2 บทบาทของ GalNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี	30
2.1 การแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	30
2.2 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ลดความสามารถในการเกาะติดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	30
2.3 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ส่งผลให้การเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลง	31

รายละเอียด	หน้า
2.4 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA ลดความสามารถในการรุกราน (invasion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	32
2.5 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA ลดการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	32
2.6 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA ลดกระบวนการ epithelial–mesenchymal transition	33
โครงการที่ 3 การแสดงออกและบทบาทของ fucosylation ในมะเร็งท่อน้ำดี	35
3.1 FUT1 เป็นเอนไซม์ที่พบสูงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่รุกรานสูง	35
3.2 พบผลผลิตของเอนไซม์ FUT1 (α1,2-fucosylated glycan, AFG) สูงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและสัมพันธ์กับระยะรอดชีพสั้นของผู้ป่วย	37
3.3 การแสดงออกของ AFG สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ท่อน้ำดีและการก่อมะเร็งท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์	39
3.4 AFG บนเยื่อหุ้มเซลล์สัมพันธ์กับการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	40
3.5 FUT1 และ AFG ส่งเสริมการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านกระบวนการ epithelial-mesenchymal transition	41
3.6 การแสดงออกของ FUT1 เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Akt และ Erk signal pathway	42
ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยที่ 1	46

<u>แผนงานวิจัยที่ 2 มุ่งเป้าที่กระบวนการสร้างพลังงาน</u>

โครงการที่ 1 ผลของระดับกลูโคสในสภาวะเบาหวานต่อ การเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และการต้านการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	52
โครงการที่ 2 กลไกระดับชีวโมเลกุลของกลูโคสที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย transcriptomics techniques	58
โครงการที่ 3 การแสดงออกของยีนในวิถีไกลโคไลซิสในมะเร็งท่อน้ำดี และความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	60
โครงการที่ 4 บทบาทของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิสต่อ การเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และการต้านการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	65
4.1 GLUT1	65
4.2 HK2	66
โครงการที่ 5 การใช้ Glycolytic enzyme inhibitors เป็นยาต้านมะเร็งท่อน้ำดี	67
ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยที่ 2	71

รายละเอียด **หน้า**

<u>แผนงานวิจัยที่ 3 มุ่งเป้าที่ระบบนิเวศน์ของมะเร็ง</u>

โครงการที่ 1 การสร้างและการศึกษาคุณสมบัติการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่เหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง 73

โครงการที่ 2 การศึกษาเพื่อหาโปรตีนหรือผลผลิตจากยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 77

2.1 การศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งในเซลล์ KKU-M213 และ KKU-M213L5 โดยใช้ home-made PCR array 77

2.2 การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ KKU-M214 และ KKU-M214L5 ด้วยวิธี tandem mass spectrometry 82

โครงการที่ 3 การศึกษาเพื่อค้นหาโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและมีผลต่อการดำเนินโรค 85

โครงการที่ 4 การค้นหา secretory protein ที่มีผลต่อการแพร่และการกระจายของมะเร็งท่อน้ำดี 90

4.1 ผลของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อ macrophage 90

4.2 ผลของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อ fibroblast 92

4.3 ผลของสารคัดหลั่ง VEGF ต่อการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดีและการรักษา 95

ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยที่ 3 98

<u>แผนงานวิจัยที่ 4 การพัฒนายาอื่นที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษามะเร็ง</u> 104

โครงการที่ 1 ผลของยา albendazole (ABZ) และ mebendazole (MBZ) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 104

โครงการที่ 2 ผลของยา artesunate และ chloroquine ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 109

โครงการที่ 3 ผลของยา metformin ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 112

ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยที่ 4 116

<u>ส่วนที่ 2 ผลงานอื่น ๆ</u> 119-

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 119

2. การได้รับเชิญเป็นวิทยากรในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ 121

3. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ 124

4. การได้รับรางวัล 131

5. ความก้าวหน้าและพัฒนาศักยภาพของอาจารย์ในโครงการ 132

6. บัณฑิตศึกษา 133

7. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์ 134

รายละเอียด	หน้า

8. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ 134
9. การได้รับทุนอื่นๆ จากทั้งในและต่างประเทศ 136
10. ผลผลิต (output) 138

ส่วนที่ 3 ภาคผนวก

1. สำเนาผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 22 เรื่อง
2. รายละเอียดการจัดประชุม Frontier in cancer research I-III
3. รางวัลต่าง ๆ
4. บทคัดย่อการนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการต่าง ๆ

สารบัญรูป

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
1-1	การแสดงออกของยีน 3 ยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับปริมาณ OGP และการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง KKU-M213 และ KKU-M214	9
1-2	แสดงการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้ง 20 ยีนที่ตรวจวัด	9
1-3	ปริมาณโปรตีน MMP7 และการทำงานของโปรตีน MMP2 และ MMP9	10
1-4	การเปลี่ยนแปลง localization ของโปรตีน NF-ΚB เมื่อเกิด O-GlcNAcylation	11
1-5	การเคลื่อนที่ของโปรตีน NF-ΚB ต่อการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์	12
1-6	การเพิ่มของ O-GlcNAcylation ด้วย PUGNAc เพิ่มการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	14
1-7	โปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	14
1-8	โปรตีน hnRNPK ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ยืนยันด้วย immunoprecipitation	16
1-9	บทบาทของ hnRNPK ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	16
1-10	เปรียบเทียบ N-glycans profile ระหว่าง siOGT และ negative control siRNA	17
1-11	เปรียบเทียบ N-glycans profile ระหว่างเซลล์ต้นแบบและ highly metastatic cells	18
1-12	N-glycans ที่สัมพันธ์กับระดับ O-GlcNAcylation และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	19
1-13	ระดับของ high mannose type N-glycan สัมพันธ์กับระดับ O-GlcNAcylation	20
1-14	บทบาทของ high mannose type N-glycan ต่อความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	21
1-15	O-GlcNAcylation ควบคุมระดับของ high mannose type N-glycan	22
1-16	Akt และ Erk ควบคุมการแสดงออกของ FOXO3	23
1-17	กลูโคสกระตุ้นการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	25
1-18	กลูโคสมีผลต่อระดับ O-GlcNAcylation ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	26
1-19	กลูโคสเพิ่ม O-GlcNAcylation และความเสถียรของ vimentin	26
1-20	การตอบสนองของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้าง O-GlcNAcylation ต่อระดับน้ำตาล	27
1-21	GFAT ควบคุมระดับ O-GlcNAcylation	28
1-22	ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ GFAT กับระดับ O-GlcNAcylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของ ผู้ป่วย	29
1-23	ความสัมพันธ์ของกระบวนการ O-GlcNAcylation กับคุณสมบัติการแพร่ลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี	29
1-24	ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ในเซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดี	30

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
1-25	ความสามารถในการเกาะติดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลงเมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA	31
1-26	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA	31
1-27	ความสามารถในการรุกรานของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA	32
1-28	ความสามารถในแบ่งเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA	32
1-29	EMT markers ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเปลี่ยนแปลงเมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	33
1-30	Phosphorylation ของ AKT และ ERK ลดลงเมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	33
1-31	แผนภาพแสดงบทบาทของเอนไซม์ GalNAc-T5 ในการพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	34
1-32	ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ FUTs ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	35
1-33	การยับยั้งแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ FUT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	36
1-34	ความสามารถด้านการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีลดลง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1	36
1-35	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีลดลง หลังจากยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1	37
1-36	การแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดย UEA-I histochemistry	38
1-37	การแสดงออกของ AFG และการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี	39
1-38	การแสดงออกของ AFG เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	40
1-39	การยับยั้งการแสดงออกของ FUT1 มีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลง EMT	41
1-40	การยับยั้งการแสดงออกเอนไซม์ FUT1 ลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk	43
1-41	การยับยั้งการทำงานของ AFG ด้วย UEA-I ลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk	43
1-42	การยับยั้งการทำงานของ Akt และ Erk ทำให้เกิดกการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ EMT ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	44
1-43	บทบาทของเอนไซม์ FUT1 และหมู่น้ำตาล AFG ในการพัฒนาความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดี	45

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
2-1	สภาวะน้ำตาลสูงกระตุ้นการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	53
2-2	รูปแบบของ phosphorylated protein ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง และน้ำตาลปกติ	54
2-3	สภาวะน้ำตาลสูงเพิ่มระดับ phosphorylation และ nuclear translocation ของ STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	56
2-4	การแสดงออกของโปรตีนที่ถูกควบคุมผ่าน STAT3 pathway ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะน้ำตาลสูงและน้ำตาลปกติ	57
2-5	กลไกในระดับชีวโมเลกุลที่อธิบายการเพิ่มการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีภายใต้สภาวะระดับน้ำตาลสูง	57
2-6	ผลการหาการแสดงออกของยีนในระดับ RNA โดยเทคนิค RNA-seq ระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในสภาวะน้ำตาลสูงและน้ำตาลปกติ	59
2-7	การแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ในท่อน้ำดีปกติ, precancerous และมะเร็งท่อน้ำดี	61
2-8	การแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี	62
2-9	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ต่ออัตรารอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	63
2-10	ผลของ siRNA-GLUT1 ต่อกระบวนการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	65
2-11	ผลของ siRNA-HK2 ต่อกระบวนการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	66
2-12	ผลของ WZB117, GLUT1 inhibitor, ต่อการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	67
2-13	ผลของ lonidamie, HK2 inhibitor, ต่อการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	68
2-14	ผลของ shikonin, PKM2 inhibitor, ต่อการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	69
3-1	รูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบและเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง	75
3-2	ความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง	75
3-3	คุณสมบัติการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง	75
3-4	คุณสมบัติการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง	76
3-5	การแสดงออกของ stem cells marker (CD29, CD44 และ CD133) ที่ผิวของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจาย	76
3-6	การแสดงออกของยีนในเซลล์ KKU-213L5 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นแบบ	77

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
3-7	การแสดงออกของโปรตีน AGR2 และ KiSS-1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระยะของโรคที่แตกต่างกัน	78
3-8	การแสดงออกของ AGR2 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ในเซลล์ KKU-213 และ KKU213L5	78
3-9	ระดับ mRNA และโปรตีน AGR2 ในเซลล์ KKU-213L5 เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ AGR2 ด้วย siRNA หรือ shRNA	79
3-10	ผลของการยับยั้ง AGR2 โดย siRNA (A) และ shRNA (B) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-213L5	80
3-11	ผลของการยับยั้ง AGR2 โดย siRNA และ shRNA ต่อการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์ KKU-213L5	81
3-12	ผลของการยับยั้ง AGR2 โดย siRNA และ shRNA ต่อการทำงานของเอนไซม์ MMP2 และ MMP9	81
3-13	การวิเคราะห์ membrane protein ที่แสดงออกแตกต่างกันใน KKU-M214 และ KKU-M214L5 โดยวิธี tandem mass spectrometry	83
3-14	ผลของการยับยั้งการแสดงออกของ GLIPR1 โดย siRNA ต่อการแสดงออกของ GLIPR1 และการเจริญเติบโตของเซลล์	84
3-15	ผลของการยับยั้งการแสดงออกของ GLIPR1 โดย siRNA ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์	84
3-16	การแสดงออกของ CD147 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย western blot	86
3-17	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของ CD147 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	86
3-18	การเพิ่มการแสดงออกของ CD147 ทำให้เซลล์มะเร็งกระจายไปที่ตับหนูได้มากขึ้น	87
3-19	การแสดงออกของ CD47 ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี จากผู้ป่วย	88
3-20	การแสดงออกและบทบาทของ CD47 บนผิวเซลล์มะเร็งต่อการยับยั้งการเกิด phagocytosis	89
3-21	การแสดงออกของ inflammatory cytokine ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อตรวจโดย cytokine array	91
3-22	การแสดงออก inflammatory cytokine ในเซลล์ KKU-M214L5 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ KKU-214	91
3-23	การแสดงออกของ GM-CSF ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตับปกติเมื่อตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry	92
3-24	ผลของสารคัดหลั่งจาก KKU-213 ต่อ phagocytosis ของ MDM และการหลั่งสารของ MDM	92
3-25	ผลของสารคัดหลั่งจาก CCA ต่อการหลั่ง IL-6 ของ immortalized fibroblast	93
3-26	ผลของการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่และรุกรานของของเซลล์ fibroblast โดยเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	94

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
3-27	ปัจจัยของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ที่มีผลต่อการดึงดูดเซลล์ fibroblast	94
3-28	การแสดงออกของ VEGF ในระดับ mRNA และโปรตีนที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	96
3-29	ความหนาแน่นของหลอดเลือดในก้อนเนื้อที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	96
3-30	ผลของการรักษาด้วย VEGF neutralizing antibody (bevacizumab) ต่อการเจริญของก้อนมะเร็งในหนู	97
3-31	เปรียบเทียบน้ำหนักของก้อนมะเร็งในหนูที่ปลูกถ่ายด้วยเซลล์ KKU-213 เมื่อได้รับการรักษาด้วย bevacizumab, bevacizumab หรือ bevacizumab ร่วมกับ acetazolamide	97
4-1	ABZ และ MBZ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	105
4-2	ABZ และ MBZ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	105
4-3	ABZ และ MBZ สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	106
4-4	ผลของ ABZ และ MBZ ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	107
4-5	MBZ ลดการแสดงออกของโปรตีน Fibronectin, EGFR, E-cadherin, N-cadherin และ Vimentin	107
4-6	การปลูกถ่ายเซลล์ มะเร็งท่อน้ำดีใน nude mice	108
4-7	Tail vein injection metastasis model เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการลุกลามของมะเร็ง	108
4-8	ผลของ ART และ CQ ต่อการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	109
4-9	แบบแผนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกกระตุ้นด้วย ART และ CQ	110
4-10	ผลของ CQ ต่อ lysosome ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	110
4-11	KEGG pathway analysis แสดงแบบแผนการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อยา CQ	112
4-12	ยา metformin ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	113
4-13	Metformin ยับยั้งการเจริญของ CCA cell lines ผ่านการกระตุ้น cell cycle arrest	114
4-14	Metformin ยับยั้ง migration, invasion และกระตุ้น anoikis ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	115

สารบัญตาราง

ตารางที่	รายละเอียด	หน้า
1-1	บทบาทของโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ต่อเซลล์มะเร็ง	15
2-1	การแสดงออกของโปรตีนในวิถีไกลโคไลซิสในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	61
2-2	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ต่อการแสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	64
3-1	โปรตีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 5 อันดับแรกที่ได้จากเทคนิค in-gel และ in-solution analysis	83
4-1	Lysosomal proteins ที่แสดงออกเพื่อตอบสนองต่อยา CQ	111

บทคัดย่อ

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาแนวทางใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าที่กระบวนสำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ กระบวนการ glycosylation, กระบวนการสร้างพลังงาน และระบบนิเวศน์ของมะเร็ง รวมทั้งการเลือกเฟ้นศักยภาพในการรักษามะเร็งจากยาที่มีอยู่แล้ว ผลการวิจัยพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีมีความผิดปกติในกระบวนการ glycosylation ที่เป็นอัตลักษณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ O-GlcNAcylaiton, fucosylation และ GalNAcylation ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ carcinogenesis และ metastasis ของมะเร็งท่อน้ำดี สามารถนำมาประยุกต์เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพจำเพาะสำหรับตรวจวินิจฉัยแยกมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีได้ ด้านกระบวนการผลิตพลังงานพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีมีการสร้างเอนไซม์จำเพาะในระบบไกลโคไลซิส เช่น HK2, PKM2, LDHA และตัวนำส่งกลูโคสเข้าเซลล์ GLUT1 ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์จำเพาะเหล่านี้สัมพันธ์กับการก่อมะเร็งและระยะรอดชีพของผู้ป่วย การยับยั้งการทำงานอย่างจำเพาะของโมเลกุลเหล่านี้สามารถลดการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะน้ำตาลสูงซึ่งพบได้มากในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ส่งเสริมพัฒนาการของเซลล์มะเร็งให้แพร่ลุกลามมากขึ้น ดังนั้นการควบคุมระดับน้ำตาลในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเช่นกัน สำหรับการวิจัยด้านระบบนิเวศน์ของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นระบบที่ซับซ้อนและเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษามะเร็ง คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง 2 ชนิดเพื่อเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษากลไกระดับโมเลกุลและความสัมพันธ์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีกับระบบนิเวศน์ของมะเร็ง พบโมเลกุลสำคัญบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เช่น CD147, AGR2, GLIPR1 และ CD47 รวมทั้งการศึกษาผลของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อ phagocytosis ของ macrophage และการหลั่ง IL-6 ของ fibroblast ซึ่งสามารถใช้เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการควบคุมและยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ในอนาคต ในแผนงานสุดท้ายที่เกี่ยวกับการเลือกเฟ้นศักยภาพในการรักษามะเร็งจากยาที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษาหรือร่วมรักษามะเร็งท่อน้ำดี พบว่ายาหลายชนิดเช่น albendazole, mebendazole, cimetidine, berberine, metformin, chloroquine, และ artesunate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ในระดับเซลล์ได้ ผลการวิจัยเหล่านี้ได้แสดงให้เห็นโมเลกุลที่อาจเป็นเป้าหมายใหม่ในการผลิตหรือสังเคราะห์ยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งควรได้รับการศึกษาต่อในเชิงลึกเพื่อให้ทราบบทบาทและกลไกที่แน่ชัดเพื่อใช้ทดสอบในผู้ป่วยต่อไป

ในภาพรวมโครงการดำเนินการวิจัยได้ตามแผนและได้ผลผลิตมากกว่าแผนที่วางไว้ โดยมีผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติในช่วงที่รายงาน 22 เรื่อง มีการนำเสนอผลงานของอาจารย์และนักศึกษา ในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติรวม 80 เรื่องและได้รับรางวัลการนำเสนอ 26 เรื่อง อาจารย์รุ่นเยาว์ในโครงการ 6 คน ได้เลื่อนตำแหน่งวิชาการเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์จำนวน 4 คน มีส่วนร่วมในการผลิตบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโทและเอก 15 คน โครงการได้สร้างโอกาสให้นักวิจัยรุ่นเยาว์ได้ทำงานร่วมกันทั้งภายในและภายนอกกลุ่ม-ทั้งในและต่างประเทศ โครงการได้เสริมศักยภาพด้านการประสานความร่วมมือ-การจัดการและภาวะผู้นำให้กับสมาชิกในกลุ่ม ท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์และนักศึกษาทั้งในและต่างประเทศที่ได้ให้ความร่วมมือในโครงการนี้ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ และสถาบันมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่-เครื่องมือการวิจัยและวัสดุชีวภาพในการดำเนินการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้เกียรติและสนับสนุนงบประมาณในโครงการด้วยดีจนเสร็จสิ้นโครงการ

คำสำคัญ: Bile duct cancer, glycosylation, cancer metabolism, tumor environment, drug repurposing

Abstract

In this research program, multi-molecular approaches to elucidate the signaling exploited by the cancer and identify the possible therapeutic targets were proposed. Three main processes associated with survival and metastasis of cholangiocarcinoma (CCA), namely glycosylation; energy production, tumor and tumor environment interaction, and the repositioning of the existing drugs for alternative treatment of CCA were elucidated. Aberrant glycosylations—namely O-GlcNAcylaiton, fucosylation and GalNAcylation were observed uniquely in tumor tissues of CCA patients. The expressions of these glyosylated proteins were associated with carcinogenesis and progression of CCA. Some of which can be applied as diagnostic-prognostic markers or therapeutic targets for CCA. For metabolism, CCA cells expressed several cancer specific isoforms of enzymes in glycolytic pathways, e.g., HK2, PKM2, LDHA and glucose transporter, GLUT1. High expression of these enzymes also related to cancer development and poor survival of CCA patients. Inhibiting expression or action of these enzymes can be an alternative treatment of CCA. Moreover, we found that high glucose level could promote progression of CCA cells, and hence controlling blood glucose of patients who possessed hyperglycemia should be considered as supportive therapy for CCA. Two highly metastatic cells were established to study the molecular mechanism involving CCA progression and interaction with stroma cells. Several molecules, e.g., D147, AGR2, GLIPR1 and CD47 were focused for their roles in metastasis and suggested as new drug targets for drug design and development. In addition, effect of secretory products of CCA cells on phagocytosis of macrophage and secretion of IL-6 from fibroblast were demonstrated. Albendazole, mebendazole, cimetidine, berberine, metformin, chloroquine, and artesunate are known drugs that have high potential for CCA treatment. These findings offer new opportunities for preclinical investigation of CCA with novel candidate therapeutic targets and new molecularly targeted agents. The potential inhibitors or drugs against the target molecules should be proposed for clinical trial with the additional support from other granting sources.

Apart from the research results, the project provided a better outcome than proposed. There are 22 published research articles with 3 more are under-revision and submission. There were 80 presentations with 26 awards gained in the national and international scientific conferences. The project has strengthened 6 junior staffs, 4 of whom were promoted to be assistant professor; 15 Ph.D. and M.Sc. students are included in the projects. The program has provided opportunities for junior staffs to join hands and work together within group or with other groups. Several collaborations among Thai and international researchers are initiated. Collaboration, management and leadership are built up during participation with the program. Finally, we would like to acknowledge every researcher who participated and supported research activities in this program; Faculty of Medicine and Cholangiocarcinoma Research Institute for supporting the research facilities; the Thailand Research Fund and Khon Kaen University for financial supports.

Keywords: Bile duct cancer, glycosylation, cancer metabolism, tumor environment, drug repurposing

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

รายงานนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล ภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ (RTA5780012) ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2557 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2560 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาแนวทางใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าที่กระบวนสำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ กระบวนการ glycosylation, กระบวนการสร้างพลังงาน และระบบนิเวศน์ของมะเร็ง รวมทั้งการเลือกเฟ้นศักยภาพในการรักษามะเร็งจากยาที่มีอยู่แล้ว ผลการวิจัยพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีมีความผิดปกติในกระบวนการ glycosylation ที่เป็นอัตลักษณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ O-GlcNAcylaiton, fucosylation และ GalNAcylation ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ carcinogenesis และ metastasis ของมะเร็งท่อน้ำดี สามารถนำมาประยุกต์เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพจำเพาะสำหรับตรวจวินิจฉัยแยกมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีได้ ด้านกระบวนการผลิตพลังงานพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีมีการสร้างเอนไซม์จำเพาะในระบบไกลโคไลซิส เช่น HK2, PKM2, LDHA และตัวนำส่งกลูโคสเข้าเซลล์ GLUT1 ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์จำเพาะเหล่านี้สัมพันธ์กับการก่อมะเร็งและระยะรอดชีพของผู้ป่วย การยับยั้งการทำงานอย่างจำเพาะของโมเลกุลเหล่านี้สามารถลดการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะน้ำตาลสูงซึ่งพบได้มากในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ส่งเสริมพัฒนาการของเซลล์มะเร็งให้แพร่ลุกลามมากขึ้น ดังนั้นการควบคุมระดับน้ำตาลในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป้าหมายที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเช่นกัน สำหรับการวิจัยด้านระบบนิเวศน์ของมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเป็นระบบที่ซับซ้อนและเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษา คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง 2 ชนิดเพื่อเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษากลไกระดับโมเลกุลและความสัมพันธ์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีกับระบบนิเวศน์ของมะเร็ง พบโมเลกุลสำคัญบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งรวมทั้งการแนวทางการยับยั้งการทำงานของโมเลกุลเหล่านั้น ในแผนงานสุดท้ายที่เกี่ยวกับการเลือกเฟ้นศักยภาพในการรักษามะเร็งจากยาที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษาหรือร่วมรักษามะเร็งท่อน้ำดี พบว่ายาหลายชนิดเช่น albendazole, mebendazole, cimetidine, berberine, metformin, chloroquine, และ artesunate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ในระดับเซลล์ ซึ่งควรศึกษาต่อถึงผลของยาเหล่านี้ในระดับสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยต่อไป

ในภาพรวมโครงการดำเนินการวิจัยได้ตามแผนและได้ผลผลิตมากกว่าแผนที่วางไว้ โดยมีผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติในช่วงที่รายงาน 22 เรื่อง อยู่ในระหว่าง review หรือเตรียมต้นฉบับอีก 3 เรื่อง มีการนำเสนอผลงานของอาจารย์และนักศึกษา ในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติรวม 80 เรื่อง เป็นการนำเสนอแบบ oral presentation จำนวน 25 เรื่อง และ poster presentation จำนวน 55 เรื่อง ได้รับรางวัล the best oral presentation 6 เรื่อง Outstanding poster presentation 7 เรื่องและ Travel award 13 เรื่อง อาจารย์รุ่นเยาว์ในโครงการ 6 คน ได้เลื่อนตำแหน่งวิชาการเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์จำนวน 4 คน อยู่ในระหว่างรอผล 1 คนและอยู่ในระหว่างรวบรวมผลงาน 1 คน ได้รับเชิญเป็นวิทยากรในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติทั้งหมด 28 ครั้ง ได้รับรางวัลด้านการวิจัยและอาจารย์ที่เป็นแบบอย่างรวม 12 รางวัล โครงการนี้มีส่วนร่วมในการผลิตบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโทและเอก 15 คน สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท 2 คน ปริญญาเอก 3 คน สอบป้องกันวิทยานิพนธ์และอยู่ในระหว่างรอผลงานตีพิมพ์ 3 คน ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ “ดีเด่น” ระดับปริญญาเอก กลุ่มวิทยาศาตร์สุขภาพ ประจำปีการศึกษา 2559 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น 1 คน โครงการได้จัดประชุมวิชาการประจำปีตามภารกิจทุนเมธีวิจัย

อาวุโส สกว. Frontier for Cancer Research 3 ครั้ง ซึ่งนอกจากนำเสนอผลงานความก้าวหน้าของโครงการแล้ว ในแต่ละครั้งได้เชิญผู้เชี่ยวชาญในแต่ละเรื่องมาร่วมบรรยายและจัด workshop เพื่อถ่ายทอดประสพการณ์และความชำนาญให้กับสมาชิกและผู้เข้าร่วมประชุม และเป็นการขยายความร่วมมือกับนักวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยสนับสนุนให้สมาชิกในโครงการเป็นผู้ร่วมวิจัยกับนักวิจัยไทยและนักวิจัยต่างประเทศในโครงการต่าง ๆ โดย ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ เป็นที่ปรึกษาโครงการ ได้ให้ความร่วมมือแบบ in kind ในโครงการ Development of an innovative diagnostic system against liver fluke infection in Southeast Asian countries (ทุน e-Asia) โดยมี Prof. Hisashi Narimatsu, Glycoscience and Glycotechnology Research Group, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายญี่ปุ่นและ ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายไทย ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ภายใต้ความร่วมมือนี้ทำให้คณะผู้วิจัยมีโอกาสศึกษาเปรียบเทียบ tumor marker ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชาวญี่ปุ่น ไทยและลาว โดยบริษัท Sysmex ประเทศญี่ปุ่น ได้เอื้อเฟื้อเครื่องตรวจวิเคราะห์ พร้อมน้ำยา ให้กับโครงการโดยไม่มีค่าใช้จ่าย และทำให้ นส. พัชราภรณ์ บุตตะนันท์ นักศึกษาปริญญาโท คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้รับทุน Monbukagakusho: MEXT 2017 เพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ Tsukuba University โดยมี Prof. Hisashi Narimatsu และ Assoc. Prof. Kiyohiko Angata เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา นอกจากนี้ยังเอื้อให้สมาชิกในโครงการได้รับการฝึกอบรมการทำ Immunoglobulin class switching ที่ AIST, Tsukuba, Japan เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ด้วยความร่วมมือกับ Prof. Seiji Okada, Kumamoto University ทำให้อาจารย์และนักศึกษาในโครงการได้พัฒนางานด้านการวิจัยที่ Kumamoto University อย่างต่อเนื่อง

โดยสรุปอาจารย์และนักศึกษาภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับการสนับสนุนด้านการวิจัยและพัฒนาศักยภาพในลักษณะกลุ่มวิจัย เน้นการทำงานเป็นทีมและคุณภาพของงานวิจัย มีการรวมตัวและช่วยเหลือเกื้อกูลด้านเทคนิคและความชำนาญ การเรียนรู้และประสานความร่วมมือด้านการวิจัยทั้งภายในและภายนอกกลุ่ม เป็นที่ยอมรับของนักวิจัยทั้งไทยและต่างประเทศ อาจารย์ได้รับรางวัลด้านการวิจัยและได้รับแต่งตั้งให้ทำงานในระดับบริหารของคณะและมหาวิทยาลัย สามารถประสานและเชื่อมโยงงานวิจัยกับนักวิจัยทั้งระดับชาติและนานาชาติ เป็นผู้นำและเป็นตัวแทนของเมธีวิจัยอาวุโสในหลาย ๆตำแหน่ง ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. จึงสร้างคุณูปการต่ออาจารย์-นักวิจัยรุ่นเยาว์และนักศึกษา อาจารย์-นักศึกษาในโครงการขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น มา ณ โอกาสนี้

โสพิศ วงศ์คำ
เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

โครงการ: การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล
Multi-molecular approaches for discovery of alternative targets for cholangiocarcinoma treatment

แหล่งทุน เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ (RTA 5780012)
ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี (2557-2560)

คณะผู้วิจัย

1. ศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ (Sopit Wongkham) หัวหน้าโครงการ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: sopit@kku.ac.th
โทรศัพท์ 043-348-386, 089-711-6578

2. รศ.ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ (Chaisiri Wongkham) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: chaisiri@kku.ac.th
โทรศัพท์ 043-348-386, 087-213-4151 E-mail

3. ผศ.ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ (Kanlayanee Sawanyawisuth) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: kanlayanee@kkumail.com
โทรศัพท์ 043-348-386, 089-617-3211

4. ผศ. ดร. อุบล ชาอ่อน (Ubon Cha-on) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: ubocha@kku.ac.th
โทรศัพท์ 043-348-386, 085-925-8306

5. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ (Kulthida Vaeteewoottacharn) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: kulthidava@kku.ac.th
โทรศัพท์ 043-348-386, 081-450-8200

6. ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย (Wunchana Seubwai) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชานิติเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: wunchana@kku.ac.th
โทรศัพท์ 043-202-859, 080-412-5559

7. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ (Atit Silsirivanit) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: atitsil@kku.ac.th
โทรศัพท์ 043-348-386, 093-546-4655

8. ดร. สุชาดา พิมเสน (Suchada Phimsen) ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย มหาวิทยาลัยนเรศวร E-mail: suchadaph@nu.ac.th
โทรศัพท์ 055-964-634, 055-964-770

9. นางสาวสมสิริ อินทรมณี (Somsiri Indramanee) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป เอก)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: Somsiri_ind@hotmail.com

โทรศัพท์ 043-348-386, 087-229-6859

10. นายฉัตรชัย ภู่มาก (Chatchai Phoomak) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป เอก คปก.)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: Chatchai_phoo@hotmail.com
โทรศัพท์ 043-348-386, 087-260-0114

11. นางสาววรพร แสนทวีสุข (Waraporn Saentaweesuk) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป เอก คปก.)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: s.waraporn17@gmail.com
โทรศัพท์ 043-348-386, 087-721-5343

12. นายมารุตพงศ์ เดชอาญา (Marutpong Detarya) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป เอก คปก.)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: Mrvarmmt@hotmail.com
โทรศัพท์ 043-348-386, 089-572-1030

13. นายจารุพงษ์ แสงบุญมี (Charupong Saengboonmee) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป เอก ทุน สวทช.)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: scharu@kkumail.com
โทรศัพท์ 043-348-386, 087-953-9769

14. นางสาวอุบลรัตน์ ธำรงวรางกูร (Ubonrat Thamrongwaranggoon) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป โท)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: Tham_ubonrat@kkumail.com
โทรศัพท์ 043-348-386, 080-361-9531

15. นางสาวอัญชลี ต้นศรี (Unchalee Thonsri) ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป โท)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโทรศัพท์ E-mail:
043-348-386, 082-853-5758 Unchalee_Thonsri@hotmail.com

16. Mr. Diwakar Guragain ผู้ร่วมวิจัย (นศ. ป เอก)
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโทรศัพท์ E-mail: diwakarguragain@gmail.com
043-348-386, 089-416-0744

17. นางสาวณัฐกาณต์ สิดาสม ผู้ช่วยวิจัย (ปริญญาตรี)

18. นางสาวมลิวรรณ ไพรัชการนันท์ ผู้ช่วยฝ่ายบัญชี (ปริญญาตรี)
E-mail: mary_kku@yahoo.co.th

ที่ปรึกษาโครงการ

1. Prof. Seiji Okada. Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.
2. Assoc. Prof. Norie Araki. Department of Tumor Genetics and Biology, Graduated School of Medical Sciences Kumamoto University, Kumamoto, Japan.
3. Hisashi Narimatsu. Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Umezono, Tsukuba, Japan.

4. Teh Tean Bin, National Cancer Center, Singapore.

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

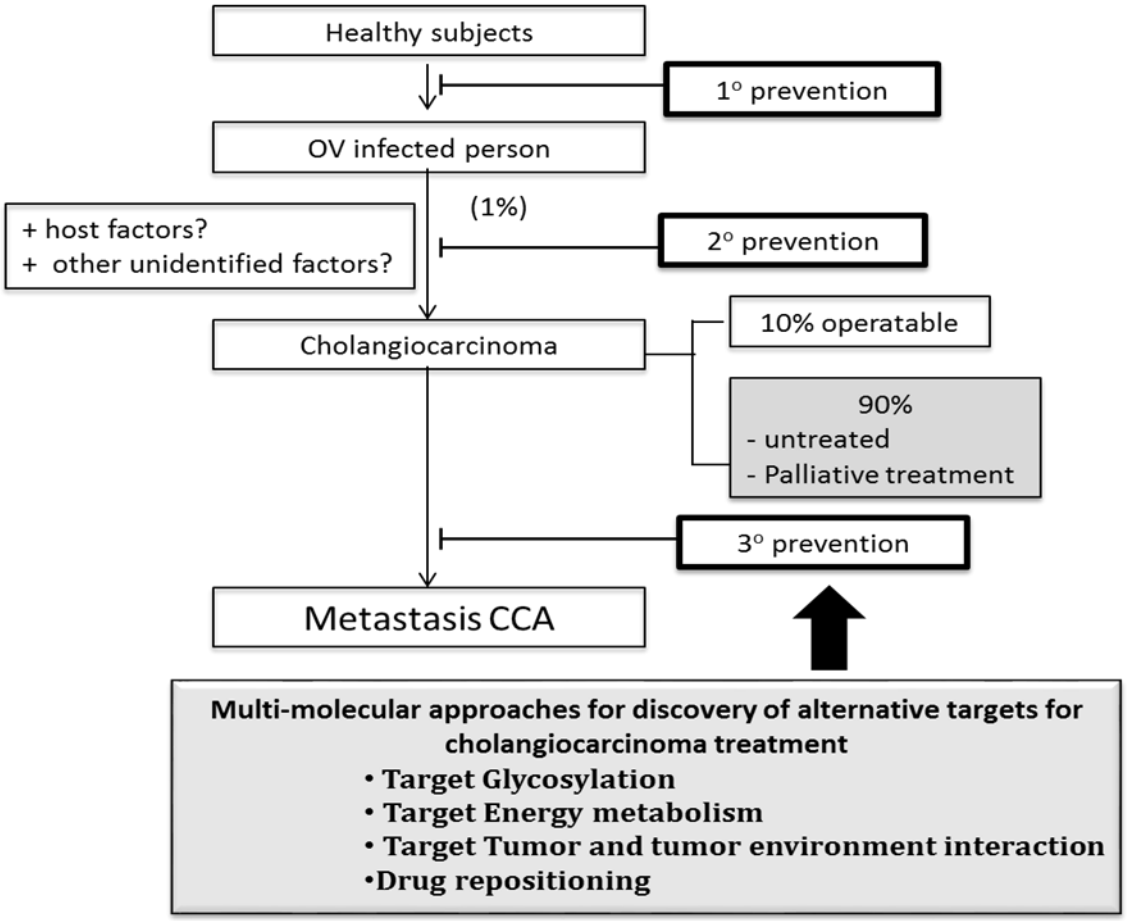
จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุข มะเร็งยังคงเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรไทย โดยอัตราการตายด้วยมะเร็งของประชากรไทย เป็น 83 ต่อแสนในปี 2549 และเพิ่มขึ้นเป็น 91 ต่อแสนในปี 2553 และมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยสาเหตุการตายจากมะเร็งตับและท่อน้ำดีสูงเป็นอันดับหนึ่ง ในขณะที่อัตราการตายด้วยอุบัติเหตุมีแนวโน้มลดลง คือ 59.8 ต่อแสนในปี 2549 เป็น 51.6 ต่อแสนในปี 2553 และอัตราการตายด้วย HIV ก็มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน คือ 10.5 ต่อแสนในปี 2549 เป็น 5.7 ต่อแสนในปี 2553 ข้อมูลทางระบาดวิทยาชี้ชัดว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งตับและท่อน้ำดีเป็นปัญหาเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีประชากรมากที่สุดและมีรายได้ต่อประชากรต่ำที่สุด ข้อมูลทางพยาธิวิทยาระบุว่ามากกว่า 80% ของมะเร็งตับที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีทั่วโลก พบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยสูงเป็นอันดับต้น ๆของโลก โดยมีอัตราการตายด้วยมะเร็งท่อน้ำดีเฉลี่ย 14,000 รายต่อปีหรือ 1.6-2 รายต่อชั่วโมง แม้จะเป็นที่ทราบดีว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญและมีการรณรงค์ป้องกันการติดพยาธิชนิดนี้ในระดับประเทศแล้วหลายครั้ง แต่อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้ลดลงตามการลดลงของพยาธิใบไม้ตับ อาจเนื่องจากมีปัจจัยเสริมอื่นที่ยังไม่ทราบส่งเสริมให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้ นอกจากนี้ปัญหาพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดียังเป็นปัญหาสุขภาพร่วมของประชากรลุ่มน้ำโขง ซึ่งมีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับและมีพฤติกรรมการกินปลาน้ำจืดดิบเหมือนคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการที่มะเร็งเป็นโรคเรื้อรังและไม่ติดต่อเหมือนโรคติดเชื้ออื่น ดังนั้นความสูญเสียทั้งชีวิตและทรัพย์สินของชาติต่อปัญหาสุขภาพนี้จึงไม่ปรากฏแจ้งชัดเหมือนโรคเอดส์หรือไข้หวัดนก และไม่เห็นผลกระทบโดยตรงต่อเศรษฐกิจของชาติในภาพรวม อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถปฏิเสธความจริงของการสูญเสียในชีวิตและทรัพย์สินของผู้ป่วยมะเร็งและครอบครัวที่เกิดขึ้นได้

เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้พบน้อยมากในชาวตะวันตก จึงทำให้การวิจัยและรายงานการศึกษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระดับสากลมีน้อยและมีผู้สนใจในวงจำกัด แม้ว่ารายงานระบาดวิทยาของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศตะวันตกเช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในคนไทย มีสมมุติฐานของโรคและการแสดงออกในระดับโมเลกุลที่แตกต่างจากผู้ป่วยในประเทศตะวันตกและประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ดังนั้นข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในชนชาติอื่นจึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยได้โดยตรง จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยเอง

ปัญหาของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยคือการขาดการติดตามเฝ้าระวังประชากรกลุ่มเสี่ยง ขาดวิธีการวินิจฉัยมะเร็งให้ได้ในระยะแรกซึ่งการผ่าตัดยังให้ผลดี ขาดการติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งในผู้ป่วยที่ได้รับหรืออยู่ในระหว่างการบำบัดรักษา รวมทั้งการขาดแนวทางการรักษาที่เป็นมาตรฐานและมีประสิทธิภาพ ทำให้อุบัติการณ์และความสูญเสียที่เกิดจากมะเร็งชนิดนี้ยังเป็นปัญหาอันดับแรกของประเทศ ในภาพรวมผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ (ประมาณ 90%) ไม่สามารถรับการรักษาให้หายด้วยการผ่าตัดเนื่องจากเป็นมะเร็งระยะท้ายที่มีการแพร่ลุกลามของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น การให้ยาเคมีบำบัดไม่ได้ผลดีเนื่องจากมะเร็งดื้อต่อยา ดังนั้นการพัฒนาแนว

ทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพ เหมาะสมและตรงเป้าหมายกับชนิดของมะเร็งจึงเป็นแนวทางที่จะช่วยรักษาหรือยืดชีวิตผู้ป่วยเหล่านี้ได้

การรักษามะเร็งให้หายขาดและไม่เกิดการเป็นซ้ำ จำเป็นต้องกำจัดเซลล์มะเร็งทั้งที่อวัยวะต้นกำเนิดและที่แพร่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่นให้หมดไป ด้วยธรรมชาติของมะเร็งที่ประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิดที่พฤติกรรมที่แตกต่างกัน การใช้ยาเพียงชนิดเดียวหรือกลไกเดียวจึงไม่อาจทำลายเซลล์มะเร็งทั้งหมดได้ การยับยั้งกลไกการดื้อยาและขัดขวางกระบวนการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งด้วยกลไกที่แตกต่างกัน จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการบำบัดรักษามะเร็งทั้งในอวัยวะต้นกำเนิดและที่แพร่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่นได้ และเมื่อใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่มีในปัจจุบันจะช่วยเสริมฤทธิ์ของยาเคมีและทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้นได้ โครงการวิจัยนี้ได้เสนอแนวทางการวิจัยสหวิทยาโมเลกุลเพื่อค้นหาเป้าหมายใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าไปยังกระบวนการสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็งได้แก่ กระบวนการ glycosylation, การสร้างพลังงาน (energy metabolism) และระบบนิเวศน์ของมะเร็ง (tumor environment interaction) และการพัฒนายาอื่นที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษามะเร็ง (Drug repositioning) ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประตูสำคัญในต่อเชื่อมความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ ซึ่งมีผลกระทบต่อชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกลุ่มใหญ่ที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดด้วยการผ่าตัดได้



2. **วัตถุประสงค์** เพื่อค้นหาแนวทางใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าที่กระบวนสำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ การ glycosylation, การสร้างพลังงาน และระบบนิเวศน์ของมะเร็ง รวมทั้งการเลือกเฟ้นศักยภาพในการรักษามะเร็งจากยาที่มีอยู่แล้ว

3. ระเบียบวิธีวิจัยโดยสรุป

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 4 แผนงาน คือ

<u>แผนงานวิจัยที่ 1 มุ่งเป้าที่กระบวนการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation)</u>

Glycosylation เป็นกระบวนการที่เกิดหลังการสังเคราะห์โปรตีน การเติมหมู่น้ำตาลมีบทบาทสำคัญต่อความจำเพาะของโมเลกุลและของเซลล์ โดยเฉพาะโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (เช่น ระบบหมู่เลือด, membrane receptors, adhesion molecules) และโปรตีนในน้ำคัดหลั่ง (secretory protiens) เนื่องจากการเติมน้ำตาลในระบบ glycosylation ไม่มีแม่แบบที่แน่นอน (non-template) ขึ้นกับเอ็นไซม์และปัจจัยแวดล้อม ดังนั้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนซึ่งถูกกำกับจากยีน มีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่พบการเปลี่ยนแปลงของหมู่น้ำตาล glycan บนโปรตีนหลายชนิดที่สัมพันธ์กับภาวะมะเร็ง และหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะมะเร็ง การศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยเองพบการเปลี่ยนแปลงของ glycan หลายชนิดในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติ และพบว่าการใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ glycan บนเยื่อหุ้มเซลล์สามารถลดการแบ่งเซลล์ การเคลื่อนที่และการรุกล้ำ extracellular matrix ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลิตผลและบทบาทของ O-GlcNAcylation และ fucosylation ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เนื้อเยื่อผู้ป่วย และสัตว์ทดลอง ทดสอบการยับยั้งระบบ O-GlcNAcylation และ fucosylation ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและสัตว์ทดลอง ซึ่งการศึกษาเบื้องต้นพบว่าระบบทั้งสองในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่างจากเซลล์ปกติและสัมพันธ์กับภาวะมะเร็ง ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของระบบทั้งสองอาจเป็นเป้าหมายใหม่ในการยับยั้งการเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดีได้

<u>แผนงานวิจัยที่ 2 มุ่งเป้าที่กระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism)</u>

เป็นที่ทราบกันดีว่าเซลล์มะเร็งใช้กระบวนการสร้างพลังงานที่ต่างจากเซลล์ปกติ กล่าวคือใช้ glycolysis มากกว่า oxidative phosphorylation ในไมโทคอนเดรีย แม้ว่าเซลล์จะมีออกซิเจนเพียงพอ หรือที่เรียกว่า “Warburg effect” ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการ glycolysis ให้สารตัวกลางที่จำเป็นต่อการสร้างมหโมเลกุลหลายชนิดที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ผลการวิจัยเกี่ยวกับการใช้พลังงานจากกลูโคสของเซลล์มะเร็งในทศวรรษที่ผ่านมา ทำให้ทราบว่าเซลล์มะเร็งผลิตและใช้ isoform ของ regulatory enzymes หลายชนิดในกระบวนการ glycolysis ที่ต่างจากเซลล์ปกติ เช่น ใช้ hexokinase II มากกว่า Hexokinase I, ใช้ pyruvate kinase M2 มากกว่า pyruvate kinase M1 และ lactate dehydrogenase B มากกว่า lactate dehydrogenase A นอกจากนี้ glucose transporters และ monocarboxylate transporter ก็แตกต่างจากเซลล์ปกติ ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะใช้โมเลกุลเหล่านี้เป็นเป้าหมายจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็ง ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ isoform ที่พบมากในเซลล์มะเร็งเหล่านี้ยังมีบทบาทหน้าที่อื่นนอกเหนือจากการทำงานในวิถี glycolysis สามารถปรับแต่งโปรตีนอื่นและส่งเสริมการทำงานของโปรตีนเหล่านั้นเพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโต การต้านการตายและการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษา isoform ของเอ็นไซม์ในกระบวนการ glycolysis ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วย ศึกษาผล

การยับยั้งการทำงานของ isoform เหล่านี้ด้วยยาและ inhibitor ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและสัตว์ทดลอง ศึกษาภาวะระดับกลูโคสสูงต่อการเจริญและการแพร่รุกล้ำของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้งศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เป้าหมายเหล่านี้ต่อการเจริญและการพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การศึกษากลไกระดับโมเลกุลที่ส่งเสริมสภาวะดังกล่าวเป็นแนวทางใหม่ในการหาตัวยับยั้งการเจริญหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของมะเร็งท่อน้ำดีได้

แผนงานวิจัย 3 มุ่งเป้าที่ระบบนิเวศน์ของมะเร็ง (tumor environment)

เซลล์มะเร็งเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ถูกกำจัดได้ด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน หากแต่เซลล์มะเร็งมีระบบหลบหลีกและเหนี่ยวนำให้เซลล์ข้างเคียงในระบบนิเวศน์ ได้แก่ ไฟโบรบลาส และแม้แต่เซลล์เม็ดเลือดขาว macrophage ให้เกื้อกูลและอยู่ร่วมกับเซลล์มะเร็งได้ การศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าเซลล์ monocyte และ macrophage ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดที่ต่างจากเซลล์ของคนปกติ โปรตีนเหล่านี้เอื้อต่อการเจริญและการรุกล้ำของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้การทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์อื่น ๆในระบบนิเวศน์ของมะเร็ง ยังช่วยสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และเหนี่ยวนำให้เกิด epithelial mesenchymal transition ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ส่งเสริมการรุกล้ำของเซลล์มะเร็งด้วย ดังนั้นการรบกวนระบบนิเวศน์ของมะเร็งจึงเป็นเป้าหมายใหม่ของการทำลายเซลล์มะเร็ง โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาโปรตีนที่สร้างและหลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง รวมทั้งการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีระยะต่าง ๆและคนปกติ โดยค้นหาและศึกษาบทบาทของโปรตีนเป้าหมายต่อการแพร่กระจายและการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยมีสมมุติฐานว่าโปรตีนเหล่านี้อาจเป็นเป้าหมายใหม่ในการทำลายระบบนิเวศน์ของเซลล์มะเร็งได้

แผนงานวิจัยที่ 4 การพัฒนายาอื่นที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษามะเร็ง (Drug repositioning)

การคิดค้นยาใหม่โดยเฉพาะยารักษามะเร็งต้องผ่านกระบวนการต่าง ๆทั้งในระดับเซลล์ สัตว์ทดลอง และการทดสอบในมนุษย์หลายระยะ รวมเวลาทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 10-15 ปี จึงเป็นการลงทุนที่ใช้งบประมาณสูงมาก ทำให้ยาเหล่านี้มีราคาแพง สำหรับมะเร็งท่อน้ำดียาเคมีบำบัดที่ใช้รักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลดี มีการตอบสนองต่ำ (10-40%) และเพิ่มระยะรอดชีพเพียง 3-6 เดือนเท่านั้น ทั้งนี้ส่วนหนึ่งอาจเนื่องจากมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด นักวิจัยจำนวนมากได้แสวงหาสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งส่วนใหญ่แสดงผลทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ปัจจุบันได้มีแนวคิดใหม่ในการนำยาอื่น ๆที่ไม่ใช่ยารักษามะเร็งแต่มีการใช้แล้วในเวชปฏิบัติมาทดสอบศักยภาพในการรักษามะเร็ง เรียกแนวทางนี้ว่า Drug repositioning หรือ Drug repurposing มีรายงานหลายชิ้นที่แสดงว่า ยารักษามาลาเรีย chloroquine และยาฆ่าพยาธิ mebendazole สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง chloroquine สามารถยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด และสามารถยืดระยะรอดชีพเมื่อทดสอบในผู้ป่วยมะเร็ง glioblastoma ส่วน mebendazole มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดเช่นกัน และมีการทดสอบแล้วในผู้ป่วย metastatic adrenocortical carcinoma เพื่อแสวงหายาที่มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีตามแนวทางนี้ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบฤทธิ์ของ chloroquine และ mebendazole ในทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง และหากได้ผลดีจะขยายการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bhudhisawasdi V, Talabnin C, Pugkhem A, Khuntikeo N, Seow OT, Chur-In S et al. (2012). Evaluation of Postoperative Adjuvant Chemotherapy for Intrahepatic Cholangiocarcinoma Patients undergoing R1 and R2 Resections. Asian Pacific journal of cancer prevention. Asian Pacific J Cancer Prev. 13 Suppl:169-74.

Chinnasri P, Pairojkul C, Jearanaikoon P, Sripa B, Bhudhisawasdi V, Tantimavanich S et al. (2009). Preferentially different mechanisms of inactivation of 9p21 gene cluster in liver fluke-related cholangiocarcinoma. Human pathology. 40(6):817-26.

Endo I, Gonen M, Yopp AC, Dalal KM, Zhou Q, Klimstra D, et al (2008). Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. Annals of surgery 248(1),84-96.

Jinawath N, Chamgramol Y, Furukawa Y, Obama K, Tsunoda T, Sripa B et al. (2006). Comparison of gene expression profiles between Opisthorchis viverrini and non-Opisthorchis viverrini associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology. 44(4):1025-38.

Jongsuksuntigul P, Imsomboon T. (2003) Opithorchiasis control in Thailand. Acta Trop. 88, 229-232.

Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. (2012). Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. Gut.;61(12):1657-69.

Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W et al. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Nat genetics. 44(6):690-3.

Sripa B, Pairojkul C. (2008) Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. Curr Opin Gastroenterol 24:349-356.

Tsuda H, Satarug S, Bhudhisawasdi V, Kihana T, Sugimura T, Hirohashi S. (1992). Cholangiocarcinomas in Japanese and Thai patients: difference in etiology and incidence of point mutation of the c-Ki-ras proto-oncogene. Molecular carcinogenesis. 6(4):266-9.

Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A et al. (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. The New England journal of medicine. 362(14):1273-81.

Vatanasapt V, Uttaravichien T, Mairiang EO, Pairojkul C, Chartbanchachai W, Haswell-Elkins M. (1990). Cholangiocarcinoma in north-east Thailand. Lancet. 335(8681):116-7.

<u>แผนงานวิจัยที่ 1 มุ่งเป้าที่กระบวนการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation)</u>

Glycosylation เป็นกระบวนการที่เกิดหลังการสังเคราะห์โปรตีนโดยการเติมหมู่น้ำตาลให้กับโปรตีนที่กรดอะมิโนจำเพาะ หมู่น้ำตาลบนโปรตีนมีบทบาทสำคัญต่อความจำเพาะของโมเลกุลและของเซลล์ โดยเฉพาะโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ระบบหมู่เลือด, membrane receptors, adhesion molecules และโปรตีนในน้ำคัดหลั่ง (secretory proteins) เนื่องจากการสร้างสายน้ำตาลไม่ได้มีแม่พิมพ์กำกับเหมือนการสร้างโปรตีน อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ หากแต่ถูกกำหนดตามสภาวะของเซลล์ ได้แก่ ระดับของเอนไซม์ที่สร้างหรือทำลาย ตัวนำน้ำตาล และสายน้ำตาลที่เป็นตัวรับ เป็นต้น ดังนั้นการสร้างหมู่น้ำตาลจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ซึ่งถูกกำกับจากยีน และสะท้อนสภาวะของเซลล์ ณ ขณะหนึ่ง ๆได้ ดังนั้นจึงมีการนำความจำเพาะของหมู่น้ำตาลมาใช้เป็นตัวบ่งชี้พยาธิสภาพของเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะได้ มีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่พบการเปลี่ยนแปลงของหมู่น้ำตาล glycan บนโปรตีนหลายชนิดที่สัมพันธ์กับภาวะมะเร็ง ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะมะเร็งหรือเป็นเป้าหมายในการรักษา

แผนงานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่ถูกเติมน้ำตาล GlcNAc และ fucose ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยวิธี lectin histochemistry และศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation และ fucosylation ต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้งค้นหาโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วยกระบวนการ O-GlcNAcylation และ fucosylation ที่มีสัมพันธ์กับการพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งคาดว่าจะเป็นเป้าหมายในการยับยั้งการพัฒนาการของมะเร็งท่อน้ำดีได้ในอนาคต ในแผนงานนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกศึกษากระบวนการ Glycosylation ในมะเร็งท่อน้ำดี แบ่งเป็น 3 โครงการย่อย ได้แก่ O-GlcNAcylation GalNAcylation และ Fucosylation

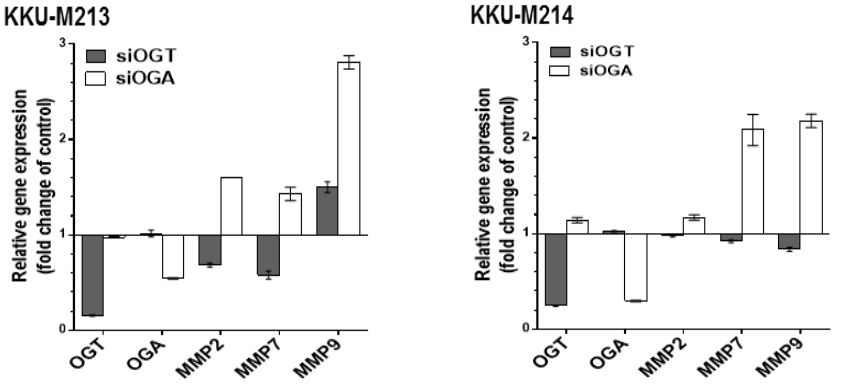
<u>โครงการที่ 1 บทบาทของ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี</u>

O-GlcNAcylation เป็นกระบวนการดัดแปลงโปรตีนโดยเติม O-GlcNAc เข้าที่ hydroxyl group ของกรดอะมิโน Serine หรือ Threonine ซึ่งควบคุมด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) และ β-N-acetylglucosaminidase (OGA) การศึกษา O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า การเพิ่มขึ้นของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีผลสอดคล้องกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ OGT และการแสดงออกที่ลดลงของ OGA เมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกที่พบในเซลล์ท่อทางเดินน้ำดีปกติ กระบวนการ O-GlcNAcylation มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วย

1.1 การเพิ่มกระบวนการ O-GlcNAcylation ส่งเสริมการเคลื่อนที่และแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยการกระตุ้นการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-ΚB

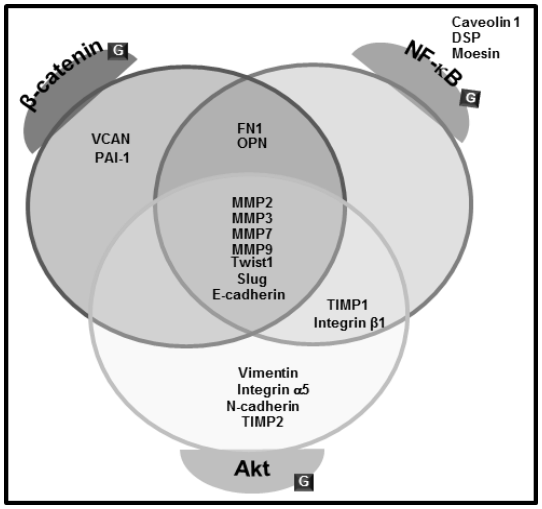
โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ต่อความรุนแรงของโรคมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการลดระดับ O-GlcNAcylation ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 และ KKU-

M214 ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ OGT และ OGA โดย siRNA พบว่าการแสดงออกของ OGT สัมพันธ์โดยตรงกับระดับ O-GlcNAcylation และความสามารถในการเคลื่อนที่ (migration) และการรุกราน (invasion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน 20 ยีนที่สัมพันธ์กับการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์ พบว่ามีเพียง 3 ยีน ได้แก่ *MMP2, MMP7* และ *MMP9* ที่มีการแสดงออกสัมพันธ์กับคุณลักษณะของเซลล์กล่าวคือ แสดงออกมากขึ้นในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ OGP เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่และการรุกรานที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1-1



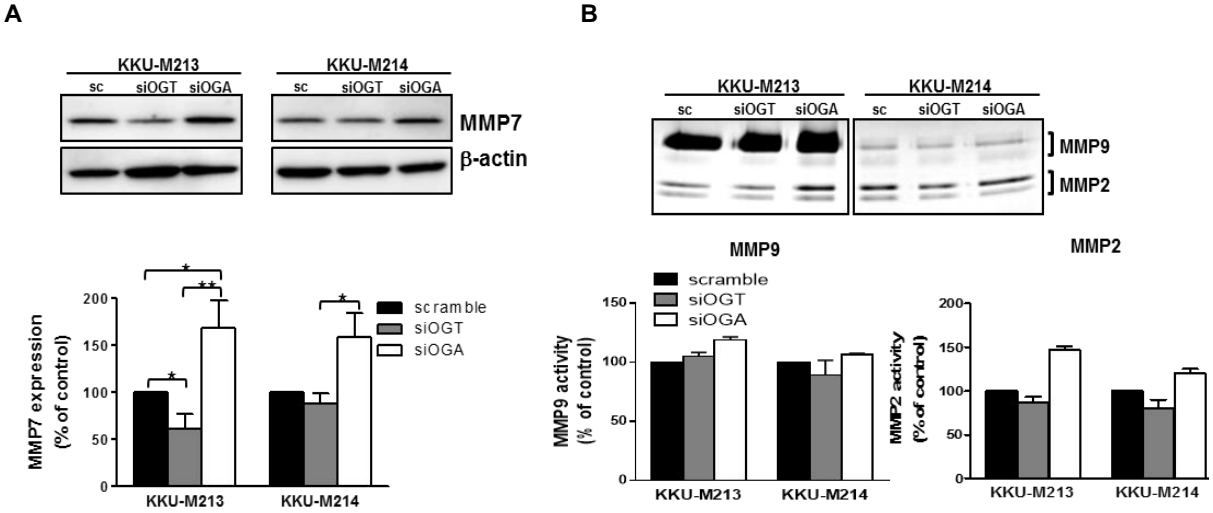
<u>รูปที่ 1-1</u> การแสดงออกของยีน 3 ยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับปริมาณ OGP และการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง KKU-M213 และ KKU-M214

จากนั้นได้ทำการศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้ง 20 ยีนที่ตรวจวัดการแสดงออก พบว่าการแสดงออกของยีนจำนวน 17 ยีนอยู่ภายใต้การกำกับของโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ β-catenin, NF-ĸB และ Akt (รูปที่ 1-2) โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีการทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อถูก O-GlcNAcylation



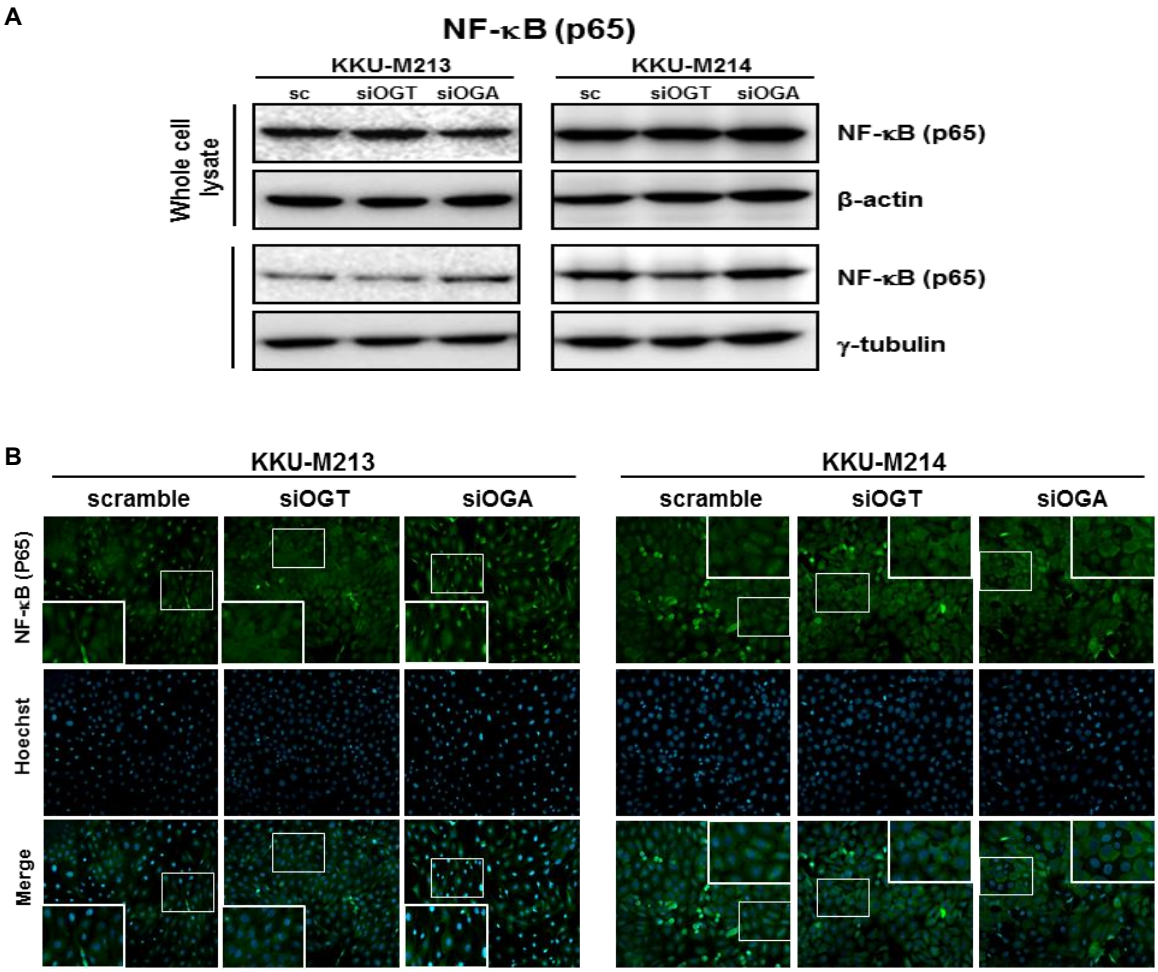
<u>รูปที่ 1-2</u> แสดงการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้ง 20 ยีนที่ตรวจวัด พบว่ายีน 3 ยีน ได้แก่ *MMP2, MMP7* และ *MMP9* ที่การเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับระดับ OGP และคุณลักษณะของเซลล์สัมพันธ์กับการเกิด O-GlcNAcylation ของโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ β-catenin, NF-ĸB และ Akt

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดระดับของโปรตีนที่สัมพันธ์กับภาวะรุกรานของเซลล์มะเร็งคือ MMP2, MMP7 และ MMP9 โดยตรวจวัดระดับ MMP7 ด้วยวิธี western blot และตรวจการทำงานของ MMP2 และ MMP9 ด้วยวิธี gelatin zymography ในเซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ OGT หรือ OGA ด้วย siRNA พบว่าการแสดงออกของโปรตีน MMP7 และการทำงานของโปรตีน MMP2 และ MMP9 สัมพันธ์กับการแสดงออกของเอนไซม์ OGT หรือ OGA หรือคือระดับ O-GlcNAcylation ของเซลล์นั่นเอง (รูปที่ 1-3)



<u>รูปที่ 1-3</u> ปริมาณโปรตีน MMP7 (A) และการทำงานของโปรตีน MMP2 และ MMP9 (B) ตรวจวัดด้วยวิธี western blot และ gelatin zymography พบว่าระดับสัมพันธ์กับการแสดงออกของเอนไซม์ OGT หรือ OGA

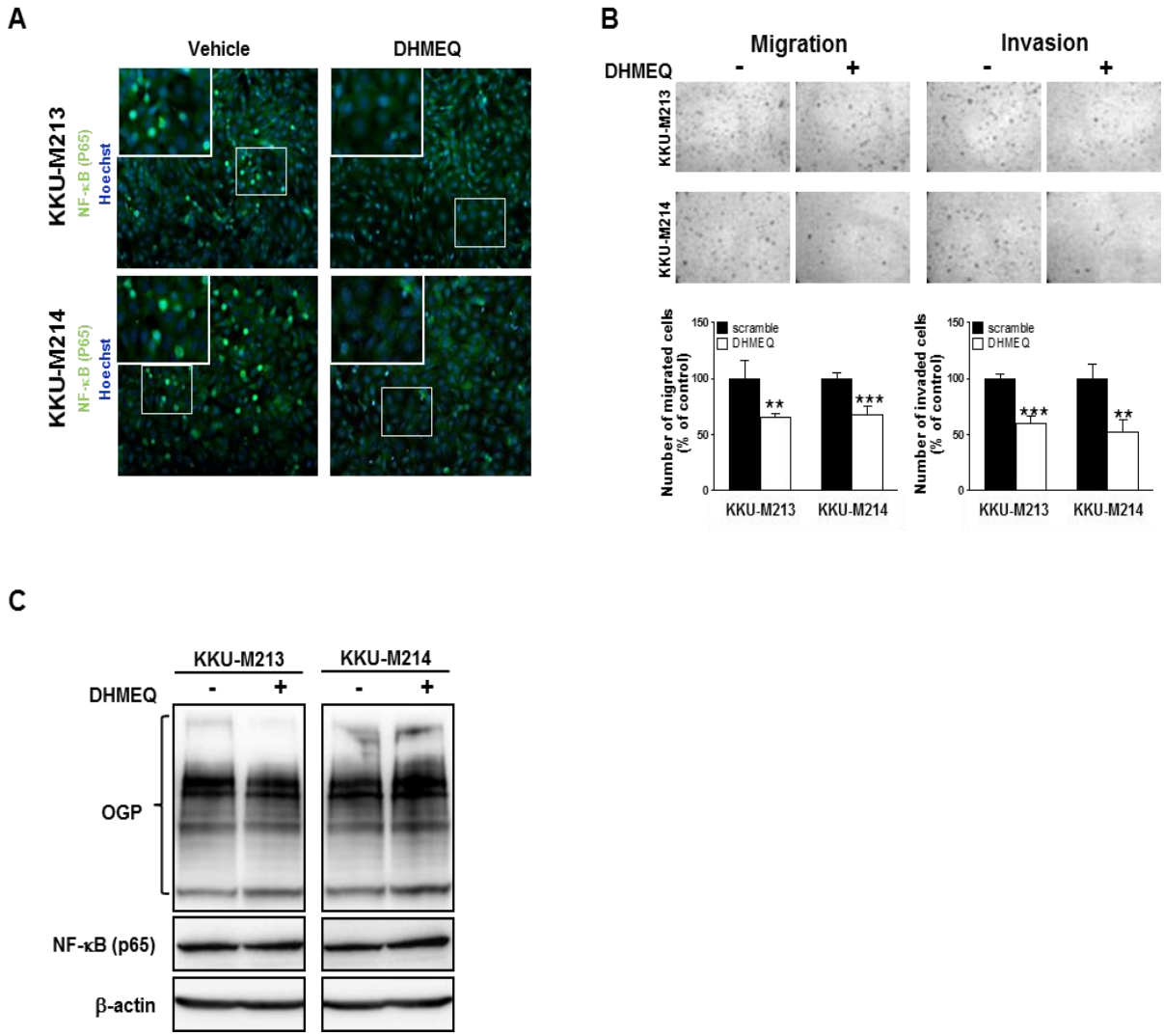
แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MMP2, MMP7 และ MMP9 อาจจะเกิดจากการกระตุ้นของโปรตีน β-catenin, NF-ΚB หรือ Akt แต่ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยมุ่งเป้าที่โปรตีน NF-ΚB เนื่องจากผลวิจัยของคณะผู้วิจัยที่รายงานก่อนหน้านี้ พบว่าเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีน NF-ΚB และระดับการแสดงออกของ NF-ΚB สัมพันธ์กับความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วย ในการศึกษานี้พบว่าเมื่อปรับระดับ O-GlcNAcylation ของเซลล์โดยการลดการแสดงออกของเอนไซม์ OGT และ OGA ด้วย siRNA มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของ NF-ΚB ดังแสดงในรูปที่ 1-4



<u>รูปที่ 1-4</u> การเปลี่ยนแปลง localization ของโปรตีน NF-ΚB เมื่อเกิด O-GlcNAcylation ของโปรตีนที่แตกต่างกัน พบว่าการเกิด O-GlcNAcylationไม่มีผลต่อระดับโปรตีน NF-ΚB แต่มีผลต่อการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี western blot (A) และ immunofluorescent staining (B)

เพื่อยืนยันผลว่า O-GlcNAcylation มีผลต่อการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB คณะผู้วิจัยได้ทำการยับยั้งการเคลื่อนตัวเข้านิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB ด้วย specific inhibitor, DHMEQ พบว่าได้ผลเช่นเดียวกับการยับยั้งการทำงานของ OGT หรือการลดระดับ OGP ดังแสดงในรูปที่ 1-5 จึงสรุปได้ว่าบทบาทของการเกิด O-GlcNAcylation ที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีนั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ O-GlcNAcylation ที่โปรตีน NF-ΚB ส่งผลให้โปรตีน NF-ΚB เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้มากขึ้นและ

กระตุ้นการแสดงออกของยีน *MMP2, MMP7* และ *MMP9* หากยับยั้งการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB ได้ก็จะยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

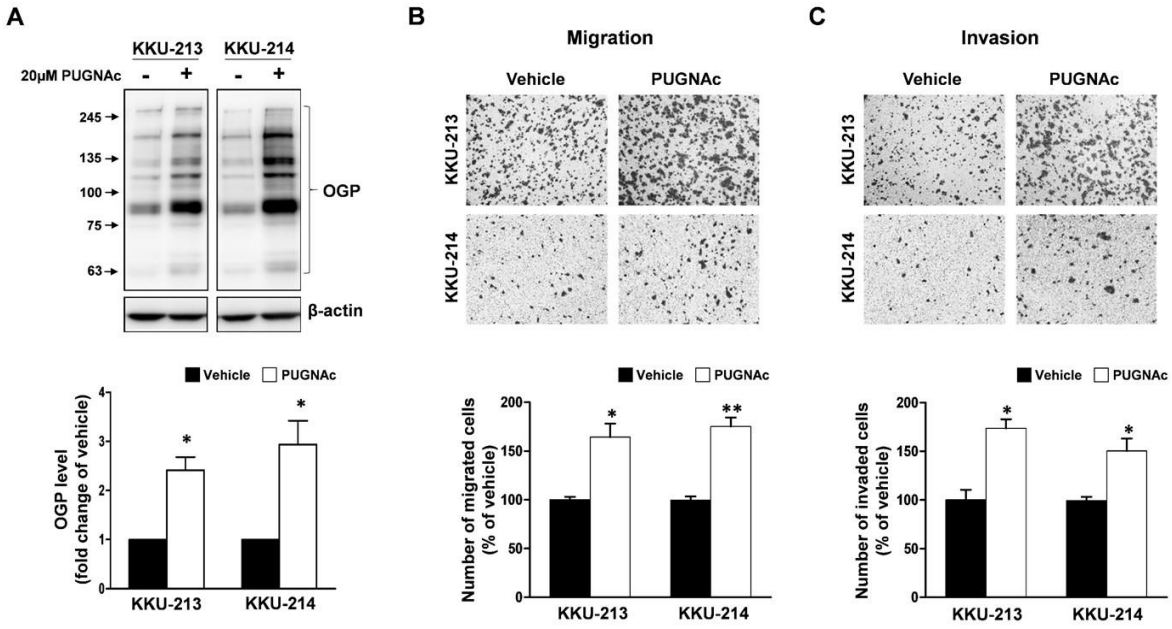


รูปที่ 1-5 บทบาทของการเคลื่อนที่ของโปรตีน NF-ΚB ต่อการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์ (A) DHMEQ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB, (B) ผลของการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB ทำให้ลดการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง, (C) DHMEQ ไม่มีผลต่อ O-GlcNAcylation ของเซลล์และ NF-ΚB

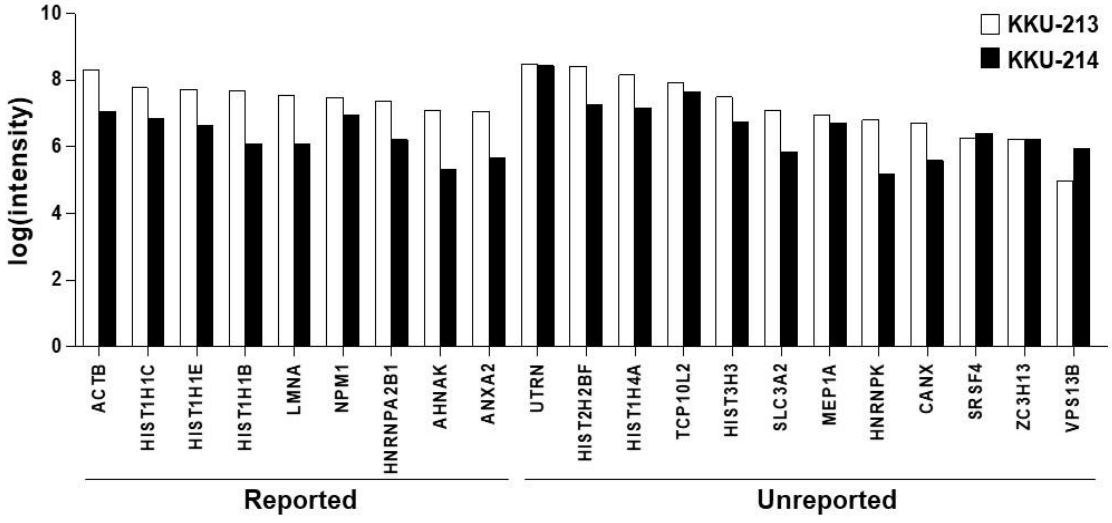
1.2 Mass spectrometry ระบุโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วยกระบวนการ O-GlcNAcylation ที่ไม่มีรายงานมาก่อน และสัมพันธ์กับการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากผลการศึกษาใน 1.1 พบว่า การยับยั้งการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของโปรตีน NF-ΚB มีผลลดการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีน้อยกว่าการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ OGT บ่งชี้ว่ากลไกที่พบเป็นเพียงส่วนหนึ่งและยังมีโปรตีนอื่นที่อยู่ภายใต้การกำกับของ กระบวนการ O-GlcNAcylation ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ตรวจหาโปรตีนอื่น ๆที่ถูกดัดแปลงด้วยกระบวนการ O-GlcNAcylation และสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง คณะผู้วิจัยได้ใช้ PUGNAc (สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ OGA) ในการเพิ่มกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งทำให้การเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มขึ้น (รูปที่ 1-6) และตรวจหาโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ด้วยกระบวนการ Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System การวิเคราะห์ผลด้วย mass spectrometry พบว่าโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ส่วนใหญ่พบในนิวเคลียสและไซโตพลาซึมของเซลล์ โดยมีโปรตีนที่คาดว่าถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนจำนวน 12 โปรตีน และพบ 4 โปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain) member 2, meprin A subunit alpha, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K และ calnexin (รูปที่ 1-7 และ ตารางที่ 1-1)

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือก heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNPK) เพื่อทำการศึกษาในเชิงลึกต่อไป โดยทำการยืนยันการเกิด O-GlcNAcylation บนโปรตีน hnRNPK ด้วยวิธี immunoprecipitation และ succinylated Wheat Germ Agglutinin (sWGA) pull-down assay พบว่า hnRNPK ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc จริงและในสภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของ O-GlcNAcylation ภายในเซลล์ hnRNPK จะถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1-8) จากนั้นได้ทำการศึกษาบทบาทของ hnRNPK ต่อการการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยยับยั้งการแสดงออกของ hnRNPK ด้วย siRNA จากนั้นทดสอบการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์ด้วย Boyden chamber assay พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ hnRNPK มีผลให้การเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีลดลง (รูปที่ 1-9) แสดงว่า hnRNPK มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ส่วนบทบาทของ O-GlcNAcylation บน hnRNPK ต่อความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดียังต้องมีการศึกษาต่อไป



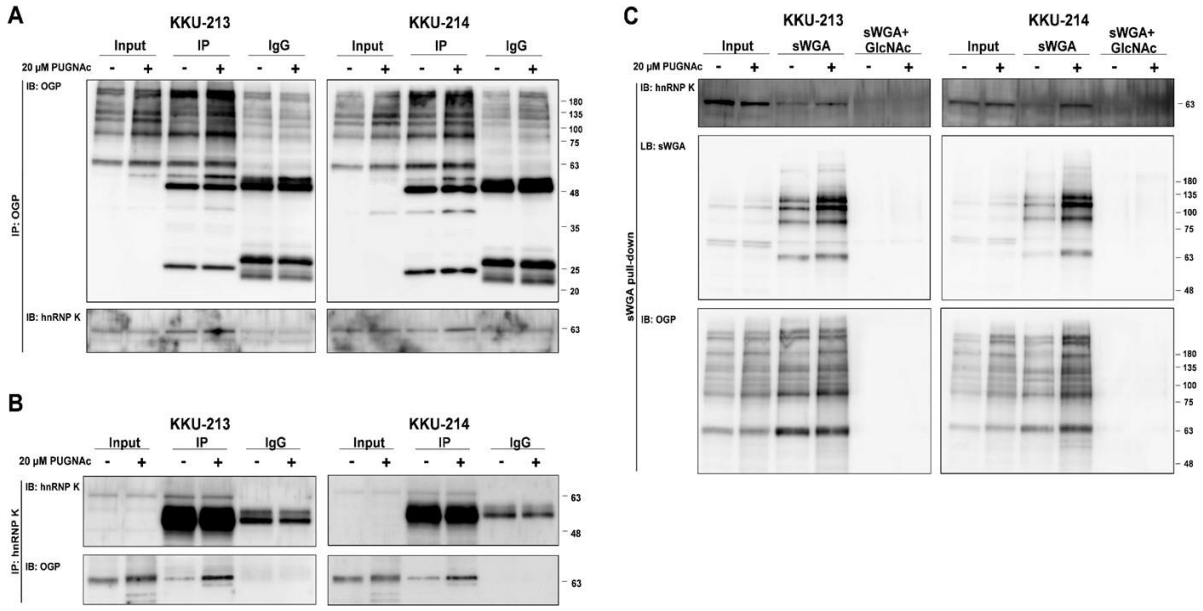
รูปที่ 1-6 การเพิ่มของ O-GlcNAcylation ด้วย PUGNAc เพิ่มการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ให้ PUGNAc กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-213 และ KKU-214) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัด (A) ระดับ O-GlcNAcylation (B) การเคลื่อนที่ และ (C) การรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม



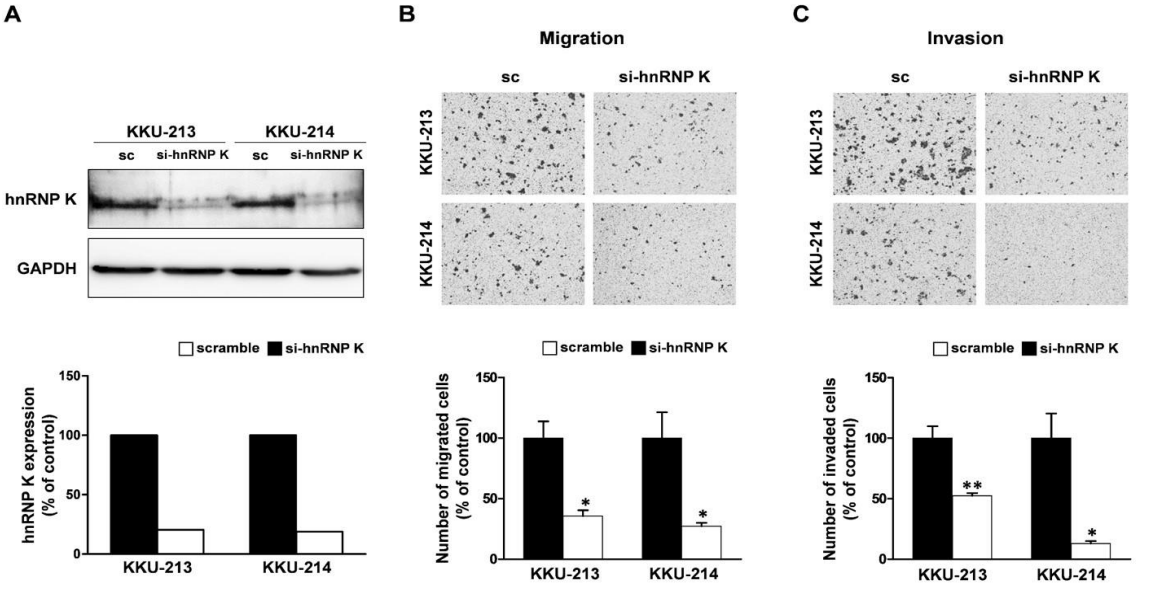
รูปที่ 1-7 โปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยมีรายงานแล้ว 9 โปรตีน และยังไม่มีการรายงานว่ามีการดัดแปลงด้วย O-GlcNAc จำนวน 12 โปรตีน

ตารางที่ 1-1 บทบาทของโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ต่อเซลล์มะเร็ง

UniProt Accession	Gene Name	Protein Description	Function	Reference
P46939	UTRN	utrophin	Proliferation	(Li et al., 2007)
Q5QNW6	HIST2H2BF	histone cluster 2 H2bf	-	-
P62805	HIST1H4A	histone cluster 2 H4a	Proliferation	(Yan-Fang et al., 2015)
B9ZVM9	TCP10L2	T-complex protein 10A homolog 2	Proliferation	(Shen et al., 2015)
Q16695	HIST3H3	histone cluster 3 H3	Proliferation	(Xu et al., 2014)
P08195	SLC3A2	solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 2	Proliferation Migration Invasion	(Fei et al., 2014; Santiago-Gomez et al., 2013; Yang et al., 2007)
Q16819	MEP1A	meprin A subunit alpha	Migration Invasion	(Lottaz et al., 1999; Minder et al., 2012)
P61978	HNRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Proliferation Migration Invasion	(Chung et al., 2014; Eder et al., 2015; Gao et al., 2013; Otoshi et al., 2015)
P27824	CANX	calnexin	Carcinogenesis Metastasis	(Dissemond et al., 2004; Kobayashi et al., 2015)
Q08170	SRSF4	serine/arginine-rich splicing factor 4	Proliferation	(Gabriel et al., 2015)
Q5T200	ZC3H13	zinc finger CCCH-type containing 13	-	-
Q7Z7G8	VPS13B	vacuolar protein sorting 13 homolog B	-	-



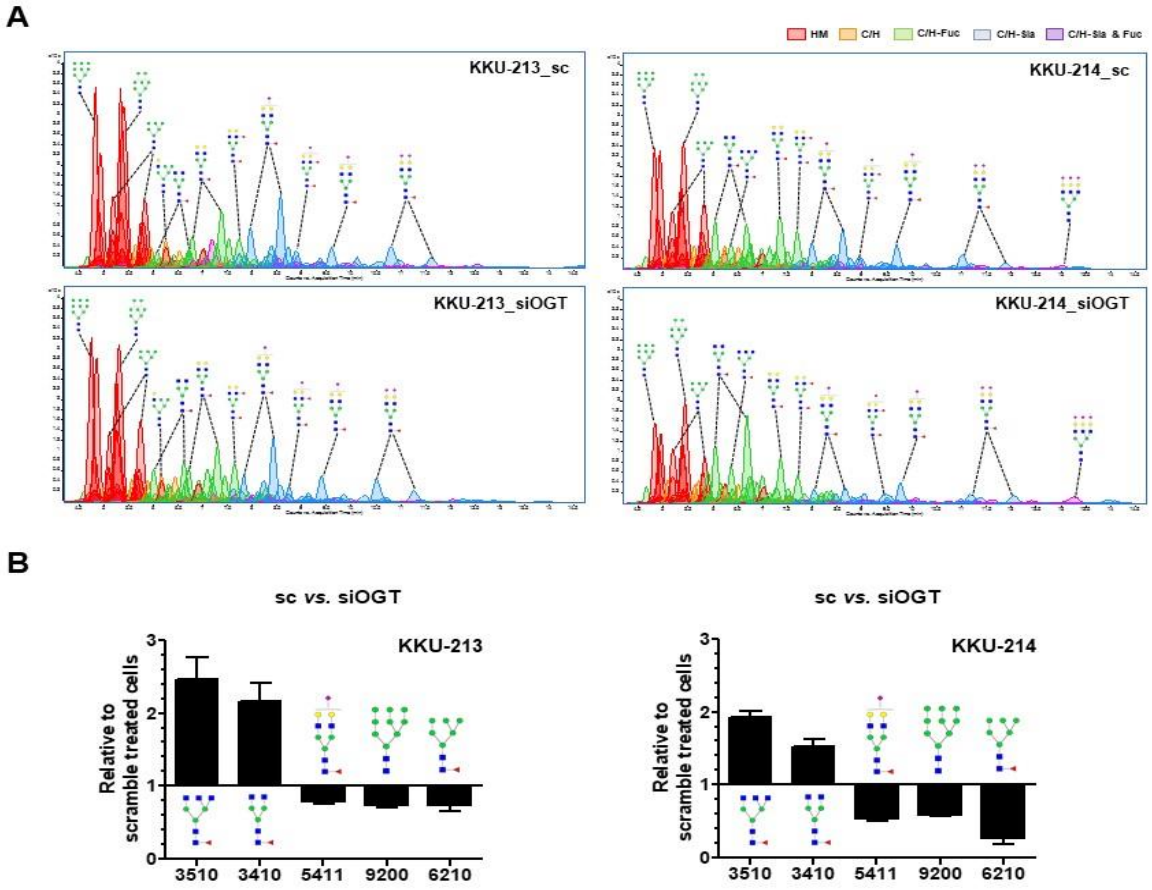
รูปที่ 1-8 โปรตีน hnRNPK ถูกดัดแปลงด้วย O-GlcNAc ยืนยันด้วย immunoprecipitation ต่อ (A) anti-O-GlcNAc (B) anti-hnRNP K และ sWGA pull-down assay, (C) ยืนยันความจำเพาะของ sWGA ต่อ O-GlcNAc โดยใช้ GlcNAc inhibition test



รูปที่ 1-9 บทบาทของ hnRNPK ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกของ hnRNPK ถูกยับยั้งด้วย siRNA จากนั้นทดสอบ (A) ระดับการแสดงออกของ hnRNPK, (B) การเคลื่อนที่ และ (C) การรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม

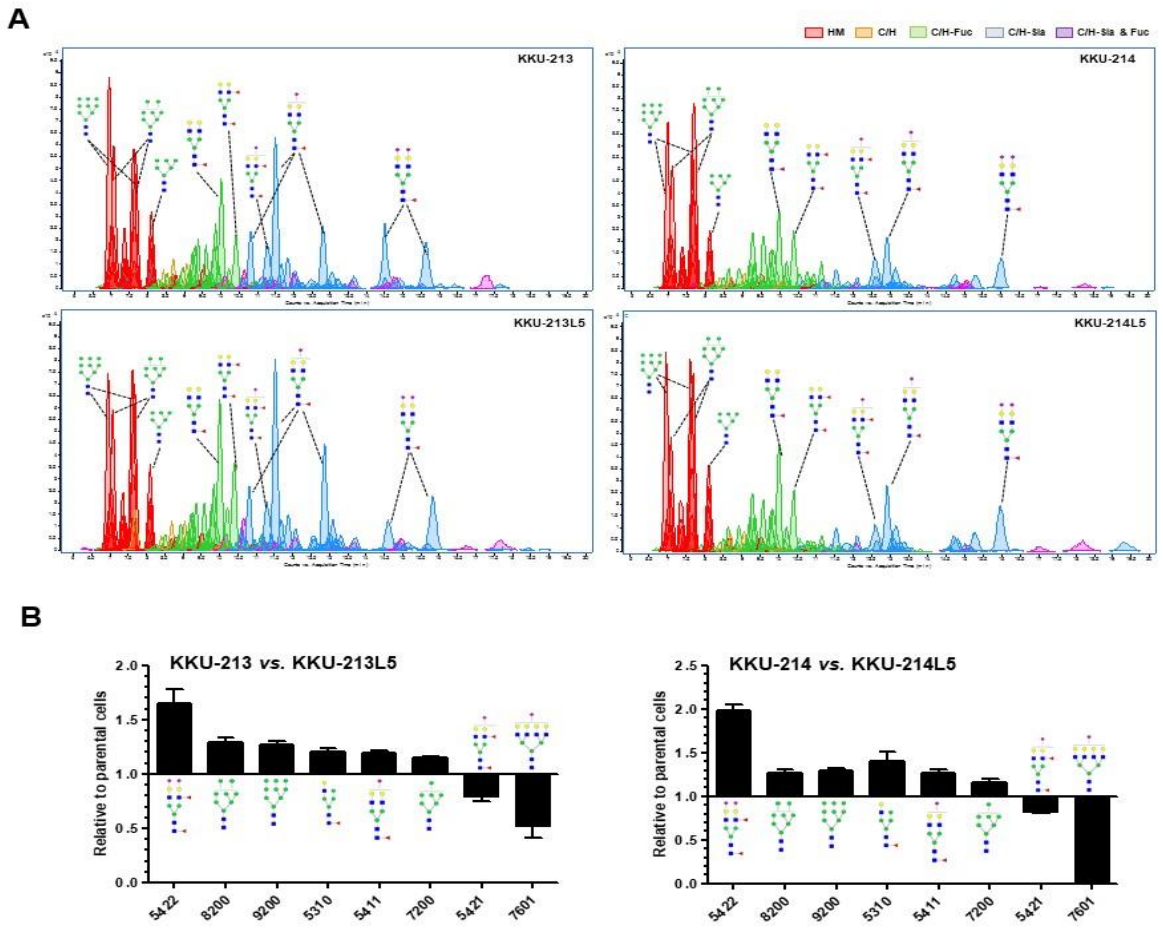
1.3 O-GlcNAcylation กำกับการแสดงออกของ N-linked glycosylation ของไกลโคโปนตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ที่สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดีผ่าน FOXO3 และ MAN1A1

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของ O-GlcNAcylation ต่อการแสดงออกของ N-linked glycosylation ของไกลโคโปนตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยตรวจวิเคราะห์ N-glycan บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย HPLC-Chip/Time-of-Flight (Chip/TOF) MS เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ให้ siOGT และ negative control siRNA พบว่า มี 5 N-glycans ใน KKU-213 และ KKU-214 เปลี่ยนแปลงไปหลังจากยับยั้งการแสดงออกของ OGT โดยที่ 3 ชนิดมีการแสดงออกที่ลดลง ได้แก่ $Hex_9HexNAc_2$, $Hex_6HexNAc_2Fuc$, และ $Hex_5HexNAc_4FucNeuAc$ และอีก 2 ชนิดที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ $Hex_3HexNAc_5Fuc$ และ $Hex_3HexNAc_4Fuc$ (รูปที่ 1-10) แสดงว่า N-glycans 5 ชนิดนี้ถูกควบคุมการแสดงออกได้ด้วย O-GlcNAcylation



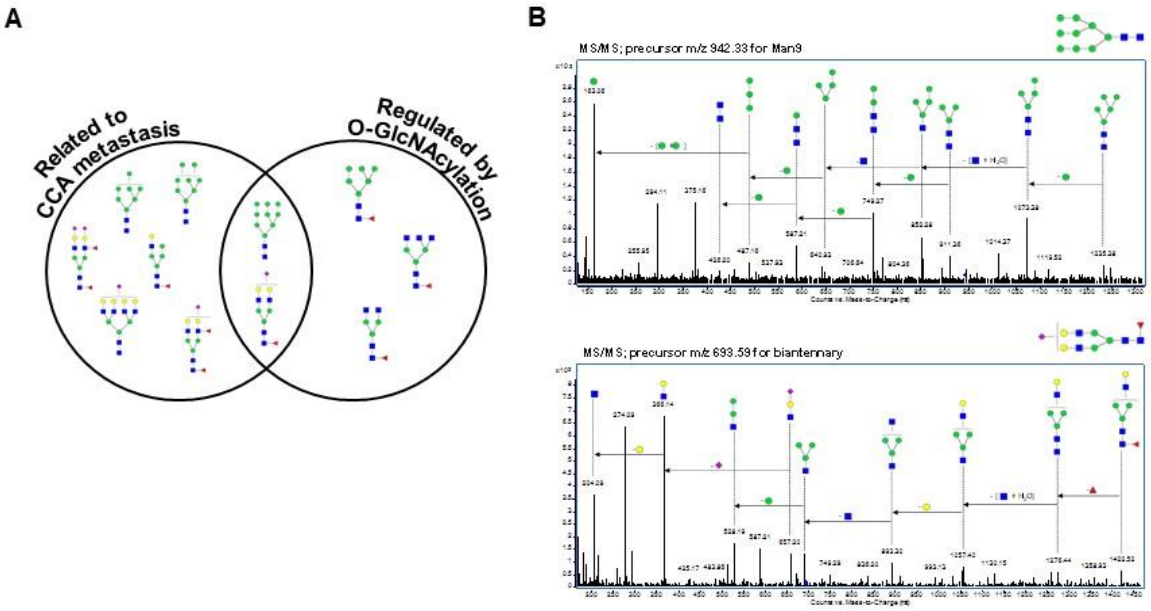
<u>รูปที่ 1-10</u> เปรียบเทียบ N-glycans profile ระหว่าง siOGT และ negative control siRNA แยกเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วย ultracentrifugation และใช้ PNGase F สกัด N-glycans ออกจากโปรตีน จากนั้นทำการตรวจหา N-glycan ด้วยวิธี HPLC-Chip/Time-of-Flight (Chip/TOF) MS (A) กราฟแสดง N-glycans profile (B) กราฟแสดง N-glycans ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากยับยั้งการแสดงออกของ OGT

เพื่อทดสอบหา N-glycans ที่มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบ N-glycans บนโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสามารถในการแพร่กระจายแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ต้นแบบ (KKU-M213 และ KKU-M214) และ highly metastatic cells (KKU-M213L5 และ KKU-M214L5) พบว่า มี N-glycans 8 ชนิดที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ต้นแบบและ highly metastatic cells โดยที่ 6 ชนิดมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นใน highly metastatic cells ได้แก่ $Hex_5HexNAc_4Fuc_2NeuAc_2$, $Hex_8HexNAc_2$, $Hex_9HexNAc_2$, $Hex_5HexNAc_3Fuc_1$, $Hex_5HexNAc_4FucNeuAc$ และ $Hex_7HexNAc_2$ และอีก 2 ชนิดลดลงใน highly metastatic cells ได้แก่ $Hex_5HexNAc_4Fuc_2NeuAc$ และ $Hex_7HexNAc_6NeuAc$ (รูปที่ 1-11) แสดงว่า N-glycans 8 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี



<u>รูปที่ 1-11</u> เปรียบเทียบ N-glycans profile ระหว่างเซลล์ต้นแบบ (parental) และ highly metastatic cells ตรวจวัดการแสดงออกของ N-glycan บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี HPLC-Chip/Time-of-Flight (Chip/TOF) MS (A) กราฟแสดง N-glycans profile (B) กราฟแสดง N-glycans ที่แตกต่างกันระหว่าง parental และ highly metastatic cells

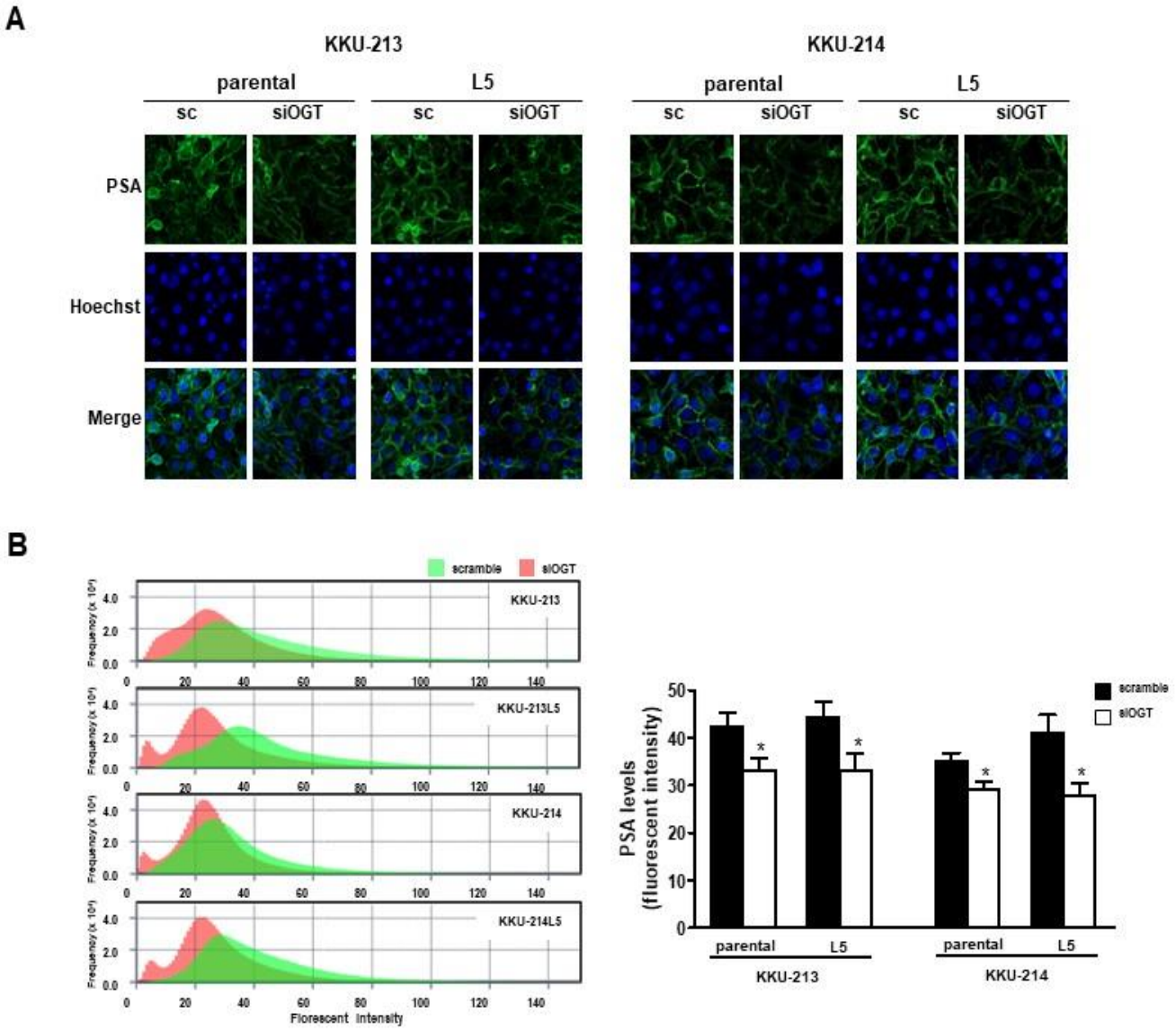
เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล N-glycan ทั้ง 2 ชุดข้างต้นร่วมกัน พบว่ามี N-glycan 2 ชนิดที่มีความสัมพันธ์ทั้งกับระดับ O-GlcNAcylation และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ high mannose type N-glycan ($Hex_9HexNAc_2$) และ complex type N-glycan ($Hex_5HexNAc_4FucNeuAc$) ซึ่ง N-glycans ทั้ง 2 ชนิดนี้ ได้ตรวจสอบยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค HPLC-Chip/Time-of-Flight (Chip/TOF) MS/MS (รูปที่ 1-12)



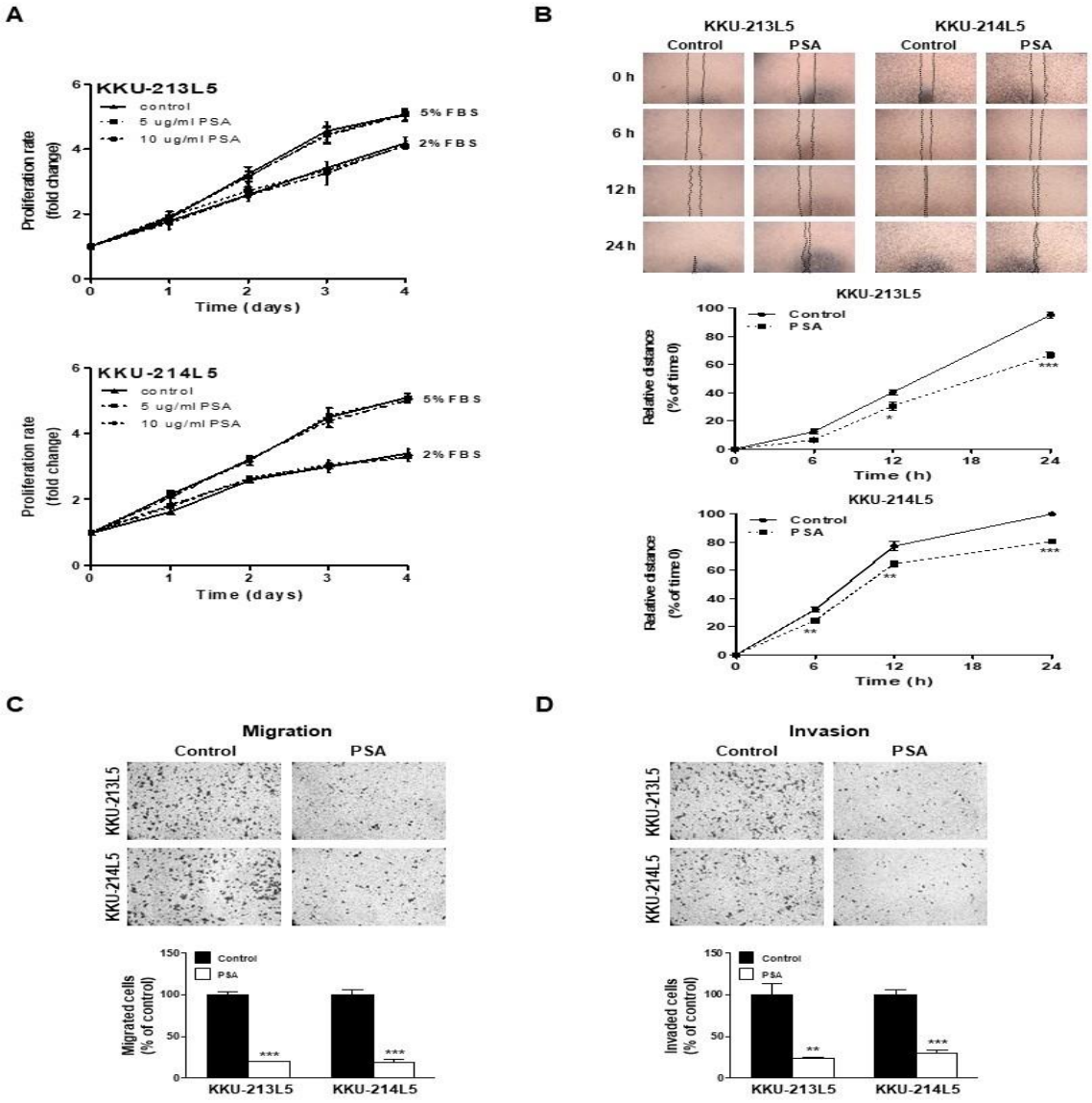
<u>รูปที่ 1-12</u> N-glycans ที่สัมพันธ์กับระดับ O-GlcNAcylation และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) Venn diagram แสดงความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 ชุด (B) MS/MS spectra ยืนยังโครงสร้าง N-glycans คือ high mannose type (*m/z* 942.33) และ biantennary complex type (*m/z* 693.59)

คณะผู้วิจัยได้เลือก high mannose type N-glycan เพื่อทำการศึกษาต่อในเชิงลึก เนื่องจากเป็น N-glycan ที่แสดงออกเด่นชัดในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยตรวจยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ O-GlcNAcylation และ high mannose type N-glycan ในเซลล์ที่ยับยั้งการแสดงออกของ OGT ด้วยการย้อม *Pisum Sativum* Agglutinin (PSA) ซึ่งเป็น lectin ที่จำเพาะกับ mannose พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ OGT เป็นผลให้ระดับ mannosylated N-glycan ลดลงทั้งในเซลล์ต้นแบบและ highly metastatic cells (รูปที่ 1-13) แสดงว่า O-GlcNAcylation กำกับการแสดงออกของ high mannose type N-glycan ที่เยื่อหุ้มเซลล์จริง จากนั้นจึงทำการศึกษาบทบาทของ high mannose type N-glycan ต่อความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้ PSA ในการบดบังการทำงานของ high mannose type N-glycan บนเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าการบดบัง high mannose type N-glycan บน

เยื่อหุ้มเซลล์ด้วย PSA สามารถลดของการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (รูปที่ 1-14)



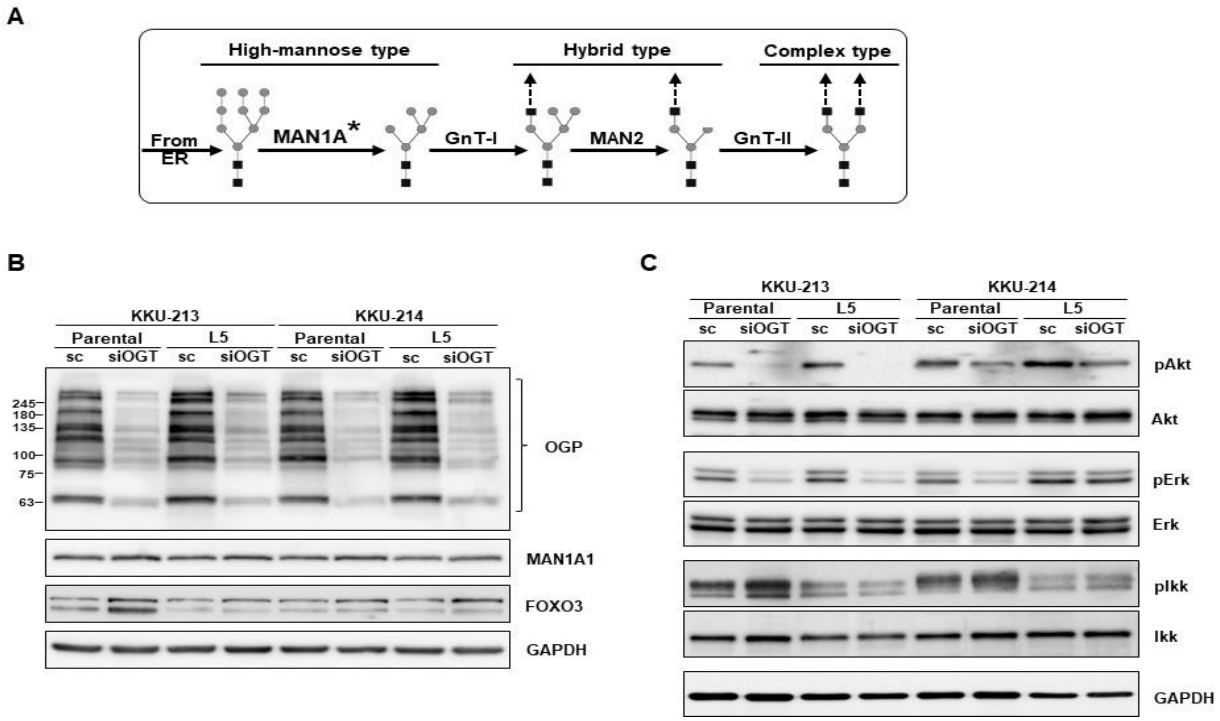
<u>รูปที่ 1-13</u> ระดับของ high mannose type N-glycan สัมพันธ์กับระดับ O-GlcNAcylation (A) การย้อม PSA-lectin cytofluorescence (B) กราฟแสดงระดับสัญญาณของ PSA เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ยับยั้งการแสดงออกของ OGT กับเซลล์กลุ่มควบคุม



<u>รูปที่ 1-14</u> บทบาทของ high mannose type N-glycan ต่อความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี *Pisum Sativum* Agglutinin (PSA) ซึ่งเป็น lectin ที่จำเพาะกับ mannose ถูกนำมาใช้ในการศึกษาบทบาทของ high mannose type N-glycan ทดสอบ (A) การเจริญเติบโต (B) การเคลื่อนที่โดย wound healing assay (C) การเคลื่อนที่ (D) การรุกราน โดย Boyden chamber assay ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ให้ PSA กับเซลล์ควบคุม

เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการ O-GlcNAcylation กับ high mannose type N-glycan เป็นข้อสังเกตที่เป็นรายงานแรกของโลก จึงได้ศึกษาการกลไกการควบคุมการแสดงออกของ high mannose type N-glycan โดย O-GlcNAcylation ในเชิงลึกต่อ เนื่องจาก high mannose type N-glycan ถูกสร้างจาก endoplasmic reticulum และส่งเข้า Golgi apparatus เพื่อที่จะสร้างเป็น hybrid และ complex type N-glycans ตามลำดับ โดยที่

high mannose type N-glycan จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม α1,2-mannosidases เช่น α1,2-mannosidase IA (MAN1A1) จาก $Hex_9HexNAc_2$ เป็น $Hex_5HexNAc_2$ คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าการที่พบ Hex9HexNAc2 มากอาจเนื่องจากการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ MAN1A1 จึงได้ทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ MAN1A1 หลังจากยับยั้งการแสดงออกของ OGT พบว่าการแสดงออกของ MAN1A1 เพิ่มขึ้น แสดงว่า O-GlcNAcylation ที่ลดลงมีผลเพิ่มระดับการแสดงออกของ MAN1A1 เนื่องจากการแสดงออกของ MAN1A1 อยู่ภายใต้การควบคุมของ FOXO3 ซึ่งเป็น transcription factor ของ MAN1A1 จึงได้ทำการทดสอบบทบาทของ O-GlcNAcylation ต่อการแสดงออกของ FOXO3 พบว่าการแสดงออกของ FOXO3 เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ถูกยับยั้ง OGT เช่นเดียวกับ MAN1A1 จึงสรุปได้ว่า การควบคุมการแสดงออกของ high mannose type N-glycan โดย O-GlcNAcylation ส่วนหนึ่งผ่านการควบคุมการแสดงออกของ FOXO3 และ MAN1A1 (รูปที่ 1-15)

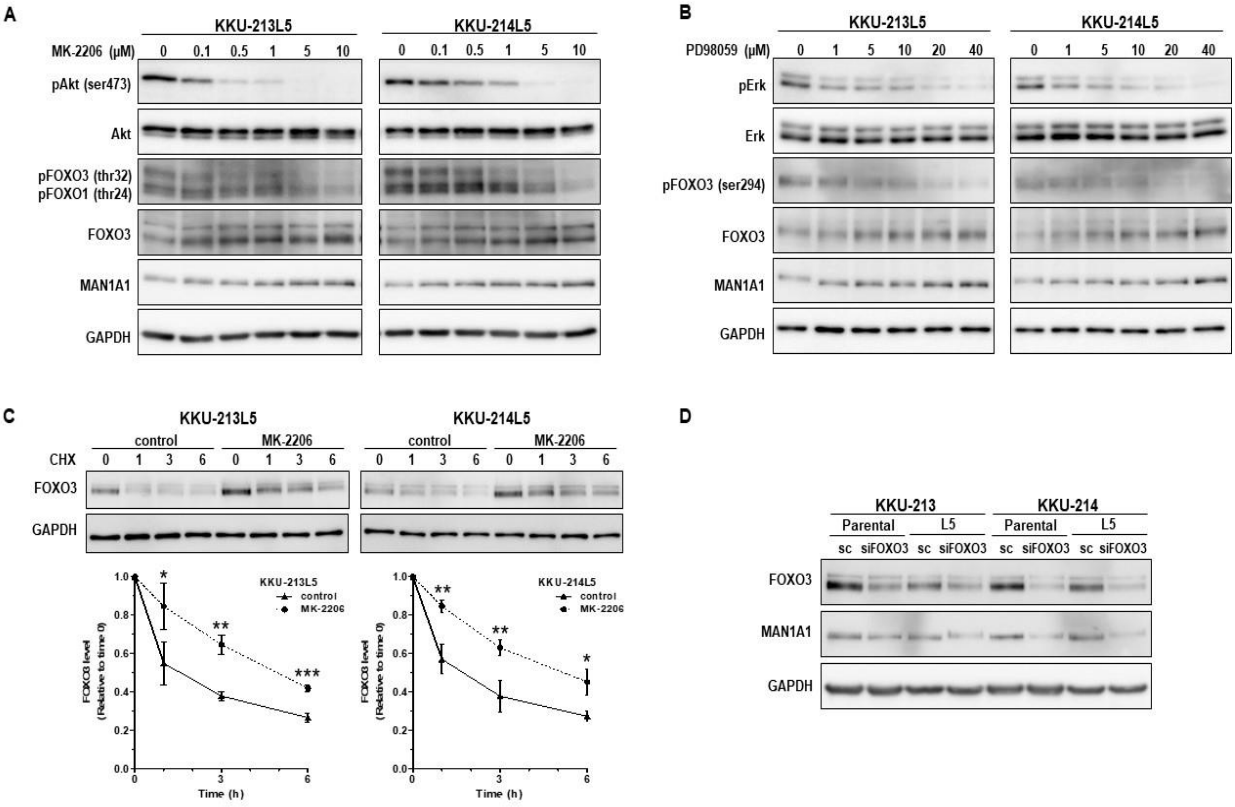


<u>รูปที่ 1-15</u> O-GlcNAcylation ควบคุมระดับของ high mannose type N-glycan ผ่านการควบคุมการแสดงออกของ FOXO3 และ MAN1A1 (A) ภาพการสร้าง N-glycan ใน Golgi apparatus (B) การแสดงออกของ MAN1A1 และ FOXO3 หลังจากยับยั้งการแสดงออกของ OGT (C) การกระตุ้นการทำงานของ Akt Erk และ Ikk หลังจากยับยั้งการแสดงออกของ OGT

เนื่องจากการแสดงออกของ FOXO3 ถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ kinase 3 ชนิด ได้แก่ Akt, Erk และ Ikk ซึ่งอยู่ภายใต้การกำกับโดยกระบวนการ O-GlcNAcylation ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบว่าการควบคุมการ

แสดงออกของ FOXO3 โดย O-GlcNAcylation ผ่านเอนไซม์ kinase ชนิดใด พบว่าการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Akt และ Erk ลดลงหลังจากยับยั้งการแสดงออกของ OGT ขณะที่การกระตุ้นการทำงานของ Ikk ไม่สัมพันธ์กับระดับ O-GlcNAcylation (รูปที่ 1-15) จากข้อมูลนี้สรุปได้ว่าการควบคุมการแสดงออกของ FOXO3 โดย O-GlcNAcylation ผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Akt และ Erk

เนื่องจาก Akt และ Erk มีบทบาทมากมายในเซลล์ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบยืนยันบทบาทของ Akt และ Erk ต่อการแสดงออกของ FOXO3 โดยใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Akt คือ MK-2206 และ Erk คือ PD98059 พบว่าการยับยั้งการทำงานของ Akt และ Erk สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ FOXO3 (pFOXO3) ทำให้ระดับของ FOXO3 เพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันพบการแสดงออกของ MAN1A1 ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเติมหมู่ฟอสเฟตของ FOXO3 อาจมีผลต่อความเสถียรของ FOXO3 จึงได้ทดสอบความเสถียรของ FOXO3 หลังจากยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยใช้ cycloheximide (CHX) พบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ Akt ส่งผลให้ FOXO3 มีความเสถียรมากขึ้น และเมื่อลดการแสดงออกของ FOXO3 โดย siRNA การแสดงออกของ MAN1A1 จะลดลง (รูปที่ 1-16)

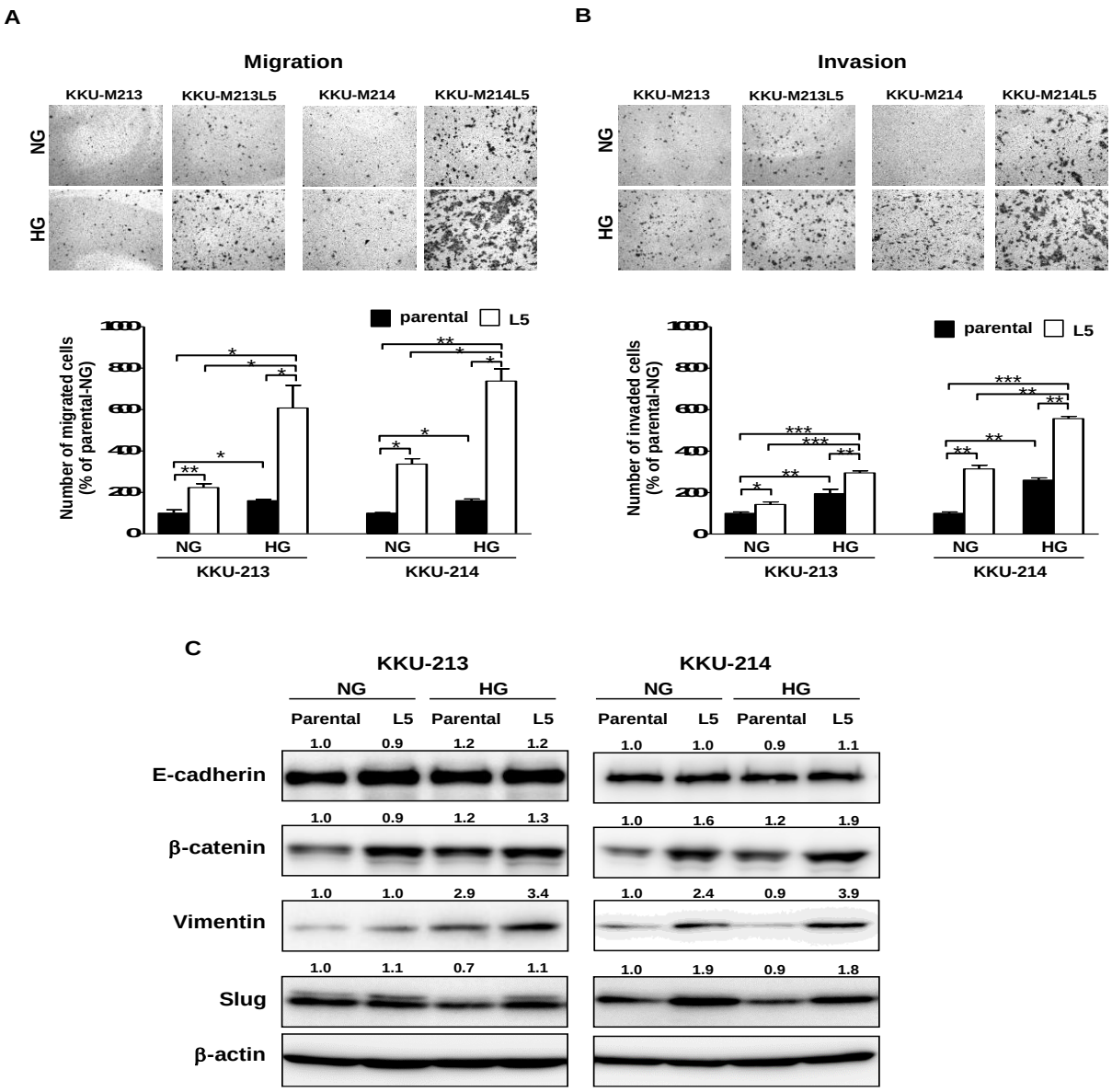


<u>รูปที่ 1-16</u> Akt และ Erk ควบคุมการแสดงออกของ FOXO3 (A) การทำงานของเอนไซม์ Akt ถูกยับยั้งด้วย MK-2206 (B) การทำงานของเอนไซม์ Erk ถูกยับยั้งด้วย PD98059 วัดระดับของ pFOXO3, FOXO3 และ MAN1A1 ด้วย western blot (C) cycloheximide (CHX) ถูกใช้เพื่อทดสอบความเสถียรของ FOXO3 หลังจากยับยั้งการทำงานของ Akt (D) การแสดงออกของ MAN1A1 ในเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของ FOXO3 เทียบกับเซลล์ควบคุม

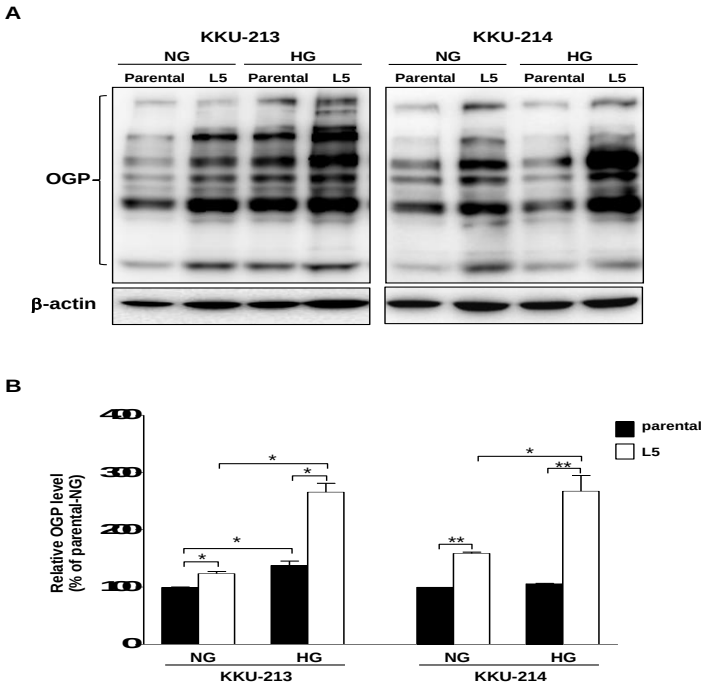
1.4 สภาวะน้ำตาลสูงเพิ่มกระบวนการ O-GlcNAcylation และความสามารถในการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยเพิ่มอัตราเร็วของ Hexosamine pathway และความเสถียรของ vimentin

นอกจาก O-GlcNAcylation แล้ว ระดับกลูโคสยังสัมพันธ์กับการการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยจึงศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างกลูโคสกับ O-GlcNAcylation ต่อการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสามารถในการแพร่กระจายแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ต้นแบบ (KKU-213 และ KKU-214) และเซลล์ที่มีการแพร่ลุกลามสูง (KKU-213L5 และ KKU-214L5, (เซลล์ L5) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสปกติ (NG) และ น้ำตาลกลูโคสสูง (HG) พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เลี้ยงในภาวะกลูโคสสูงสามารถเคลื่อนที่และแพร่รุกรานได้สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะกลูโคสปกติ โดยเฉพาะใน L5 เซลล์ ขณะที่ระดับกลูโคสไม่มีผลต่อ EMT markers ได้แก่ E-cadherin, β-catenin, และ snail ยกเว้น vimentin ที่พบว่าเปลี่ยนแปลงไปตามระดับกลูโคส (รูปที่ 1-17) นอกจากนี้ระดับกลูโคสสามารถกระตุ้น O-GlcNAcylation ได้และเห็นผลชัดเจนในเซลล์ L5 (รูปที่ 1-18)

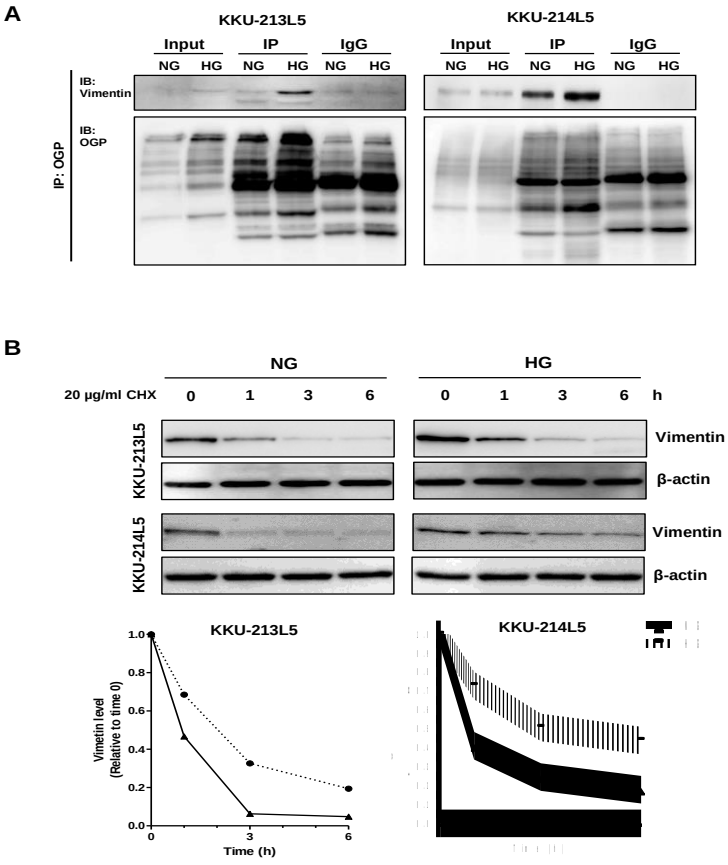
จากผลข้างต้นพบว่าระดับของ O-GlcNAcylation และการแสดงออกของ vimentin เพิ่มขึ้นมากในเซลล์ L5 ที่ตอบสนองต่อสภาวะกลูโคสสูง คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ O-GlcNAcylation กับการแสดงออกของ vimentin โดยทำการตรวจหา O-GlcNAc บน vimentin ด้วยเทคนิค immunoprecipitation พบว่าในสภาวะที่มีกลูโคสสูง vimentin ในเซลล์ L5 จะถูกเติม O-GlcNAc เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1-19) เนื่องจากบทบาทหนึ่งของ O-GlcNAcylation คือเพิ่มหรือลดความเสถียรของโปรตีนที่ถูกเติม O-GlcNAc ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความเสถียรของ vimentin ในเซลล์ L5 ที่เลี้ยงในสภาวะกลูโคสต่ำเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะกลูโคสสูง โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนด้วย cycloheximide และตรวจวัด vimentin ที่เหลือตามเวลา พบว่าความเสถียรของ vimentin ในเซลล์ L5 ที่เลี้ยงในสภาวะกลูโคสสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงสภาวะกลูโคสต่ำ (รูปที่ 1-19) จึงสรุปได้ว่าการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีถูกกระตุ้นได้ด้วยระดับกลูโคส โดยเพิ่มกระบวนการ O-GlcNAcylation และความเสถียรของ vimentin สำหรับกลไกการเพิ่ม O-GlcNAcylation ของ L5 เซลล์ ที่ตอบสนองต่อภาวะกลูโคสสูงยังต้องศึกษาต่อไป



<u>รูปที่ 1-17</u> กลูโคสกระตุ้นการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ร่วมกับการเพิ่มการแสดงออกของ vimentin A) การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งโดยใช้เทคนิค Boyden chamber assay ซึ่งปล่อยให้เซลล์เคลื่อนที่ลงสู่ lower chamber ซึ่งมี chemotactic factor B) การลุกลามของเซลล์มะเร็งจะเคลือบ matrigel ลงบน transwell ก่อนการทดสอบ C) การแสดงออกของ EMT markers ภายใต้สภาวะน้ำตาลต่างกัน ถูกตรวจวัดด้วย western blot

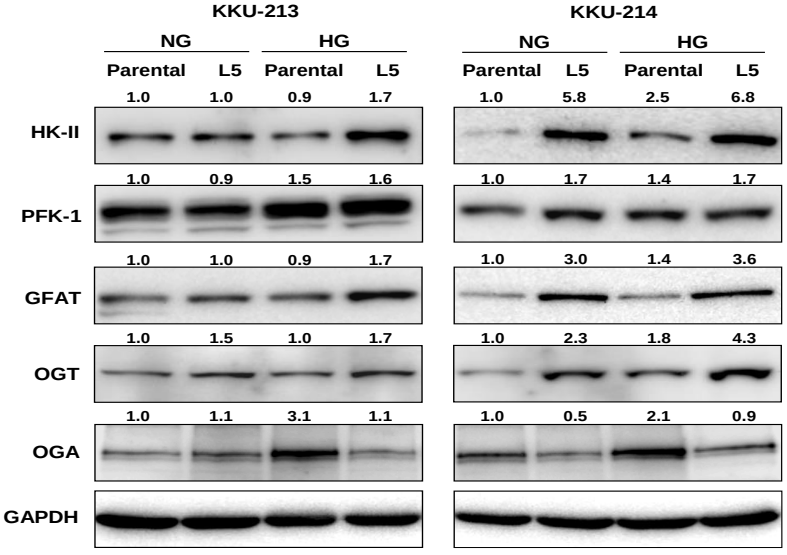


<u>รูปที่ 1-18</u> กลูโคสมีผลต่อระดับ O-GlcNAcylation ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี A) ระดับ O-GlcNAcylation ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เลี้ยงในภาวะที่มีน้ำตาลต่างกัน ตรวจวัด OGP ด้วยเทคนิค western blot B) กราฟแสดงระดับของ O-GlcNAcylation ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เลี้ยงในภาวะที่มีน้ำตาลต่างกัน เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต้นแบบที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลปกติ

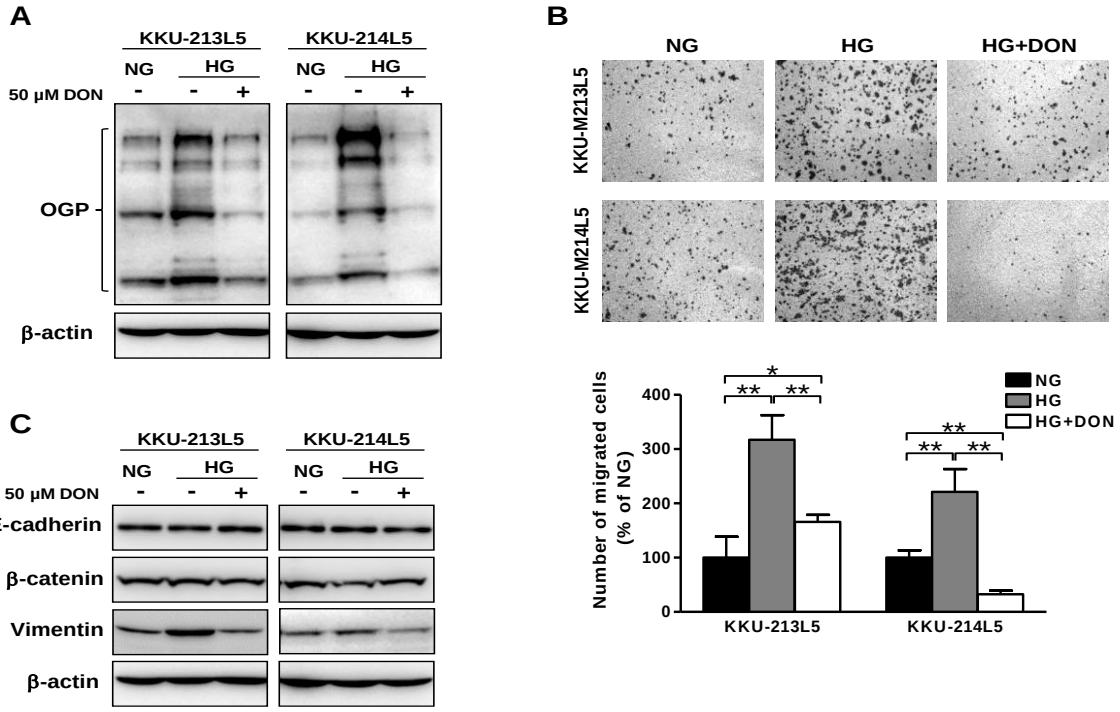


<u>รูปที่ 1-19</u> กลูโคสเพิ่ม O-GlcNAcylation และความเสถียรของ vimentin ใน L5 เซลล์ A) O-GlcNAc บน vimentin ตรวจวัดด้วยเทคนิค immunoprecipitation B) ความเสถียรของ vimentin ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เลี้ยงในสภาวะกลูโคสต่ำและสูง

จากการที่พบว่าระดับของ O-GlcNAcylation ในเซลล์ L5 เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ต้นแบบเมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะที่มีกลูโคสสูง คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษากลไกการควบคุมกระบวนการ O-GlcNAcylation เปรียบเทียบในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต้นแบบและเซลล์ L5 โดยศึกษาเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิส (HK-II, PFK-1), hexosamine pathway (GFAT) ซึ่งเป็นวิถีในการสังเคราะห์ UDP-GlcNAc ซึ่งเป็น sugar donor ของกระบวนการ O-GlcNAcylation, OGT และ OGA ในเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะกลูโคสสูง พบว่าเซลล์ L5 มีการแสดงออกของ HK-II และ GFAT เพิ่มขึ้น ในขณะที่ PFK-1 ไม่ต่างจากเซลล์ต้นแบบ ทำให้การเผาผลาญกลูโคสในเซลล์ L5 ผ่านวิถี hexosamine pathway ได้มากกว่าเซลล์ต้นแบบ นอกจากนี้การแสดงออกของ OGT ในเซลล์ L5 มากกว่าเซลล์ต้นแบบ ขณะที่การแสดงออกของ OGA ในเซลล์ L5 มีน้อยกว่าเซลล์ต้นแบบ ส่งผลให้ระดับ O-GlcNAcylation ในเซลล์ L5 สูงกว่าเซลล์ต้นแบบ (รูปที่ 1-20) เนื่องจาก GFAT เป็นเอนไซม์ที่เชื่อมกระบวนการเผาผลาญกลูโคสและการดัดแปลงโปรตีนด้วย O-GlcNAc และพบระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ L5 เมื่อเลี้ยงในสภาวะกลูโคสสูง คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาบทบาทของ GFAT ในการเชื่อมโยงระหว่างกลูโคสกับ O-GlcNAcylation และการกระตุ้นความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ GFAT ด้วย DON ส่งผลให้ระดับ O-GlcNAcylation และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีลดลง และการแสดงออกของ vimentin ลดลง (รูปที่ 1-21) เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของ O-GlcNAcylation กับ GFAT ในผู้ป่วย ได้ทำ immunohistochemistry ของ OGP และ GFATในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าระดับ O-GlcNAcylation มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการแสดงออกของ GFAT (รูปที่ 1-22)

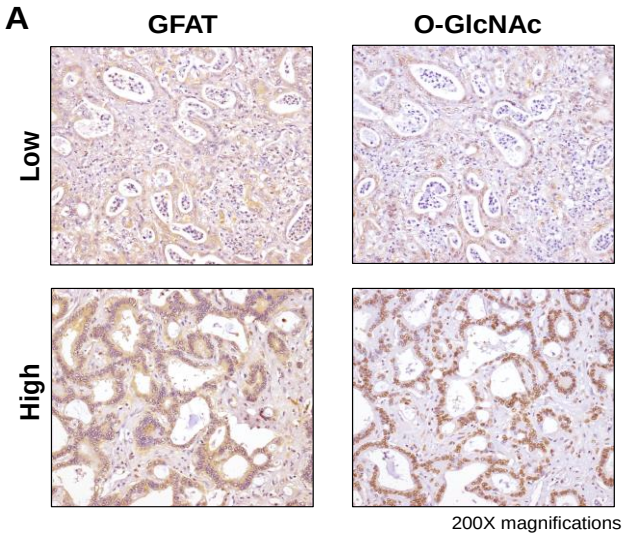


<u>รูปที่ 1-20</u> การตอบสนองของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้าง O-GlcNAcylation ต่อระดับน้ำตาล ได้แก่ เอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส (HK-II และ PFK-1), GFAT, OGT และ OGA ตรวจวัดระดับโปรตีนดังกล่าวด้วยเทคนิค western blot A) KKU-213 และ KKU-213L5, B) KKU-214 และ KKU-214L5



<u>รูปที่ 1-21</u> GFAT ควบคุมระดับ O-GlcNAcylation ที่ตอบสนองต่อระดับกลูโคสและสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี A) ระดับ O-GlcNAcylation ใน L5 เซลล์ ในภาวะที่มีกลูโคสสูงเทียบกับภาวะที่มีกลูโคสสูงรวมกับการให้ DON B) การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงในภาวะที่ให้ DON เทียบกับกลุ่มควบคุม C) การแสดงออกของ EMT markers หลังจากให้ DON ถูกตรวจวัดด้วย western blot

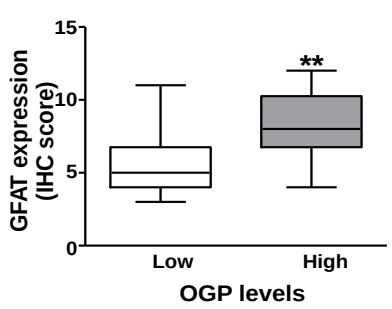
โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับคุณสมบัติการแพร่ลุกลามของมะเร็งโดยผ่านหลายกระบวนการ ดังแสดงในรูปที่ 1-23 ได้แก่ การควบคุมการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของ NF-ĸB, การกระตุ้นการเติมฟอสเฟตของ Akt และ Erk ซึ่งมีผลเปลี่ยนแปลง N-glycan โดยเฉพาะ high mannose type N-glycan ของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ O-GlcNAcylation ยังควบคุมความเสถียรของ FOXO3 และ vimentin ซึ่งข้อมูลทั้งหมดเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ ทำให้เข้าใจชีววิทยาและกลไกในการพัฒนาความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดียิ่งขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการยับยั้งการแพร่ลุกลามและการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแบบมุ่งเป้าต่อไปในอนาคต



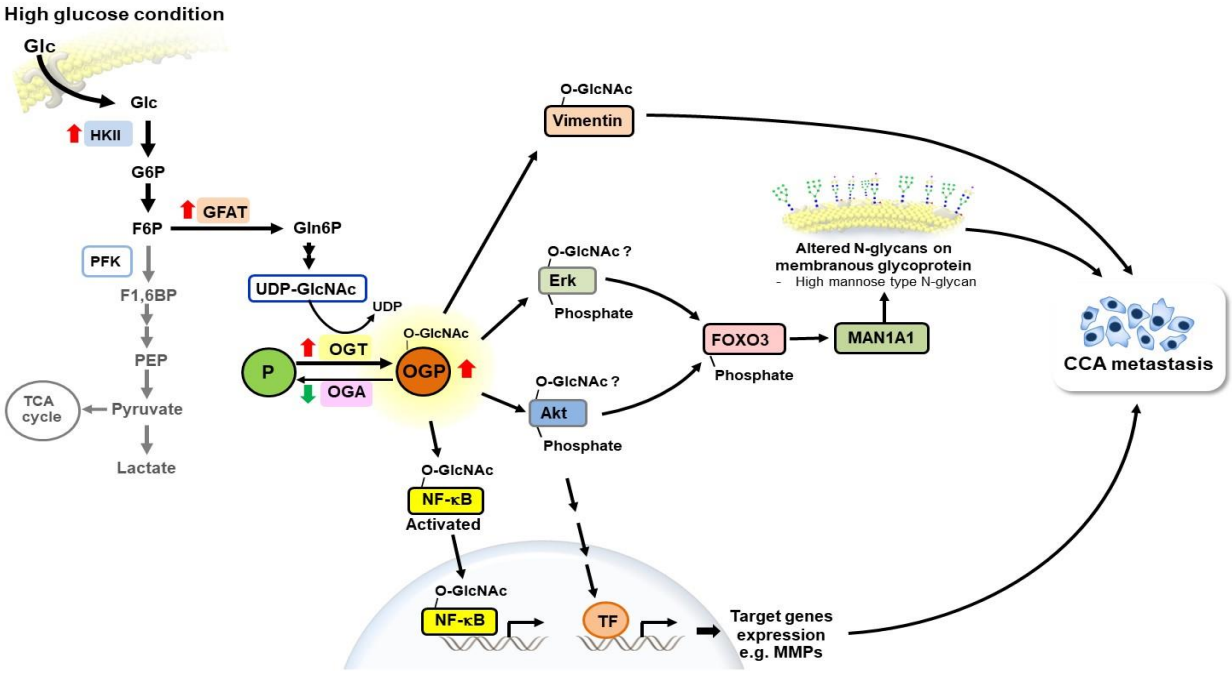
B

		GFAT level		*P-value*
		Low	High	
OGP level	Low	12 (75.0%)	4 (25.0%)	0.009
	High	3 (21.4%)	11 (78.8%)	

Fisher's Exact Test (two-tailed)



รูปที่ 1-22 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ GFAT กับระดับ O-GlcNAcylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วย A) การแสดงออกของ GFAT และ O-GlcNAcylation ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 30 รายด้วยเทคนิค immunohistochemistry และวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ด้วย B) chi-square และ C) Mann Whitney test



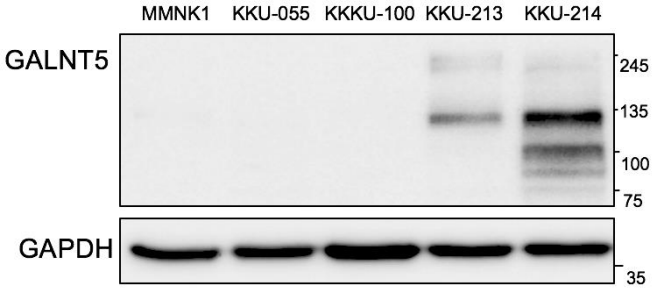
รูปที่ 1-23 ความสัมพันธ์ของกระบวนการ O-GlcNAcylation กับคุณสมบัติการแพร่ลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี

<u>โครงการที่ 2 บทบาทของ GalNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี</u>

Mucin (GalNAc)-type *O*-glycosylation เป็นกระบวนการ post-translational modification ที่มีความสำคัญมากต่อการทำงานของโปรตีน โดยกระบวนการนี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ *N*-acetylgalactos-aminyltransferases (GalNAc-Ts) ซึ่งมีทั้งหมด 20 isoform ที่ทำหน้าที่เดียวกันเพื่อเติมน้ำตาล *N*-acetyl-galactosamine (GalNAc) ตัวแรกให้กับกรดอะมิโน serine (ser) หรือ threonine (thr) ที่อยู่บนโปรตีน ทำให้เกิด GalNAcα1-*O*-Ser/Thr linkage ซึ่งจะมีการต่อหมู่น้ำตาลต่าง ๆ ทำให้โปรตีนที่ถูกตกแต่งด้วยหมู่น้ำตาลมีการทำงานเปลี่ยนแปลงไป จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามะเร็งหลายชนิดมีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T และสัมพันธ์กับกระบวนการก่อมะเร็งและการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง

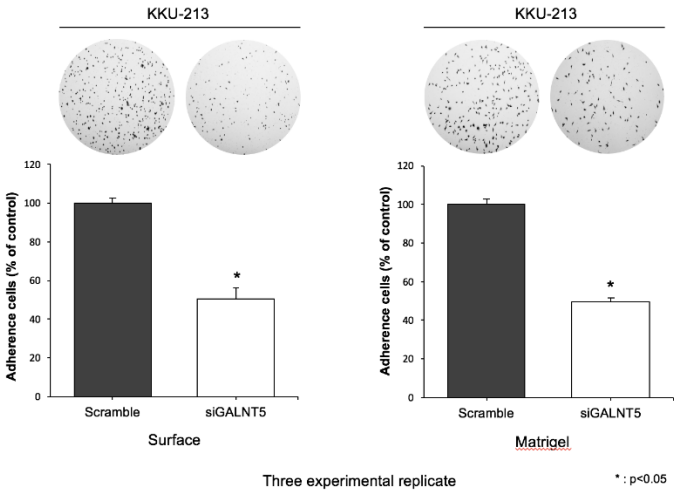
ในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้ทบทวนรายงานวิจัยร่วมกับข้อมูลจากฐานข้อมูลต่าง ๆ สามารถคัดเลือก GALNTs 7 isoform ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งเพื่อศึกษาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของยีน GALNTs ทั้ง 7 isoform ในระดับ mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และได้เลือก GALNT5 เพื่อเป็น candidate ในการศึกษาต่อ เนื่องจากมีการแสดงออกในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 สูงกว่า เซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ (MMNK1) และได้ดำเนินการวิจัยดังนี้

2.1 การแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี western blot พบว่า ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 สอดคล้องกับระดับ mRNA คือ พบสูงใน KKU-214, KKU-213 และไม่ตรวจพบใน KKU-055, KKU-100 และ เซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ MMNK1 ดังรูปที่ 1-24



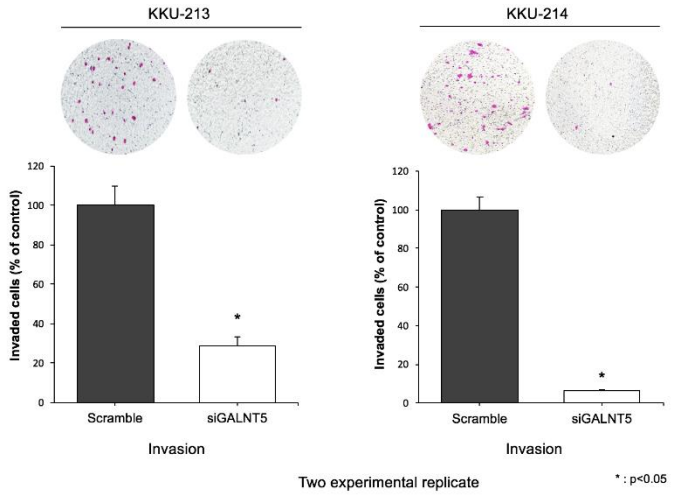
<u>รูปที่ 1-24</u> ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ในเซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ (MMNK1) และเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 5 ชนิด โดยวิธี western blot

2.2 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ลดความสามารถในการเกาะติด (adhesion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อศึกษาความสามารถในการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธี adhesion assay พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ GalNAc-T5 ด้วย siRNA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ความสามารถของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ในการเกาะติดพื้นผิวภาชนะ (surface) และพื้นผิวที่ coat ด้วย matrigel ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ scramble control ($P < 0.05$) โดยได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันผล ดังแสดงในรูปที่ 1-25



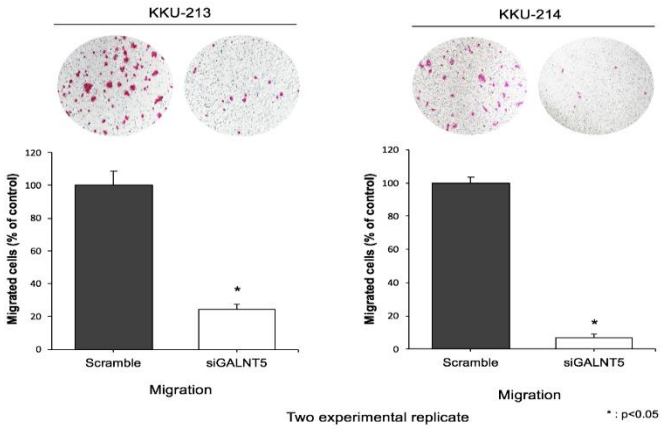
<u>รูปที่ 1-25</u> ความสามารถในการเกาะติดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA

2.3 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ส่งผลให้การเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลง เมื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี boyden chamber assay พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ GalNAc-T5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วย siRNA ทำให้ความสามารถในการการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ scramble control ($p<0.05$) โดยได้ทำการทดลองสองซ้ำเพื่อยืนยันผล (รูปที่ 1-26)



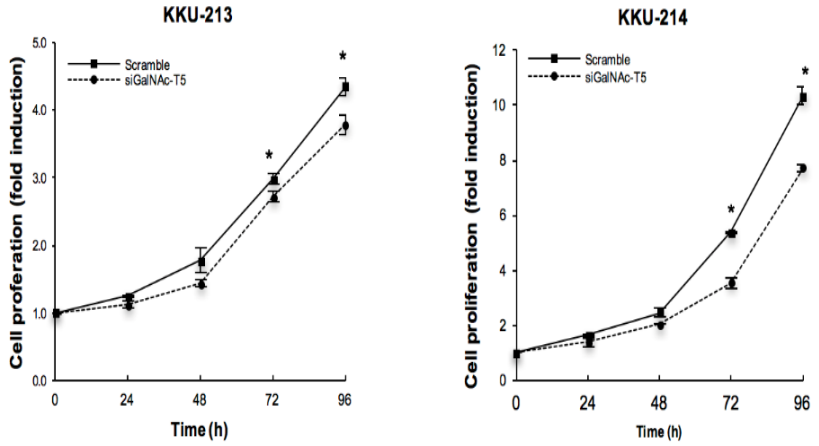
<u>รูปที่ 1-26</u> ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA

2.4 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA ลดความสามารถในการรุกราน (invasion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อศึกษาความสามารถในการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี boyden chamber assay ที่ coat ด้วย basement membrane matrix (Matrigel) พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ GalNAc-T5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วย siRNA ทำให้ความสามารถในการรุกรานของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ scramble control ($p<0.05$) โดยได้ทำการทดลองสองซ้ำเพื่อยืนยันผล (รูปที่ 1-27)



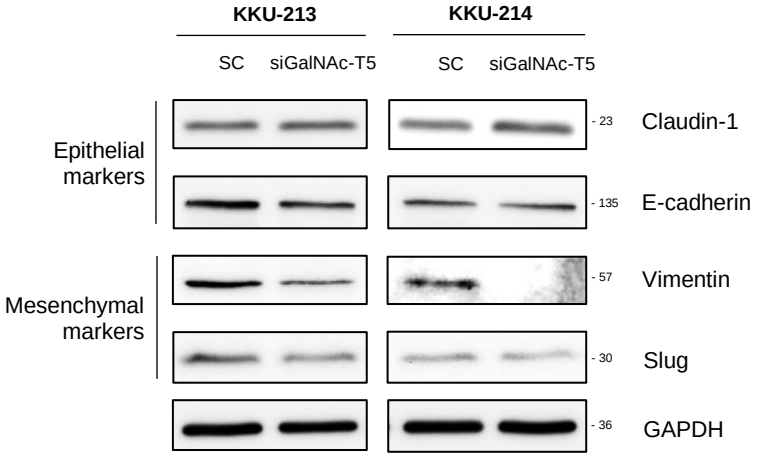
<u>รูปที่ 1-27</u> ความสามารถในการรุกรานของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA

2.5 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA ลดการแบ่งตัว (proliferation) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ GalNAc-T5 เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงด้วย siRNA ทำให้ความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ scramble control ($p<0.05$) โดยได้ทำการทดลองสองซ้ำเพื่อยืนยันผล (รูปที่ 1-28)

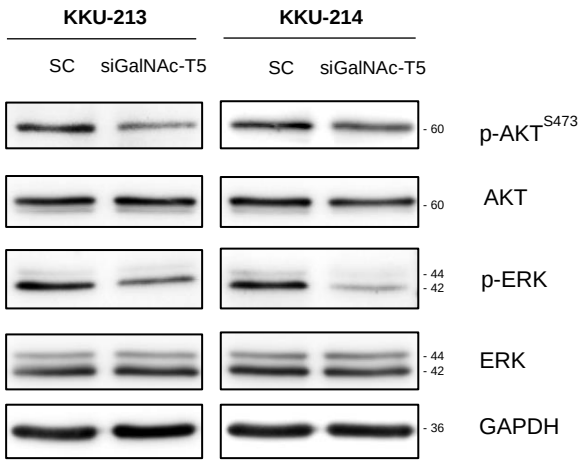


<u>รูปที่ 1-28</u> ความสามารถในแบ่งเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลง เมื่อการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ถูกยับยั้งด้วย siRNA เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง

2.6 การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA ลดกระบวนการ epithelial–mesenchymal transition (EMT) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีผ่านการเปลี่ยนแปลงของ AKT และ ERK signaling pathway ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในกระกวนการ epithelial–mesenchymal transition (EMT) และ AKT และ ERK signaling pathway โดยวิธี western blot พบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ GalNAc-T5 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วย siRNA ทำให้ epithelial marker ได้แก่ Claudin-1 เพิ่มขึ้นและ mesenchymal marker ได้แก่ vimentin และ slug ลดลง เมื่อเทียบกับ scramble control โดยได้ทำการทดลองสองซ้ำเพื่อยืนยันผล (รูปที่ 1-29) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ GalNAc-T5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กระบวนการ phosphorylation ของ AKT และ ERK ลดลงเมื่อเทียบกับ scramble control โดยได้ทำการทดลองสองซ้ำเพื่อยืนยันผล (รูปที่ 1-30)

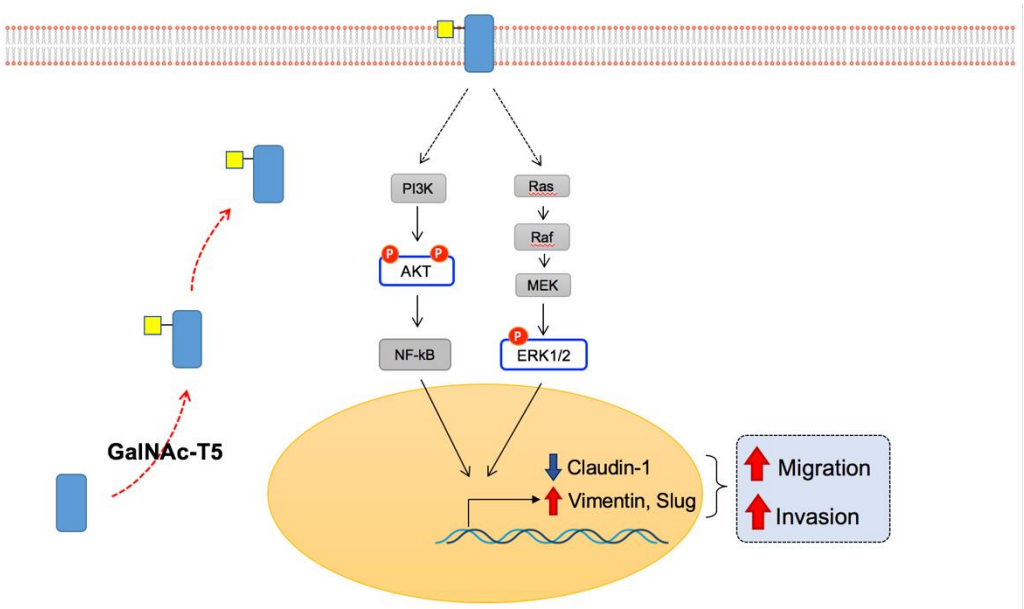


<u>รูปที่ 1-29</u> EMT markers ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 เปลี่ยนแปลงไปเมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



<u>รูปที่ 1-30</u> Phosphorylation ของ AKT และ ERK ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ลดลงเมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 ด้วย siRNA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า การแสดงของเอนไซม์ GalNAc-T5 ส่งเสริมความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดีผ่านกระบวนการ phosphorylation ของ AKT และ ERK โดยกระตุ้นการเปลี่ยนลักษณะ epithelial ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเป็นลักษณะ mesenchymal ส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการรุกรานสูงมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ GalNAc-T5 จึงอาจเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สามารถลดความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดีได้ (รูปที่ 1-31)

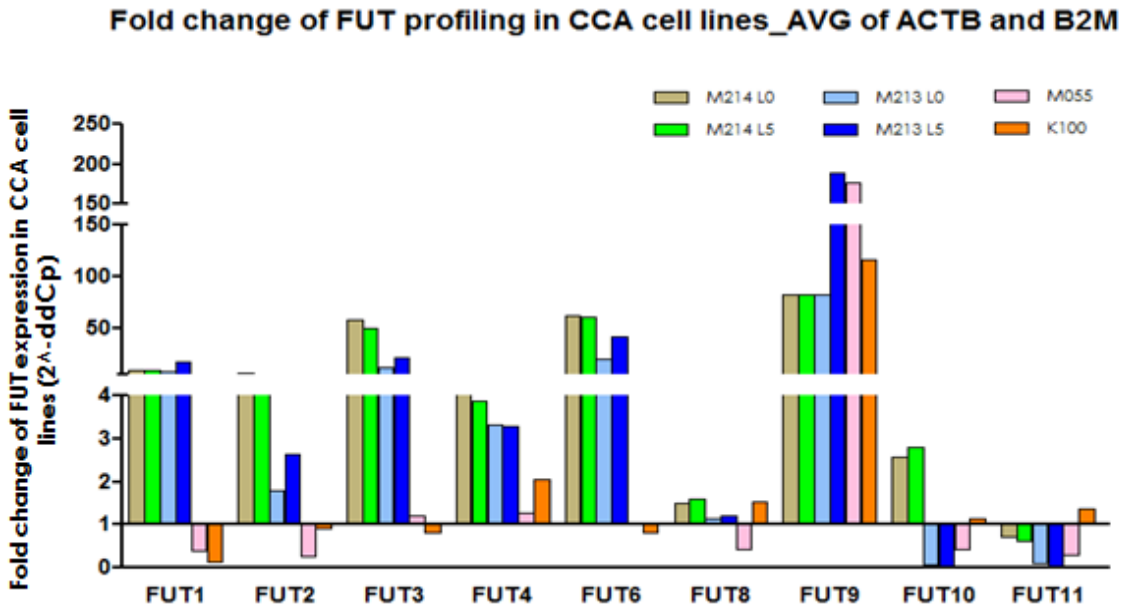


<u>รูปที่ 1-31</u> แผนภาพแสดงบทบาทของเอนไซม์ GalNAc-T5 ในการพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยผ่านกระบวนการ phosphorylation ของ AKT และ ERK ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนในกลุ่ม EMT

<u>โครงการที่ 3 การแสดงออกและบทบาทของ fucosylation ในมะเร็งท่อน้ำดี</u>

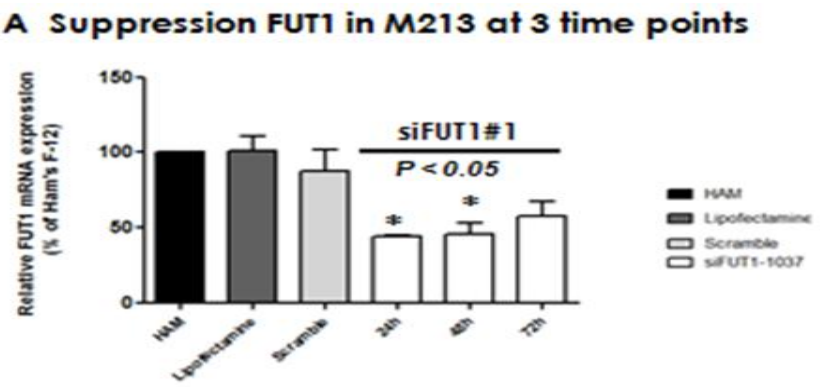
Fucosylation เป็นกระบวนการเติมน้ำตาล fucose ให้กับสายน้ำตาล ซึ่งมีหลายแบบ ขึ้นกับเอนไซม์และหมู่น้ำตาลที่เป็นตัวรับ รายงานวิจัยหลายฉบับแสดงว่า fucosylation มีความสัมพันธ์กับพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งหลายชนิด

3.1 FUT1 เป็นเอนไซม์ที่พบสูงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่รุกรานสูง คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ fucosyltransferases (FUTs) 9 ชนิด ใน เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 6 ชนิด (K100, M055, M213L0, M214L0, M213L5 และ M214L5) และ immortalized cholangiocytes (MMNK1) โดย real-time PCR พบว่า ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 สูงขึ้น (up-regulation) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี M213L0 (7.57), M214L0 (9.19), M213L5 (17.31) และ M214L5 (8.84) เมื่อเทียบกับเซลล์ MMNK1 (fold change, 2^-ddCp) (รูปที่ 1-32)



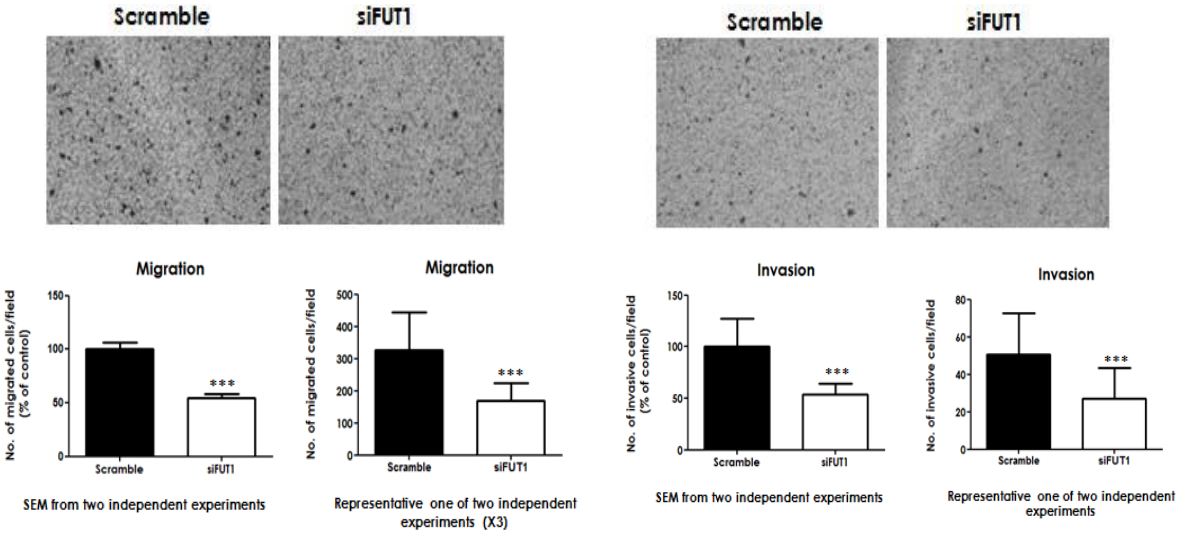
<u>รูปที่ 1-32</u> ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ FUTs ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 6 ชนิด เมื่อเทียบกับกับเซลล์ MMNK1 (fold change, 2^-ddCp)

คณะผู้วิจัยได้เลือกเอนไซม์ FUT1 เพื่อศึกษาในเชิงลึกต่อไป โดยศึกษาบทบาทของ FUT1ต่อการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานในมะเร็งท่อน้ำดี โดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 ด้วย siRNA เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี M213 พบว่า siRNA สามารถลดระดับ mRNA ของเอนไซม์ FUT1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 1-33)



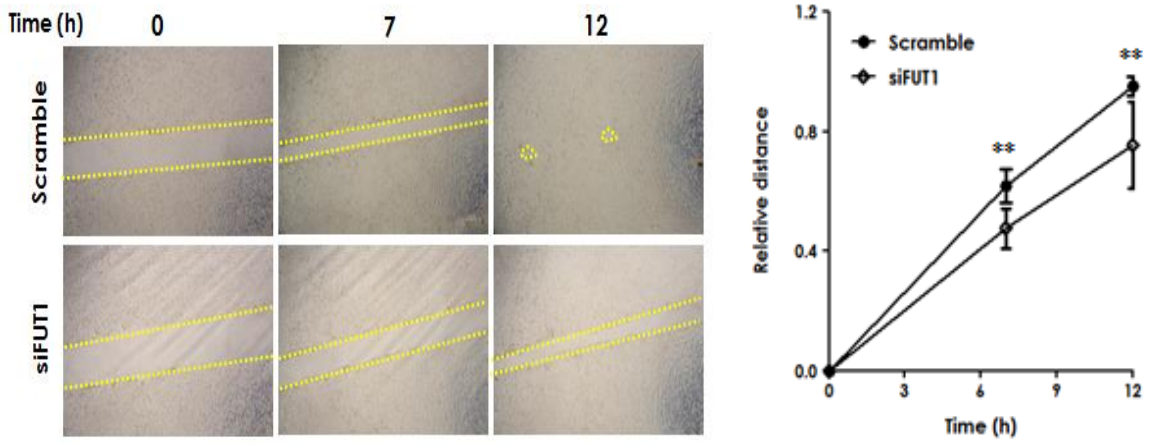
รูปที่ 1-33 การยับยั้งแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ FUT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี M213 ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

สำหรับการศึกษาบทบาทของ FUT1 ต่อการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานในมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้ Boyden chamber ซึ่งวัดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจาก upper chamber ผ่าน porous membrane (8 μm) ลงมายัง lower chamber ตาม chemo-attractant gradient สำหรับการวัดความสามารถด้าน cell invasion ได้วัดจำนวนเซลล์มะเร็งที่เคลื่อนที่ผ่าน porous membrane ที่ถูก coat ด้วย Matrigel® ผลการทดลองพบว่า เมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 ในเซลล์ KKU-M213 สามารถลด ความสามารถการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์ KKU-M213 ได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ scramble-si อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) (รูปที่ 1-34)



รูปที่ 1-34 ความสามารถด้านการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ลดลง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1

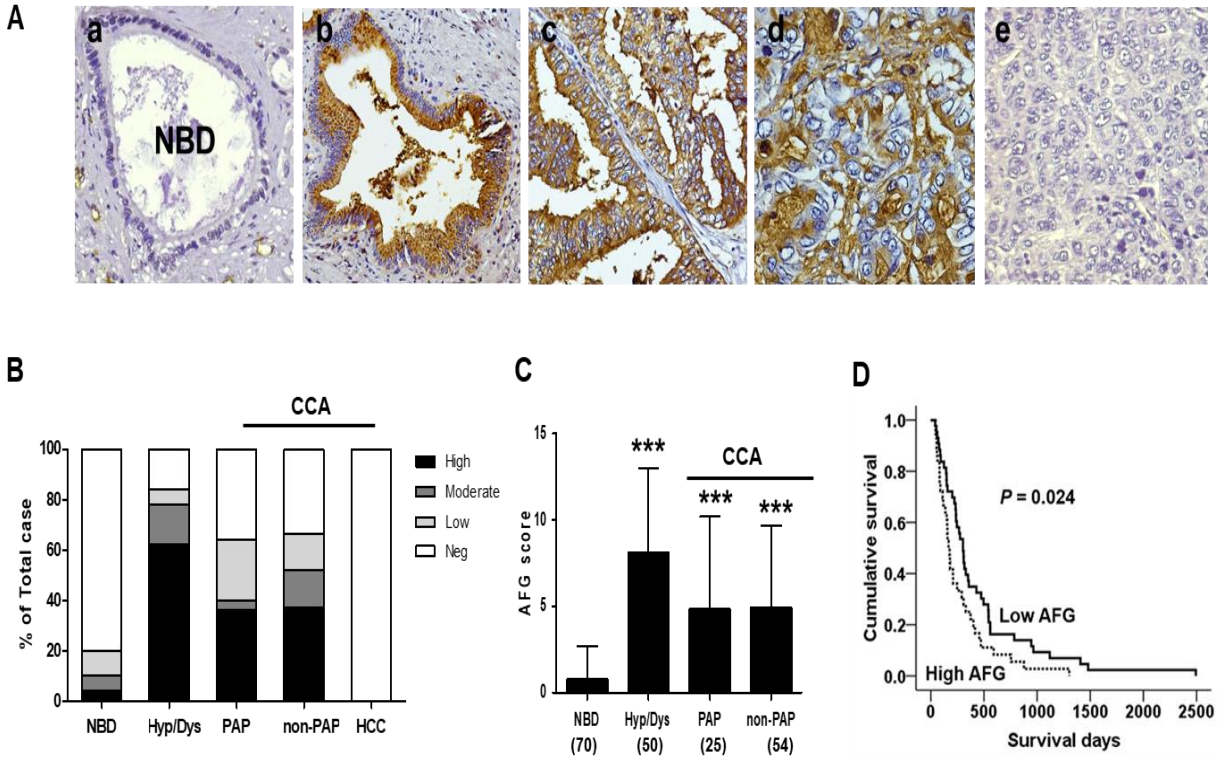
คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสามารถในด้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 และ scramble ด้วยวิธี wound scratching ผลการศึกษา พบว่า เมื่อเวลา 7 และ 12 ชั่วโมง เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกเอนไซม์ FUT1 เคลื่อนที่ได้ช้ากว่า scramble อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 1-35)



<u>รูปที่ 1-35</u> ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ลดลง หลังจากยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 ทดสอบด้วยวิธี wound scratching

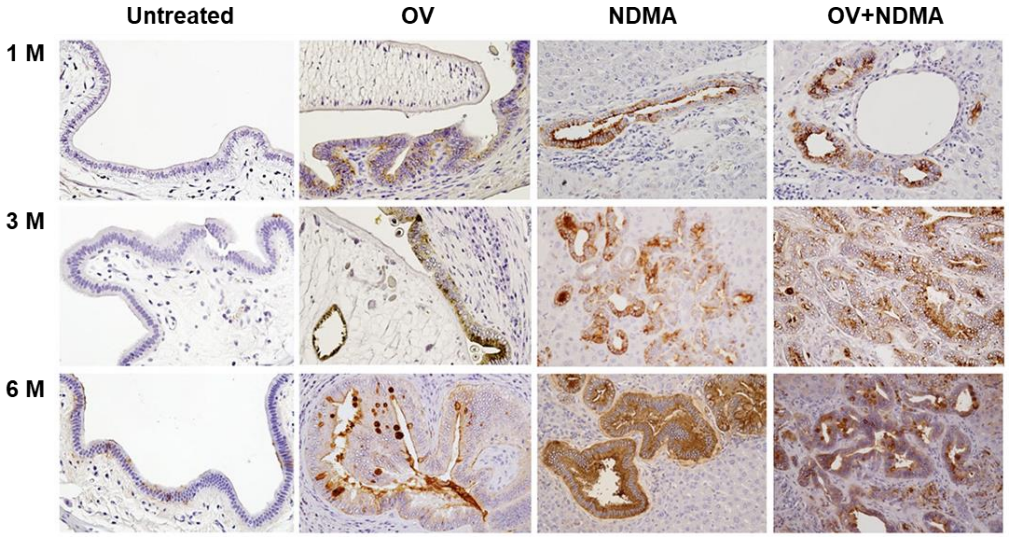
3.2 พบผลผลิตของเอนไซม์ FUT1 (α1,2-fucosylated glycan, AFG) สูงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและสัมพันธ์กับระยะรอดชีพสั้นของผู้ป่วย

เพื่อศึกษาความสำคัญของเอนไซม์ FUT1 ในมะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของน้ำตาล α1,2-fucosylated glycan (AFG) ซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ FUT1 ด้วยเลกติน *Ulex europaeus* (UEA-I) ที่จำเพาะต่อ AFG ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 74 ราย โดยวิธี UEA-I histochemistry ผลการทดสอบ ไม่พบการแสดงออกของ AFG ในเซลล์ท่อน้ำดีปกติ แต่พบการแสดงออกของ AFG สูงในเซลล์ท่อน้ำดีที่มีการแบ่งตัวผิดปกติ (hyperplastic/dysplastic) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในขณะที่เซลล์ตับและมะเร็งตับไม่มีการแสดงออกของ AFG (รูปที่ 1-36) แสดงว่าการแสดงออกของ AFG จำเพาะต่อเซลล์ท่อน้ำดีที่มีพยาธิสภาพและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งอาจใช้ AFG เป็นตัววินิจฉัยแยกระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีกับมะเร็งตับได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG กับระยะรอดชีพของผู้ป่วย พบว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ AFG ในเนื้อเยื่อมะเร็งสูงจะมีระยะรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ AFG ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่ำ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



<u>รูปที่ 1-36</u> การแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (A) สัญญาณของหมู่น้ำตาล AFG โดย UEA-I histochemistry (a) เซลล์ท่อน้ำดีที่ปกติไม่มีการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG แต่พบการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG ใน (b) เซลล์ท่อน้ำดีที่มีการแบ่งตัวผิดปกติ (hyperplastic/dysplastic; Hyp/Dys) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด (c) papillary CCA และ (d) non-papillary CCA แต่ไม่พบใน (e) มะเร็งตับ (กำลังขยายของภาพ a-c x200 และ d-e x400) (B) จำนวนผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างกัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (>60%) มีการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG (C) ระดับการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG เพิ่มขึ้นในเซลล์ท่อน้ำดีที่มีการแบ่งตัวผิดปกติ และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีที่ปกติ (****P* < *0.001*) ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนตัวอย่าง NBD; normal bile duct, Hyp/Dys; hyperplastic/dysplastic bile duct, non-PAP; non-Papillary type, PAP; papillary type, HCC; hepatoma, (D) ผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG สูงจะมีระยะรอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ AFG ต่ำ (Kaplan-Meier plot; P = 0.024, Log rank test)

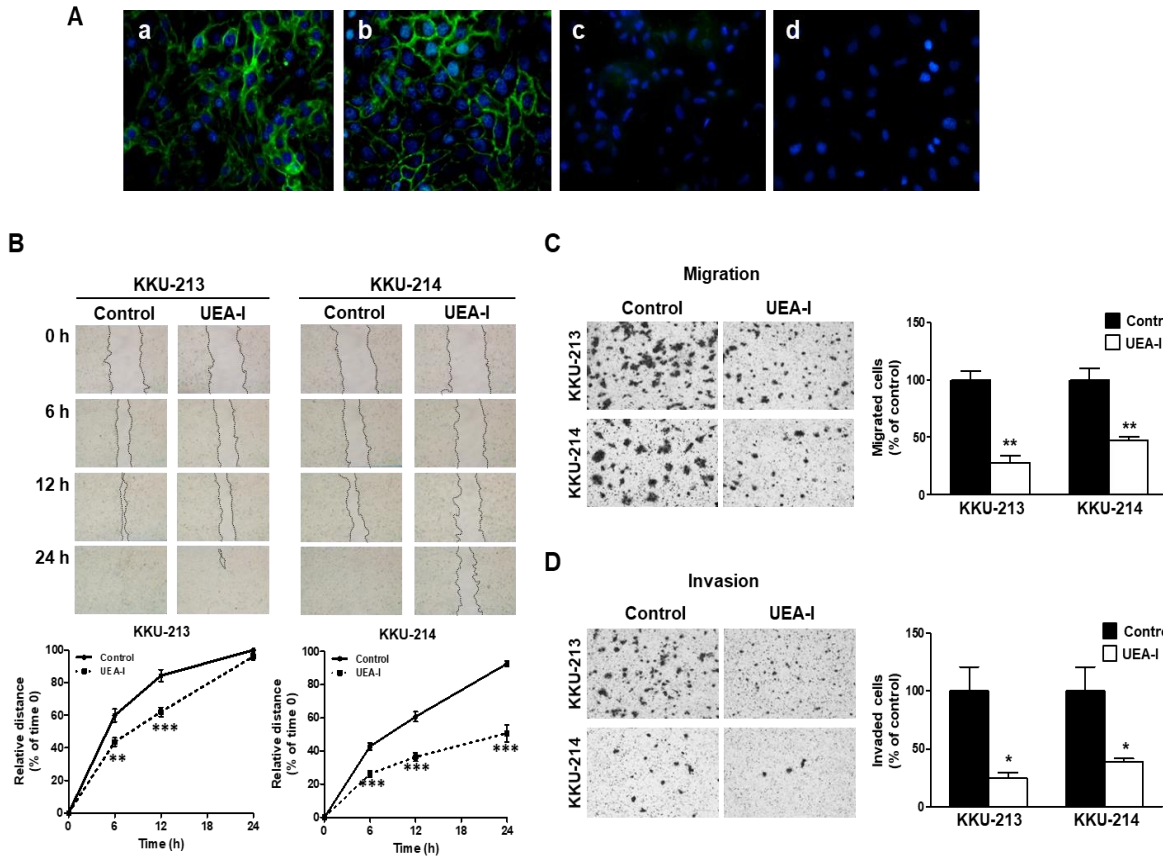
3.3 การแสดงออกของ AFG สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ท่อน้ำดีและการก่อมะเร็งท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์ เพื่อศึกษาบทบาทของ AFG ในกระบวนการก่อมะเร็ง ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ AFG ในหนูแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยแบ่งหนูเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับ treatment ใด ๆ กลุ่มที่ 2 ได้รับพยาธิใบไม้ตับ กลุ่มที่ 3 ได้รับสารก่อมะเร็ง N-Nitrosodimethylamine (NDMA) ในระดับต่ำ และกลุ่มที่ 4 ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA ซึ่งเป็นกลุ่มที่เกิดมะเร็งท่อน้ำดี เก็บตัวอย่างตับหนูหลังได้รับ treatment เป็นเวลา 1, 3 และ 6 เดือนตามลำดับ โดยหนูกลุ่มที่ 4 จะเริ่มเป็นมะเร็งท่อน้ำดีหลัง treatment 3 เดือน และหนูในกลุ่มนี้จะเป็นมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมดหลัง treatment 6 เดือน ผลการย้อมชิ้นเนื้อตับของจากหนูแฮมสเตอร์ด้วย UEA-I histochemistry ไม่พบการแสดงออกของ AFG ในท่อน้ำดีปกติ แต่พบในท่อน้ำดีที่มีพยาธิสภาพจากหนูกลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ (OV) หนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง (NDMA) และหนูที่ก่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ NDMA แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ AFG กับการเกิดพยาธิสภาพและการก่อมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้พบการแสดงออกของ AFG ตั้งแต่ 1 เดือนแรกเมื่อเกิดพยาธิสภาพของท่อน้ำดี ชี้แนะว่า อาจใช้ AFG เป็น early marker ของมะเร็งท่อน้ำดีได้ (รูปที่ 1-37)



<u>รูปที่ 1-37</u> การแสดงออกของ AFG และการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี ตรวจสอบการแสดงออกของ AFG โดย UEA-I histochemistry ของตับหนูแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี พบสัญญาณของหมู่น้ำตาล AFG ค่อนข้างต่ำในท่อน้ำดีในหนูกลุ่มควบคุม แต่พบสูงในเซลล์ท่อน้ำดีที่เกิดพยาธิสภาพ (abnormal biliary cells) ในหนูกลุ่มที่ติดพยาธิ (OV) กลุ่มหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง N-Nitrosodimethylamine (NDMA) และกลุ่มที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีโดยให้หนูได้รับพยาธิร่วมกับสารก่อมะเร็ง (OV + NDMA) สามารถตรวจพบการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG ได้ตั้งแต่ 1 เดือนหลัง treatment (กำลังขยาย x200)

3.4 AFG บนเยื่อหุ้มเซลล์สัมพันธ์กับการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

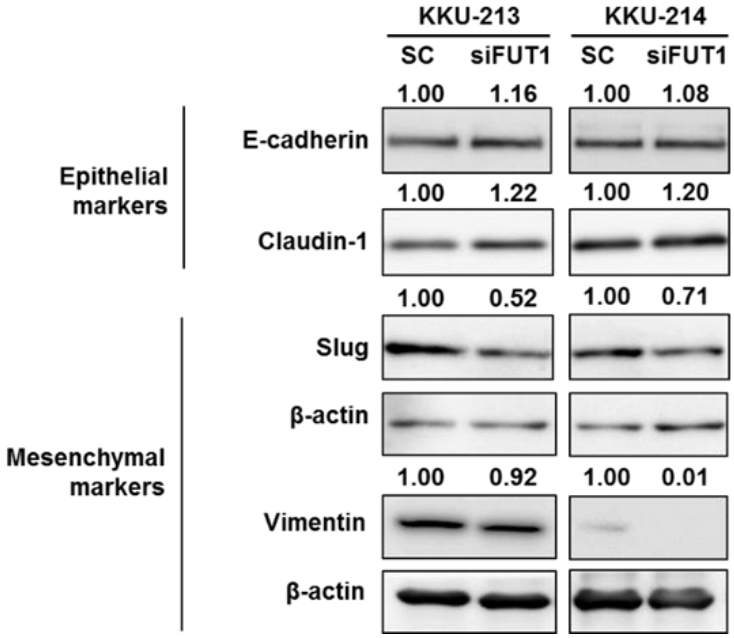
เพื่อศึกษาความสำคัญของ AFG บนเยื่อหุ้มเซลล์กับการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้ตรวจสอบการแสดงออกของ AFG บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยการย้อมเซลล์ด้วยวิธี UEA-I cytofluorescence พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 เป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ AFG สูงกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิดอื่น (รูปที่ 1-38A) เมื่อยับยั้งการทำงานของหมู่น้ำตาล AFG บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 โดยใช้เลกติน UEA-I พบว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 1-38B-D)



รูปที่ 1-38 การแสดงออกของ AFG เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) ระดับการแสดงออกของหมู่น้ำตาล AFG ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี UEA-I cytofluorescent staining การเลี้ยงเซลล์เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ในอาหารที่มี UEA-I ลดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ เมื่อวัดด้วย (B) wound scratching (C) migration assay และ (D) การแพร่รุกราน เมื่อวัดด้วย invasion assay

3.5 FUT1 และ AFG ส่งเสริมการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านกระบวนการ epithelial-mesenchymal transition (EMT)

เพื่อศึกษาบทบาทของ AFG ต่อการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุล คณะผู้วิจัยได้ออกแบบ siFUT1 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างหมู่น้ำตาล AFG พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ FUT1 สามารถลดการเคลื่อนที่ การแพร่รุกรานและการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ FUT1 มีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลง epithelial-mesenchymal transition (EMT) เป็นผลให้การแสดงออกของ E-cadherin และ claudin-1 ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของเซลล์เยื่อบุเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของ slug และ vimentin ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของเซลล์ mesenchyme ลดต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 1-39

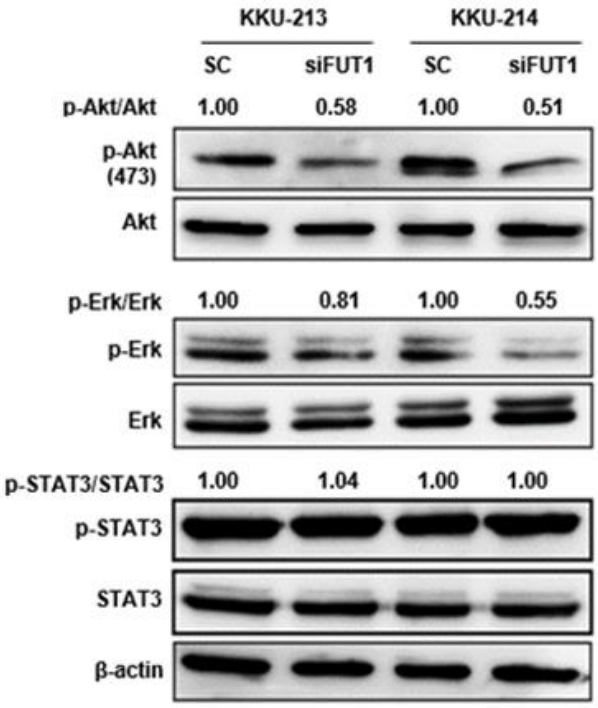


<u>รูปที่ 1-39</u> การยับยั้งการแสดงออกของ FUT1 มีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลง epithelial-mesenchymal transition (EMT) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลจาก western blotting แสดงว่าการแสดงออกของ cadherin และ claudin-1 เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของ slug และ vimentin ลดต่ำลงในเซลล์ที่ได้รับ siFUT1 ทั้งนี้ โปรตีนทุกชนิดจะถูกเปรียบเทียบระดับการแสดงออกกับ β-actin ก่อนที่จะเปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งที่ได้รับ scramble siControl (SC) และ siFUT1 โดยให้ SC = 1 ข้อมูลที่นำมาแสดงเป็นตัวแทนจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

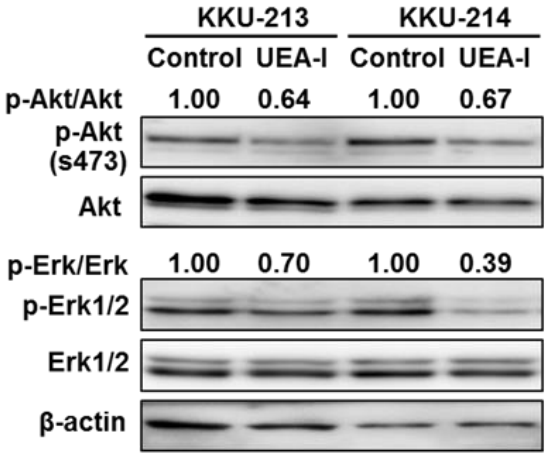
3.6 การแสดงออกของ FUT1 เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Akt และ Erk signal pathway

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า Akt, Erk และ STAT3 signal pathway เกี่ยวข้องกับการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt, Erk และ STAT3 กับการทำงานของเอนไซม์ FUT1 โดยการทำ immunoblotting พบว่า กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk ลดลงเมื่อลดการแสดงออกของเอนไซม์ FUT1 โดยใช้ siFUT1 แต่ไม่มีผลต่อการกระตุ้น STAT3 (รูปที่ 1-40) การยับยั้งการทำงานของ AFG โดยใช้เลกติน UEA-I ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ มีการลดลงของกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk (รูปที่ 1-41) เป็นการยืนยันว่า ไม่ว่าจะลดการแสดงออกของ AFG โดยใช้ siFUT1 หรือยับยั้งการทำงานของ AFG โดยใช้เลกติน UEA-I ทำให้การเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งลดลงนั้นผ่านการ Akt และ Erk signal pathway เพื่อยืนยันบทบาทของ Akt และ Erk ต่อกระบวนการ EMT ที่พบดังแสดงในรูปที่ 1-39 คณะผู้วิจัยได้ใช้สารยับยั้งจำเพาะต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk และวัดการแสดงออกของตัวชี้วัด EMT โดย western blotting พบว่าการยับยั้งการการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk ลดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ EMT ได้ (รูปที่ 1-42) การศึกษาทั้งหมดนี้แสดงว่าเอนไซม์ FUT1 และ AFG สนับสนุนการพัฒนาความรุนแรงของของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านการทำงานของ Akt และ Erk ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ EMT ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนั่นเอง

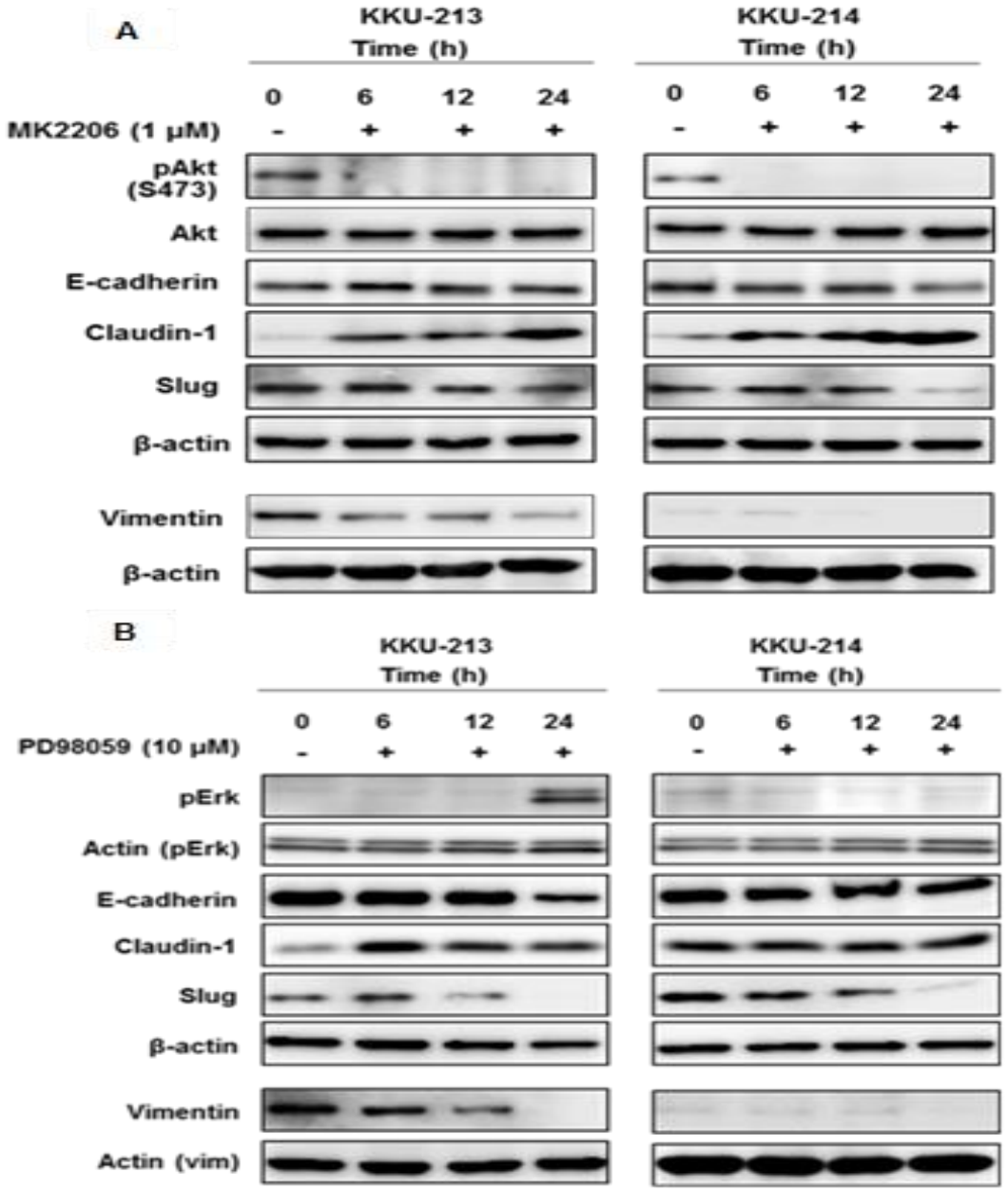
โดยสรุป การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า มีความผิดปกติของกระบวนการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต หรือสายน้ำตาลเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วย โดยหมู่น้ำตาล AFG และเอนไซม์ FUT1 ส่งเสริมความสามารถในการเคลื่อนที่ การแพร่รุกรานและการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผ่านการกระตุ้นการทำงานของ Akt และ Erk ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ EMT (รูปที่ 1-43) เนื่องจากพบการแสดงออกของ AFG ในระยะแรก ๆของกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีและ AFG เกี่ยวข้องกับการพัฒนาความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงควรศึกษาวิจัยเพื่อให้เกิดการประยุกต์ใช้ AFG ทางคลินิกเพื่อการวินิจฉัยและการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแบบมุ่งเป้าต่อไป



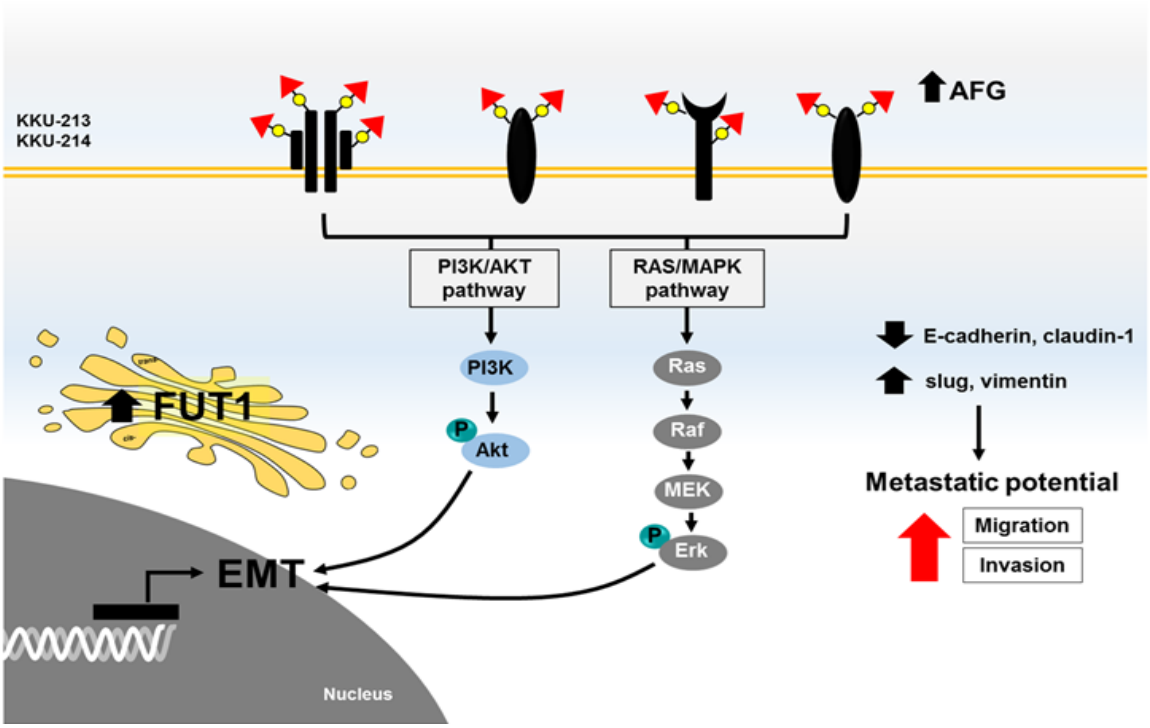
<u>รูปที่ 1-40</u> การยับยั้งการแสดงออกเอนไซม์ FUT1 ลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk ตรวจสอบการแสดงออกของ Akt, Erk และ STAT3 และ pAkt, pErk และ pSTAT3 ด้วยวิธี western blotting ค่า relative expression ของโปรตีนแสดงด้วยตัวเลขโดยให้ SC = 1 โดยค่าการแสดงออกของโปรตีนทุกตัวถูกวิเคราะห์เป็นสัดส่วนกับเทียบกับ β-actin ก่อนคำนวณค่า relative expression ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนจากการทดลองทำ 2 ครั้ง



<u>รูปที่ 1-41</u> การยับยั้งการทำงานของ AFG ด้วย UEA-I ลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt และ Erk ตรวจสอบการแสดงออกของ pAkt/Akt, และ pErk/Erk ด้วยวิธี western blotting ค่า relative expression ของโปรตีนแสดงด้วยตัวเลขโดยให้ control = 1 โดยค่าการแสดงออกของโปรตีนทุกตัวถูกวิเคราะห์เป็นสัดส่วนกับเทียบกับ β-actin ก่อนคำนวณค่า relative expression



<u>รูปที่ 1-42</u> การยับยั้งการทำงานของ Akt และ Erk ทำให้เกิดกการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ EMT ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เซลล์มะเร็ง KKU-213 และ KKU-214 ได้รับตัวยับยั้งการงานของ Akt (MK2206, 1 μM) และ Erk (PD980559, 10 μM) เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการแสดงออกของ pAkt/Akt, pErk/Erk และตัวชี้วัดของกระบวนการ EMT ด้วยวิธี western blotting



<u>รูปที่ 1-43</u> ภาพสรุปบทบาทของเอนไซม์ FUT1 และหมู่น้ำตาล AFG ในการพัฒนาความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดี ผ่านการกระตุ้นการทำงานของ Akt และ Erk ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ EMT ส่งผลให้เซลล์มีการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานเพิ่มขึ้น

ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยนี้

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 9 เรื่อง

1.1 Sirorat Pattanapairoja, Atit Silsirivanit, Kanha Muisuk, Wunchana Seubwai, Ubon Cha'on, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Danaipong Chetchotsaka, Sopit Wongkham. Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach. Clin Biochem (IF = 2.23)

1.2 Kanha Muisuk, Atit Silsirivanit, Kanokwan Imtawil, Suphawadee Boontot, Ake Pukhem, Chawalit Pairojkul, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. Whole mitochondrial genome sequencing revealed several new mitochondria mutations in cholangiocarcinoma with low frequencies. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16:1737-1742. (IF = 1.5)

1.3 Kanlayanee Sawanyawisuth, Nattawat Tantapotinan, Ratthaphol Kraiklang, Anucha Puapairoj, Chaisiri Wongkham, Gregory J Riggins, Sopit Wongkham. Suppression of trophoblast cell surface antigen 2 enhances proliferation and migration in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Ann Hepatol. 2016 Jan-Feb; 15(1):71-81.(IF = 2.065)

1.4 Sirinapa Sribenja, Nichapavee Natthasirikul, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Patcharee Jearanaikoon, Sopit Wongkham. Thymosin β10 as a predictive biomarker of response to 5-fluorouracil chemotherapy in cholangiocarcinoma. (IF = 2.065)

1.5 Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Wunchana Seubwai, Chaisiri Wongkham, Atit Silsirivanit, Sopit Wongkham. Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kB. Sci Rep. 2016 Jun 13;6:27853. (IF = 5.228)

1.6 Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Jurupong Saengboonmee, Wunchana Seubwai, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham. High glucose level boost the aggressiveness of high metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation. Science Report 2017, 7:43842. (IF = 5.228)

ผลงานวิจัยที่อยู่ในระหว่างพิจารณา 1 เรื่อง

1.7 Waraporn Saentaweesuk, Atit Silsirivanit, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chawalit Pairojkul, Ubon Cha'on, Somsiri Indramanee, Somchai Pinlaor, Thidarut Boonmars, Norie Araki, Chaisiri Wongkham. Clinical significance of GalNAcylated glycans in cholangiocarcinoma: Values for diagnosis and prognosis. Submitted to Clinica Chimica Acta (under revision; IF = 2.873).

ผลงานวิจัยที่อยู่ในระหว่างเตรียมต้นฉบับ 2 เรื่อง

1.8 Somsiri Indramanee, Kanlayanee Sawanyawisuth,Atit Sisirivanit, Paweena Dana, Chatcahi Phoomak, Chaisiri Wongkham, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Sopit Wongkham. α1,2-Fucosylated glycans

associates with poor survival of cholangiocarcinoma patients and contributes to tumor progression via Akt/Erk activation and epithelial mesenchymal transition. (will be submitted to Journal of Cancer Research and Clinical Oncology: IF = 3.141).

1.9 Marutpong Detartya, Sriwipa Chuangchaiya, Kanlayanee Sawanyawisuth, Lukkana Sukprasert, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham, Atit Silsirivanit. Polypeptide GalNAc-transferase 5 regulates progression of cholangiocarcinoma via expression of Vicia villosa-binding glycans (will be submitted to Oncology Research; IF = 1.74)

2. ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและระดับนานาชาติ (poster and oral presentation) รวม 23 เรื่อง ดังนี้

2.1 การประชุม 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology. 9-12 December, 2014. School of Life Science and School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad, India.

- Chatchai Phoomak, *et. al*. Roles of O-GlcNacylation on the progression of cholangiocarcinoma
- Somsiri Indramanee, *et. al*. Association of Lewis Y expression in progression of cholangiocarcinoma

2.2 การประชุมสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วทท) ครั้งที่ 40 “Science and Technology towards ASEAN Development” ระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิด จ. ขอนแก่น

- Chatchai Phoomak, *et. al*. Elevation of global o-GlcNAcylated proteins associated with cholangiocarcinoma metastasis.

2.3 การประชุมวิชาการ International conference on Research and Social Devotion in commemoration of 50th anniversary of Khon Kaen University, Thailand (มหาวิทยาลัยขอนแก่นครบรอบ 50 ปี) ระหว่างวันที่ 22-23 มกราคม 2558 ณ อาคารพจน์ สารสิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

- Chatchai Phoomak, *et. al*. Up-regulation of O-GlcNAcylation modulated cholangiocarcinoma metastasis.

2.4 การประชุม Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for cancer research ระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 ณ ห้องประชุม อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- Chatchai Phoomak *et. al*. Induction of O-GlcNAcylation by glucose is associated with metastasis of cholangiocarcinoma.

2.5 การประชุม 40th ANNUAL CONFERENCE OF THE MALAYSIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 10 -11 June 2015, Putrajaya Marriott Hotel, Malaysia.

- Somsiri Indramanee *et. al*. High expression of fucosylated glycoconjugates in tumor tissues related to poor prognosis of cholangiocarcinoma patients.

2.6 การประชุม 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association "From collaboration to integration: Cancer researches for patients' benefit” 8-10 October 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

- Kanlayanee Sawanyawisuth, Kwuntida Uthaisar, Sumalee Obchoei, Kulthida Vaeteewoottacharn, Seiji Okada, Sopit Wongkham. Annexin A1 promotes cholangiocarcinoma aggression. (*ได้รับ travel grant award*)
- Sopit Wongkham, Sirinapa Sribenja, Nichapavee Natthasirikul, Kulthida Vaeteewoottacharn, Patcharee Jearanaikoon, Chaisiri Wongkham. 5-fluorouracil treatment induced Tβ10 and ABC transporters expression in cholangiocarcinoma cells.

2.7 การประชุม 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

- Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham. High glucose boosts the metastatic ability of high metastasis cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation (*ได้รับรางวัล Outstanding poster presentation*)
- Marutpong Detarya, Sriwipa Chuangchaiya, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham. Expression of GalNAc-containing glycoconjuates and GalNAc-transferases in cholangiocarcinoma. (*ได้รับรางวัล Good poster presentation*)

2.8 การประชุมวิชาการ Frontier for Cancer Research II หัวข้อ Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications ในวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- ผศ.ดร.กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ และคณะ นำเสนอเรื่อง Fucosyltransferase-1 promotes cholangiocarcinoma progression

2.9 การประชุมวิชาการ The Cholangiocarcinoma Foundation 2017 Annual Conference ในวันที่ 1-3 กุมภาพันธ์ 2560 ณ Salt Lake City, Utah, ประเทศสหรัฐอเมริกา

- Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. High glucose augments the metastatic ability of highly metastasis cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation.

2.10 การประชุมวิชาการ The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association ระหว่างวันที่ 28 – 30 กันยายน 2560 ณ PACIFICO YOKOHAMA เมือง Yokohama ประเทศญี่ปุ่น ได้รับ Travel grant ทั้ง 4 เรื่อง

- Kanlayanee Sawanyawisuth, Waraporn Saentaweesuk, Atit Silsirivanit, Kulthida Vaeteewoottacharn, Chawalit Pairojkul, Ubon Cha'on, Somsiri Indramanee, Somchai Pinlaor , Thidarut Boonmars, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. GalNAcylated glycans specific to *Sophora japonica* agglutinin: Values for diagnosis and prognosis of cholangiocarcinoma.
- Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit, Kanlayanee Sawanyawisuth, Kulthida Vaeteewoottacharn, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham. O-GlcNAcylation promotes metastasis of cholangiocarcinoma cells via suppression of FOXO3 expression

- Somsiri Indramanee, Kanlayanee Sawanyawisuth, Atit Silsirivanit, Paweena Dana, Chatchai Phoomak, Chaisiri Wongkham, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Sopit Wongkham. Alpha-1, 2-fucosylated glycan promotes progression of cholangiocarcinoma via activation of Akt and Erk.
- Marutpong Detarya, Sriwipa Chuangchaiya, Lukkana Sukprasert, Atit Silsirivanit, Kanlayanee Sawanyawisuth, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 regulates growth and metastasis of cholangiocarcinoma

2.11 การประชุมวิชาการ 24th International Symposium on Glycoconjugates ระหว่างวันที่ 27 สิงหาคม -1 กันยายน 2560 ณ ICC Jeju, Jeju Island, ประเทศเกาหลีใต้

- Silsirivanit A, Saentaweesuk W, Wongkham C, Wongkham S., Serum GalNAc-associated glycan as a biomarker for diagnosis and prognosis of cholangiocarcinoma.
- Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit, Dayoung Park, Kanlayanee Sawanyawisuth, Kulthida Vaeteewoottacharn, Chaisiri Wongkham, Carlito B. Lebrilla, Sopit Wongkham. Elevation of O-GlcNAcylation enhances progression of cholangiocarcinoma cells นำเสนอแบบ Poster and oral presentation from selected poster (*ได้รับรางวัล Poster award จาก International Glycoconjugate Organization, IGO*)

2.12 การประชุมวิชาการ โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (RGJ - Ph.D. Congress) ครั้งที่ 18 ระหว่างวันที่ 8-10 มิถุนายน 2560 ณ โรงแรมริชมอนด์ สไตลิช คอนเวนชั่น จังหวัดนนทบุรี

- Marutpong Detarya, Atit Silsirivanit, Kanlayanee Sawanyawisuth, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 regulates GalNAc-associated glycans expression and facilitates growth and metastasis of cholangiocarcinoma. (*ได้รับรางวัล outstanding oral presentation*)

2.13 การประชุม Frontier in Cancer Research III: “Translational Research: From Bench to Patients” วันจันทร์ที่ 31 กรกฎาคม 2560 ณ ห้องบรรยาย 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- ผศ.ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ และคณะ นำเสนอเรื่อง Targeting the glycosylation in Cholangiocarcinoma

2.14 การประชุมวิชาการ 25 ปี “ชีวเคมีทางการแพทย์” สู่“ชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล” วันที่ 1 สิงหาคม 2560 ณ ห้องบรรยาย 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- Somsiri Indramanee, Kanlayanee Sawanyawisuth, Atit Silsirivanit, Paweena Dana,Chatchai Phoomak, Chaisiri Wongkham, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Sopit Wongkham. Alpha-1, 2-fucosylated glycan promotes progression of cholangiocarcinoma via activation of Akt and Erk.
- Marutpong Detarya, Sriwipa Chuangchaiya, Chatchai Phoomak, Lukkana Sukprasert, Kanlayanee Sawanyawisuth, Sopit Wongkham, Atit Silsirivanit,Chaisiri Wongkham. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 regulates GalNAc-associated glycans expression and

promotes metastasis of cholangiocarcinoma via activation of pAKT and pERK signaling pathway. (*ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยระดับดีเด่น แบบโปสเตอร์ ระดับปริญญาเอก*)

- Waraporn Saentaweesuk, Norie Araki, Atit Silsirivanit, Kulthida Vaeteewoottacharn, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. Metastasis-associated SJA-GalNAcylated glycan and protein profile in cholangiocarcinoma.

3. บัณฑิตศึกษา

ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาเอก จำนวน 4 คน ได้แก่

1. ดร. ฉัตรชัย ภู่มาก ดุษฎีบัณฑิต คปก. ปัจจุบันเป็นนักวิจัยหลังปริญญาเอก ภายใต้การดูแลของ ศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ
2. น.ส.วรพร แสนทวีสุข สอบป้องกันวิทยานิพนธ์แล้ว เมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์เพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของบัณฑิตวิทยาลัย
3. น.ส.สมสิริ อินทรมณี สอบป้องกันวิทยานิพนธ์แล้ว เมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์เพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของบัณฑิตวิทยาลัย
4. นายมารุตพงศ์ เดชอาญา นักศึกษา คปก. อยู่ในระหว่างการศึกษา

4. ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย

4.1 ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์

- ได้รับคัดเลือกเพื่อเข้าฝึกอบรม the Newton Fund Professional Development Programme for Mid-Career Researchers ระหว่างวันที่ 16-18 มีนาคม 2558 (ในประเทศไทย) และระหว่างวันที่ 23-27 มีนาคม 2558 (ณ ประเทศอังกฤษ) โดยได้รับทุนจากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย ประเทศไทย และ The British Council ประเทศอังกฤษ
- ได้รับเชิญเป็นวิทยากรรับเชิญ บรรยายเรื่อง “Targeted treatment in cholangiocarcinoma” ในการประชุมวิชาการ The 6th Medical Microbiology Conference 2016 วันที่ 12 พฤษภาคม 2559 ณ ห้องประชุม 1 ชั้น 4 อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- เดินทางไปเจรจางานวิจัยกับนักวิจัย Kumamoto University ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 19-21 มีนาคม 2560 (ร่วมกับ ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย และ ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์)

5. การได้รับเชิญเป็นวิทยากร การได้รับรางวัล

1. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิรวานิชย์ ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “Expression of N-acetyl Galactosamine-associated Glycans Indicates Pathological Changes of Biliary Epithelia and Cholangiocarcinoma ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559

2. ดร. ฉัตรชัย ภู่มาก ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “High Glucose Enhances Aggressiveness of Cholangiocarcinoma Cells” ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559
3. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้รับรางวัล ผลงานวิจัยดีเด่น ประเภท Biomedical Research กลุ่มอายุไม่เกิน 40 ปี เรื่อง “Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kappa B. Scientific Reports 2016; 6: 27853
4. ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ ได้รับโล่นักวิจัยที่มีผลงานด้านการวิจัย ระดับดีเยี่ยม สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ประจำปี พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

ความร่วมมือด้านการวิจัย ในโครงการวิจัยร่วม 3 ประเทศ ภายใต้โครงการ Development of an innovative diagnostic system against liver fluke infection in Southeast Asian countries (ทุน e-Asia) โดยมี Prof. Hisashi Narimatsu, Glycoscience and Glycotechnology Research Group, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายญี่ปุ่นและ ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายไทย ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

- ภายใต้ความร่วมมือนี้ทำให้คณะผู้วิจัยมีโอกาสศึกษาเปรียบเทียบ tumor marker ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชาวญี่ปุ่น ไทยและลาว โดยบริษัท Sysmex ประเทศญี่ปุ่น ได้เอื้อเฟื้อเครื่องตรวจวิเคราะห์ พร้อมน้ำยาให้กับโครงการ
- ภายใต้ความร่วมมือนี้ทำให้ นส. พัชราภรณ์ บุตตะนันท์ ได้รับทุน Monbukagakusho: MEXT 2017 เพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ Tsukuba University โดยมี Prof. Hisashi Narimatsu และ Assoc. Prof. Kiyohiko Angata เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา
- ภายใต้ความร่วมมือนี้ ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ พร้อมด้วย ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย และ ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้รับการฝึกอบรมการทำ Immunoglobulin class switching ที่ AIST, Tsukuba, Japan เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ระหว่างวันที่ 11-25 มีนาคม 2560)

แผนงานวิจัยที่ 2 มุ่งเป้าที่กระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism)

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากพบอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้อัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งจากการได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดหรือยาเคมีบำบัดยังอยู่ในระดับต่ำซึ่งเป็นผลจากการแพร่ลุกลามของมะเร็งและการดื้อยาเคมีบำบัด ซึ่งหากเราทราบปัจจัยหรือกลไกที่ส่งเสริมคุณสมบัติการแพร่ลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี ก็จะสามารถนำใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาหรือเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้

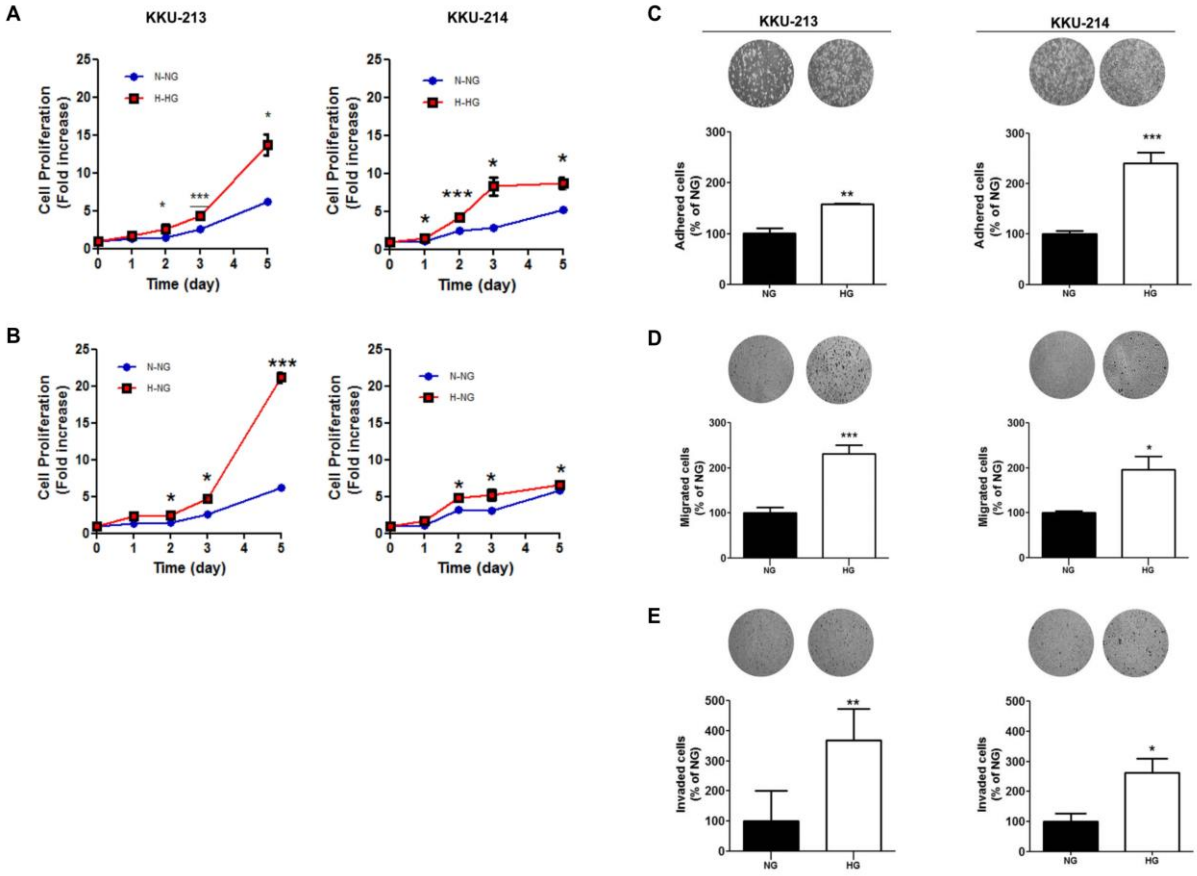
แผนงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาบทบาทของกลูโคสและบทบาทของโปรตีนในวิถีไกลโคไลซิสต่อการแพร่ลุกลามของโรคมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อนำความรู้ดังกล่าวไปพัฒนาแนวทางการรักษาแบบมุ่งเป้าในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ประกอบด้วย 4 โครงการย่อย

โครงการที่ 1 ผลของระดับกลูโคสในสภาวะเบาหวานต่อ การเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และการต้านการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

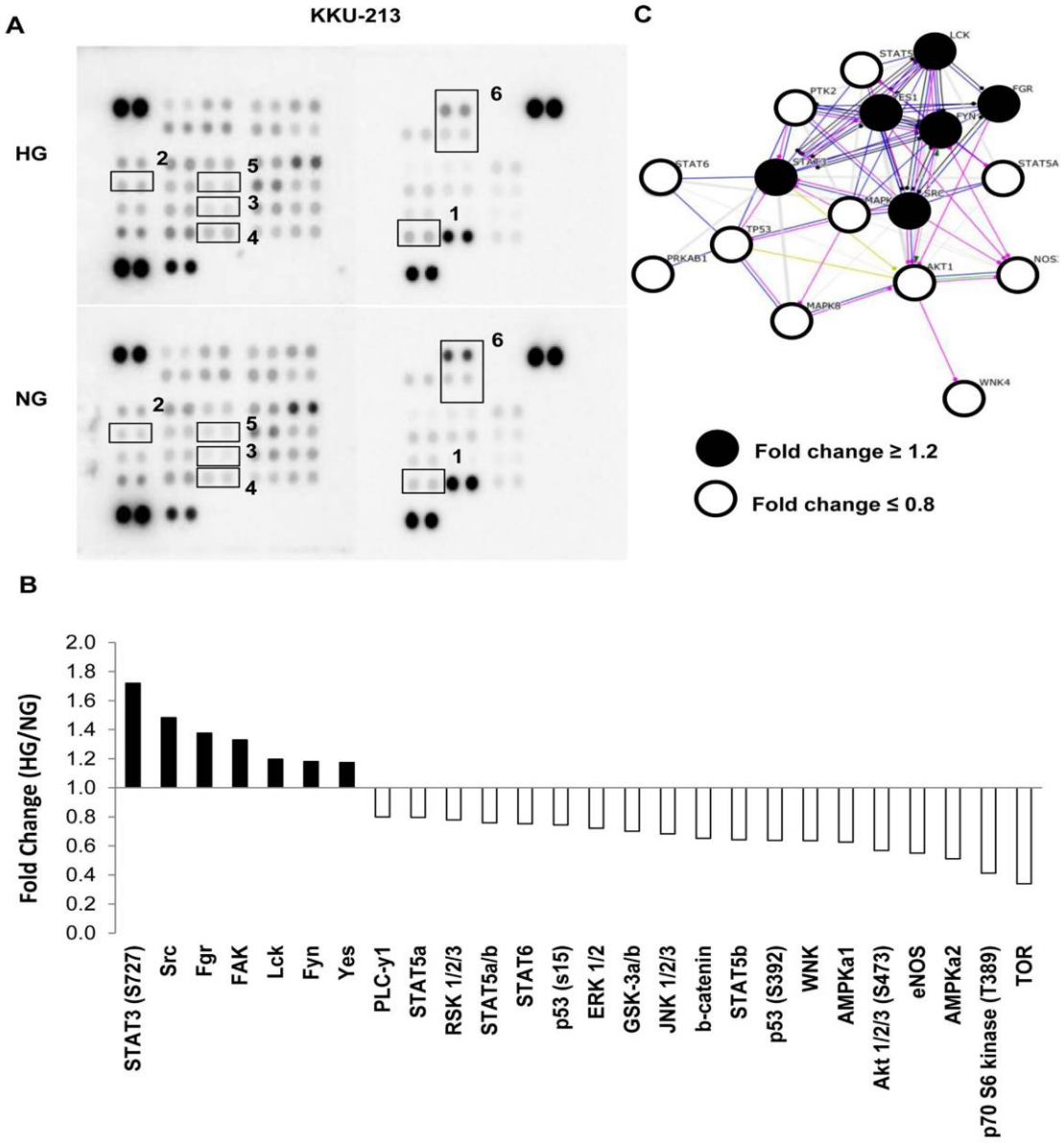
รายงานการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการลุกลามของโรคมะเร็ง พบว่าสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) หรือ โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการแพร่ลุกลามของโรคมะเร็งหลายชนิด ผลการศึกษาในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง และสัตว์ทดลอง พบว่าภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงทำให้เซลล์มะเร็งมีการแพร่ลุกลามมากขึ้น ทั้งในด้านการเจริญเติบโต การบุกรุกเนื้อเยื่อข้างเคียง และการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น นอกจากนี้พบรายงานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสโดยเฉพาะวิถีไกลโคไลซิสกับการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆด้วย โรคเบาหวานเป็นโรคที่พบอุบัติการณ์และอัตราการตายสูงที่สุดในประเทศไทยที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งข้อมูลทางระบาดวิทยาโดยคณะผู้วิจัยพบว่าประมาณ 60% ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) หรือสภาวะเบาหวาน (diabetes mellitus) ร่วมด้วย และจากข้อมูล transcriptomic analysis ของเนื้อเยื่อมะเร็งผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี บ่งชี้ถึงการแสดงออกที่มากกว่าปกติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้กลูโคสในวิถีไกลโคไลซิส เช่น glucose transporter, lactate dehydrogenase และ monocarboxylate dehydrogenase (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE32225 และ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26566) แสดงว่ากระบวนการใช้กลูโคสในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีน่าจะผิดปกติ

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงนำมาสู่การตั้งสมมติฐานว่า สภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและการสร้างพลังงานจากน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งเสริมการลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี โครงการนี้ โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับกลูโคสในสภาวะเบาหวานต่อการเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และการต้านการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และศึกษากลไกระดับชีวโมเลกุลของกลูโคสที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย transcriptomics techniques

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทดสอบผลของสภาวะน้ำตาลสูง (High glucose condition) ต่อการแพร่ลุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยปรับสภาพการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 และ KKU-214 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูง (Glucose = 25 mM, HG cells) และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลปกติ (Glucose = 5.6 mM, NG cells) และทำการวัดระดับการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง KKU-213 และ KKU-214 ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ HG มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่าในสภาวะ NG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2-1A) ซึ่งพบผลการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อทำการทดสอบเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จาก NG ไปเป็น HG (H-NG) (รูปที่ 2-1B) ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกเลี้ยงใน HG จะมีอัตราการแพร่กระจายทั้งในด้าน migration, invasion และ adhesion สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ NG cells (รูปที่ 2-1C-E ตามลำดับ)



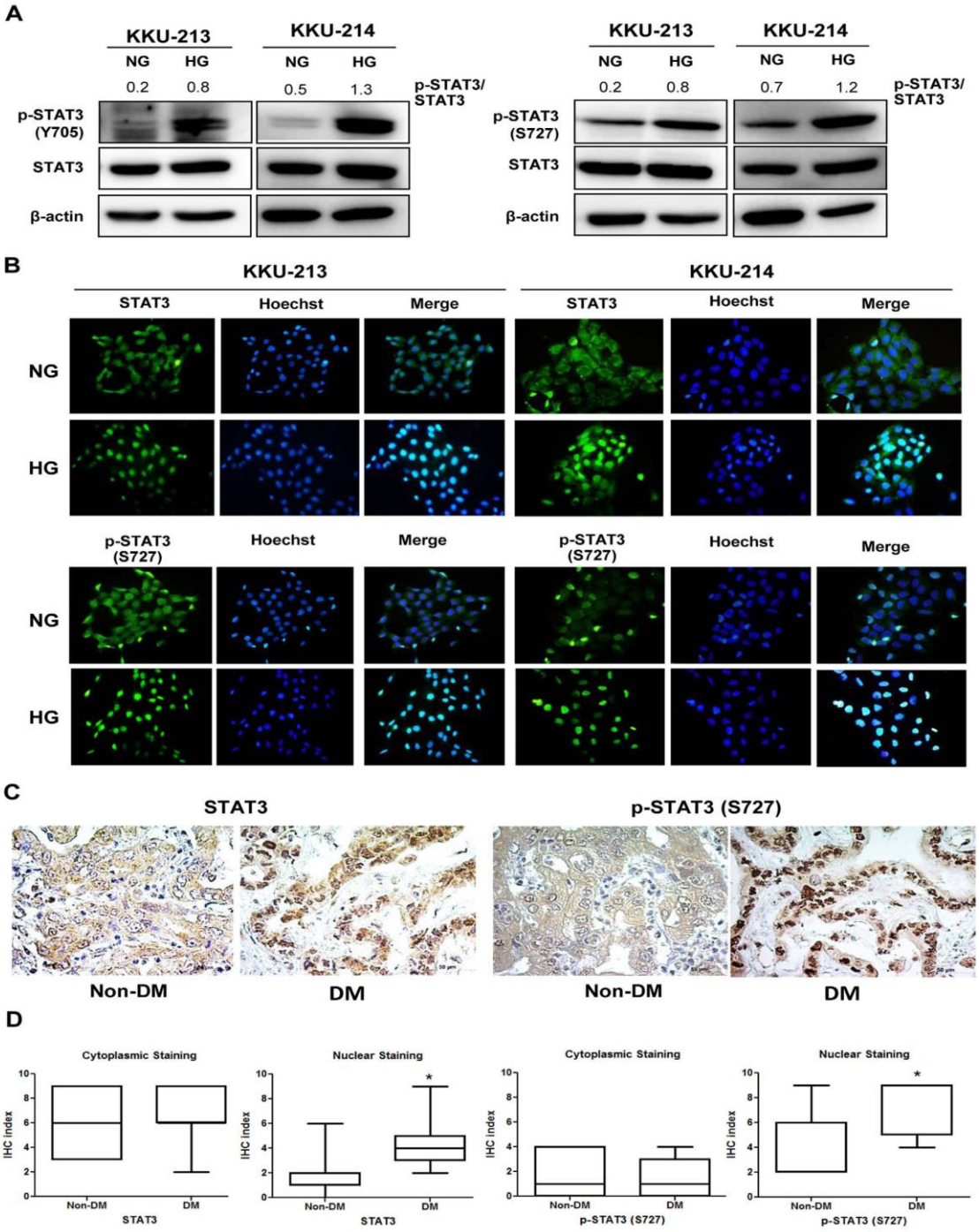
<u>รูปที่ 2-1</u> สภาวะน้ำตาลสูง (High glucose condition) กระตุ้นการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (A-B), ผลสภาวะน้ำตาลสูง (HG) น้ำตาลปกติ (NG) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี; (C) adhesion assay, (D) migration assay, (E) invasion assay *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001.



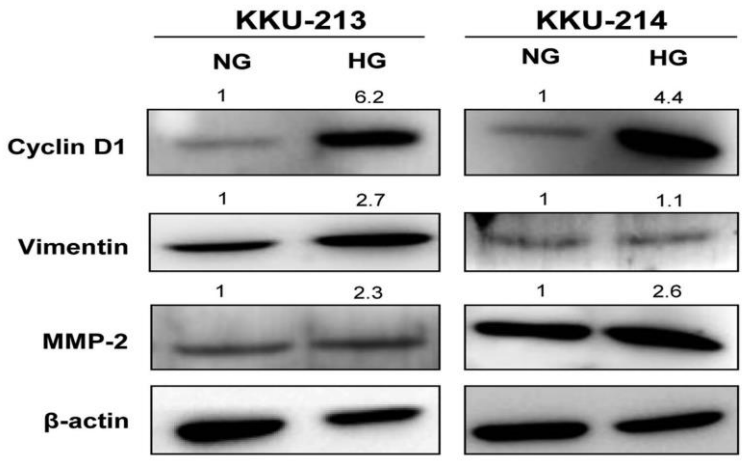
<u>รูปที่ 2-2</u> รูปแบบของ phosphorylated protein ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง และน้ำตาลปกติ (A) การแสดงออกของ phosphorylated protein ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง และน้ำตาลปกติถูกตรวจวัดโดย Human Phospho-Kinase Antibody Array; (B) ระดับการแสดงออกของ phosphorylated protein (HG/NG); (C) การศึกษา protein interaction prediction โดยโปรแกรม String 9.1 (string-db.org) ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง คือ STAT3. SFK= Src Family Kinases, FAK= focal adhesion kinase; 1= STAT3 (S727), 2= Src, 3= Fgr, 4= FAK, 5= Lck, 6= p53.

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกทางชีววิทยาโมเลกุลในการกระตุ้นการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง โดยใช้เทคนิค Human Phospho-Kinase Antibody Array (R&D system, Minneapolis, MN) ซึ่งสามารถวัดระดับการแสดงออกของ phosphorylated protein ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งจำนวน 46 ชนิด เช่น AKT, EGFR, STAT3, p38 และ p53 เป็นต้น ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2-2 พบระดับการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 26 ชนิด ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ HG/NG โดยมีโปรตีนจำนวน 7 ชนิดที่ระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น และ 14 ชนิดมีระดับการแสดงออกลดลง และเมื่อศึกษาหา protein interaction prediction โดยโปรแกรม String 9.1 (www.string-db.org) พบว่าโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง คือ STAT3 pathway ซึ่งสามารถทดสอบยืนยันผลได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 และ KKU-214 และพบผลที่สอดคล้องกันในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี กล่าวคือเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (DM; FBG $\geq$126 mg/dL) มี phosphorylation ของ STAT3 และ nuclear translocation ของ STAT3 สูงกว่าเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดปกติ (non DM; FBG <126 mg/dL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2-3) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่อยู่ภายใต้การกระตุ้นของ STAT3 pathway และเกี่ยวข้องกับการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ cyclin D1, vimentin และ MMP2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 และ KKU-214 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับน้ำตาลสูง (รูปที่ 2-4)

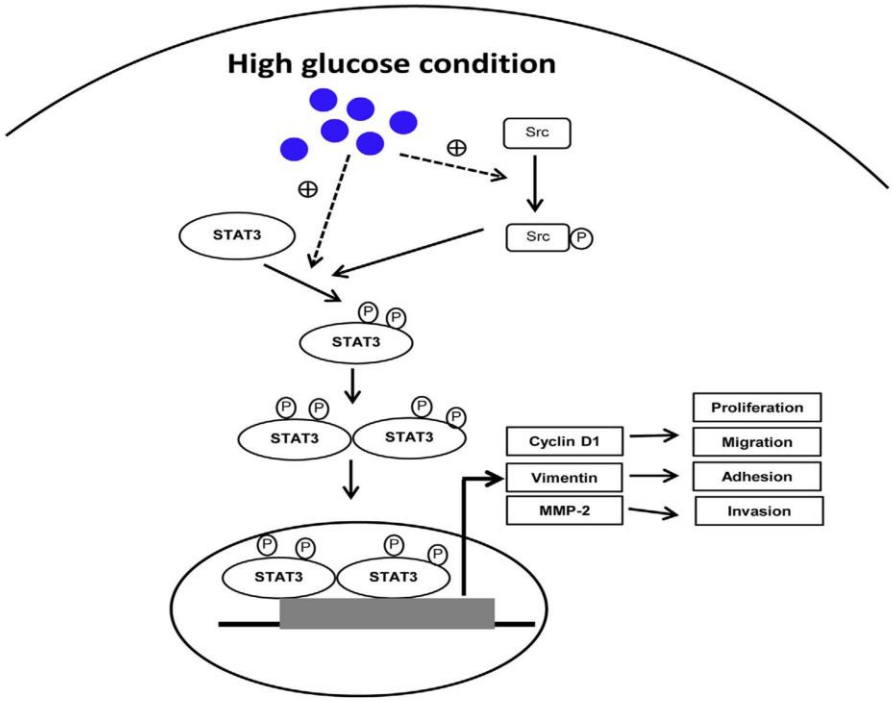
ผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่าสภาวะน้ำตาลสูงสามารถเพิ่มความสามารถในการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ทั้งในด้านการเจริญเติบโตและการแพร่กระจาย โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของ STAT3 pathway ซึ่งส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องการกับการแพร่กระจาย เช่น cyclin D1, vimentin และ MMP2 ดังแสดงในรูปที่ 2-5



<u>รูปที่ 2-3</u> สภาวะน้ำตาลสูงเพิ่มระดับ phosphorylation และ nuclear translocation ของ STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) ระดับการแสดงออกของ p-STAT3 ที่ตำแหน่ง Y705 และ S727 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 และ KKU-214 ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง (HG) และน้ำตาลปกติ (NG); (B) Nuclear localization ของ STAT3 และ p-STAT3 (S727)-Hoechst staining (สีน้ำเงิน), STAT3 และ p-STAT3 (สีเขียว); (C และ D) ระดับการแสดงออกของ STAT3 และ p-STAT3 (S727) ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ที่มีระดับน้ำตาลในระดับเบาหวาน (DM ; FBG ≥126 mg/dL) และระดับน้ำตาลปกติ (no DM; FBG <126 mg/dL).



รูปที่ 2-4 การแสดงออกของโปรตีนที่ถูกควบคุมผ่าน STAT3 pathway ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง (HG) และน้ำตาลปกติ (NG).

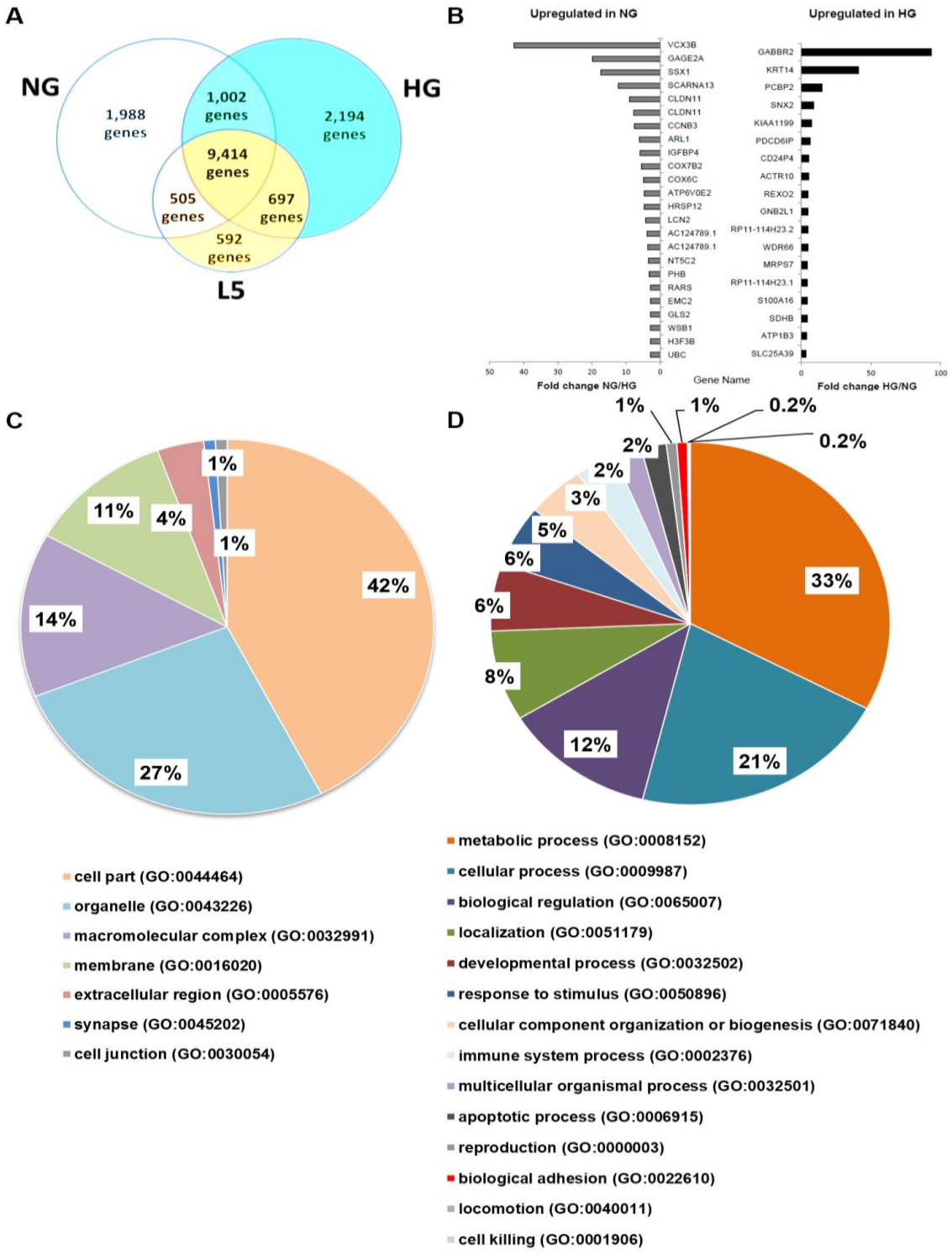


รูปที่ 2-5 กลไกในระดับชีวโมเลกุลที่อธิบายการเพิ่มการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีภายใต้สภาวะระดับน้ำตาลสูง

<u>โครงการที่ 2 กลไกระดับชีวโมเลกุลของกลูโคสที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย transcriptomics techniques</u>

จากผลการทดลองในโครงการที่ 1 แสดงให้เห็นถึงบทบาทของสภาวะน้ำตาลสูง (high glucose, HG) ต่อการกระตุ้นการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในโครงการนี้คณะผู้วิจัยได้ใช้ high throughput techniques คือ RNA-seq (RNA sequencing) ในการศึกษากลไกทางชีวโมเลกุลของเซลล์ในภาวะ HG ที่สามารถกระตุ้นการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA และ non-coding RNA ต่าง ๆภายในเซลล์โดยการทำ RNA-seq การศึกษานี้ได้รับความร่วมมือจาก Associate Professor Marie-Claude Gingras จากสถาบัน Human Genome Sequence Center, Baylor College of Medicine, Houston, USA.

ผลการเปรียบเทียบ RNA-seq ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลสูง (HG) และใน สภาวะน้ำตาลปกติ (NG) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2-6 กล่าวคือยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ที่มีการแพร่รุกรานสูง, KKU-213L5 และเซลล์ต้นแบบ KKU-213 ที่เลี้ยงในสภาวะ HG มีจำนวน 734 isoforms (697 ยีน) (รูปที่ 2-6A) เมื่อจัดระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่เลี้ยงในสภาวะ HG แล้วพบว่า gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 2 (GABBR2) เป็นยีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุด ส่วน variable Charge, X-Linked 3B (VCX3B) เป็นยีนที่มีระดับการแสดงออกลดลงสูงสุด ตามลำดับ (รูปที่ 2-6B) โดยยีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนไปนั้นจะแสดงออกในส่วนต่าง ๆของเซลล์ (รูปที่ 2-6C) และส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเมแทบอลิซึมและกระบวนการต่าง ๆของเซลล์ (รูปที่ 2-6D) ขณะนี้อยู่ในระหว่างสั่งแอนติบอดีเพื่อทำการยืนยันผลในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีภาวะน้ำตาลสูงหรือต่ำต่อไป



<u>รูปที่ 2-6</u> ผลการหาการแสดงออกของยีนในระดับ RNA โดยเทคนิค RNA-seq ระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในสภาวะ NG และ HG (A) จำนวนยีนที่มีการแสดงออกในสภาวะ HG/NG, (B) รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น หรือ ลดลงในสภาวะ HG/NG, (C) cellular compartments, (D) biological functions.

<u>โครงการที่ 3 การแสดงออกของยีนในวิถีไกลโคไลซิสในมะเร็งท่อน้ำดี และความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี</u>

เป็นที่ทราบกันดีว่าเซลล์มะเร็งจะปรับเปลี่ยนระบบการสร้างพลังงานจาก Oxidative phosphorylation เป็นไกลโคไลซิส หรือที่รู้จักกันดีว่า Warburg effect ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของไอโซฟอร์มของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิสที่พบในภาวะมะเร็งหลายชนิดที่อาจเป็นเป้าหมายในการต่อต้านมะเร็งได้ คณะผู้วิจัยได้ทบทวนวรรณกรรมและการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนในฐานข้อมูลแบบ High throughput assay (cDNA microarray และ Serial analysis of gene expression, SAGE) ของมะเร็งท่อน้ำดี และคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในวิถีไกลโคไลซิส ได้แก่ (glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2) และ lactate dehydrogenase A (LDHA) เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี immunohistochemistry

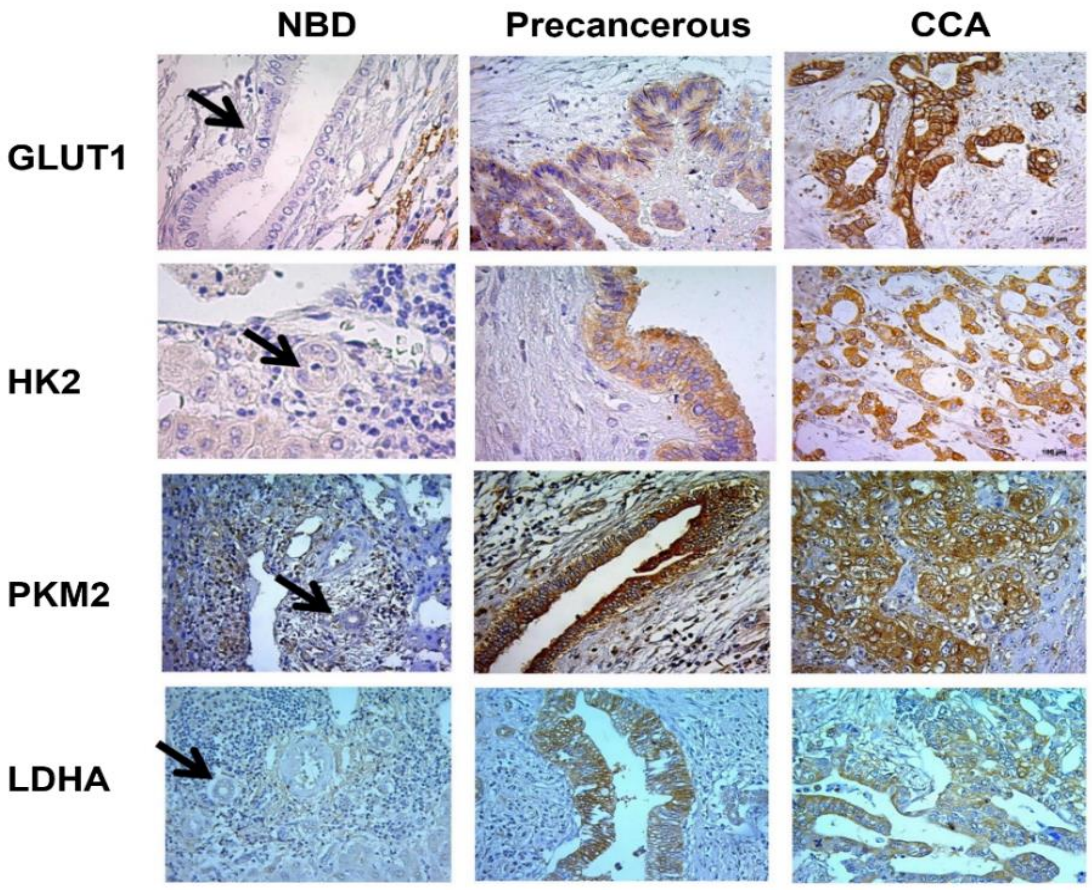
ผล immunohistochemistry แสดงว่าเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA โดยโปรตีนทั้ง 4 ชนิดมีการแสดงออกต่ำในเซลล์ท่อน้ำดีปกติ (normal bile duct epithelium, NBD) และจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ชนิด precancerous (hyperplasia/dysplasia) และ มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) ตามลำดับ (รูปที่ 2-7) ซึ่งบ่งชี้ว่า GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็ง (carcinogenesis) ดังสรุปผลในตารางที่ 2-1 ซึ่งเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้ง 4 ชนิดในตับที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีด้วย N-Nitrosodimethylamine (NDMA) และพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*, *O. viverrini*) พบว่าการแสดงออกของยีนทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะเดียวกับที่พบในผู้ป่วยคือ ไม่พบหรือพบต่ำในท่อน้ำดีปกติ พบมากขึ้นเมื่อเกิดพยาธิสภาพของท่อน้ำดี (precancerous) และเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (รูปที่ 2-8)

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA กับลักษณะอาการของคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ univariate analysis และความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพของผู้ป่วยโดยใช้ Kaplan Meier และ Log-Rank test ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีการแสดงออกของ GLUT1 หรือ LDHA สูงจะมีอัตรารอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ GLUT1 ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 2-9) โดยอัตรารอดชีพเฉลี่ยในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ GLUT1 สูง = 202 ± 29 วัน และของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ GLUT1 ต่ำ = 416 ± 91 วัน ตามลำดับ และอัตรารอดชีพเฉลี่ยในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ LDHA สูง = 167 ± 35 วัน และของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ LDHA ต่ำ = 308 ± 32 วัน

2. ระดับการแสดงออกของ GLUT1 และ PKM2 สัมพันธ์กับลักษณะอาการของคลินิกที่รุนแรงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ histological type และ tumor size (ตารางที่ 2-2)

จากผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการใช้ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA เป็น prognostic marker และ/หรือ เป็นเป้าหมายในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

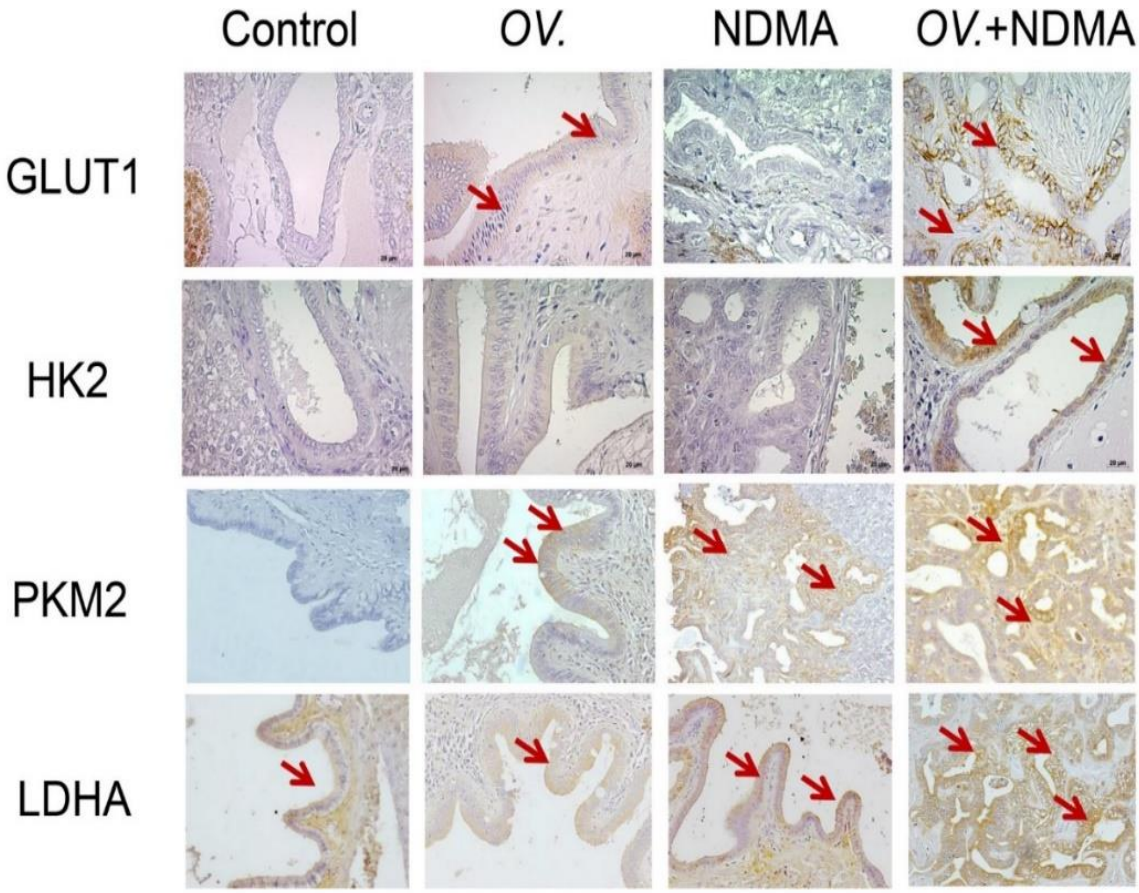


<u>รูปที่ 2-7</u> การแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ในท่อน้ำดีปกติ (normal bile duct; NBD), precancerous และมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) ลูกศรสีดำแสดงเซลล์ท่อน้ำดีปกติ NBD = normal bile duct; CCA = cholangiocarcinoma

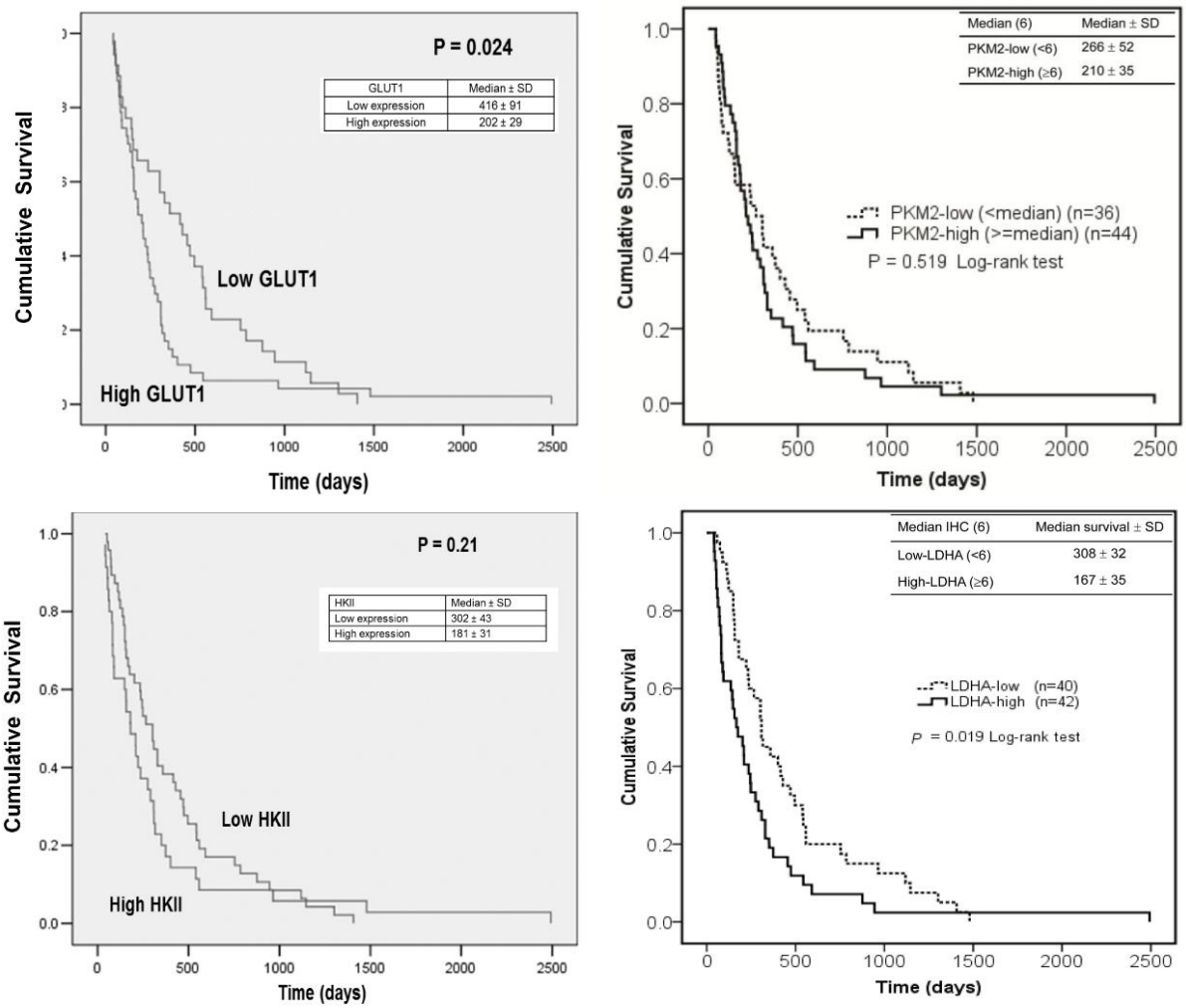
<u>ตารางที่ 2-1</u> การแสดงออกของโปรตีนในวิถีไกลโคไลซิสในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

Proteins	**Expression (%)**		
	Normal bile duct	**Hyperplasia/Dysplasia**	**CCA**
GLUT1	0	34	82
HK2	4	37	68
PKM2	25	71	92.5
LDHA	13	60	100

หมายเหตุ: glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2), lactate dehydrogenase A (LDHA)



<u>รูปที่ 2-8</u> การแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี ลูกศรสีแดงแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิด NBD = normal bile duct; OV = พยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchis viverrini); NDMA = N-Nitrosodimethylamine



<u>รูปที่ 2-9</u> ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ต่ออัตรารอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่ง Kaplan Meier analysis แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ GLUT1 และ LDHA มีความสัมพันธ์กับอัตรารอดชีพที่ลดลงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ($P < 0.05$).

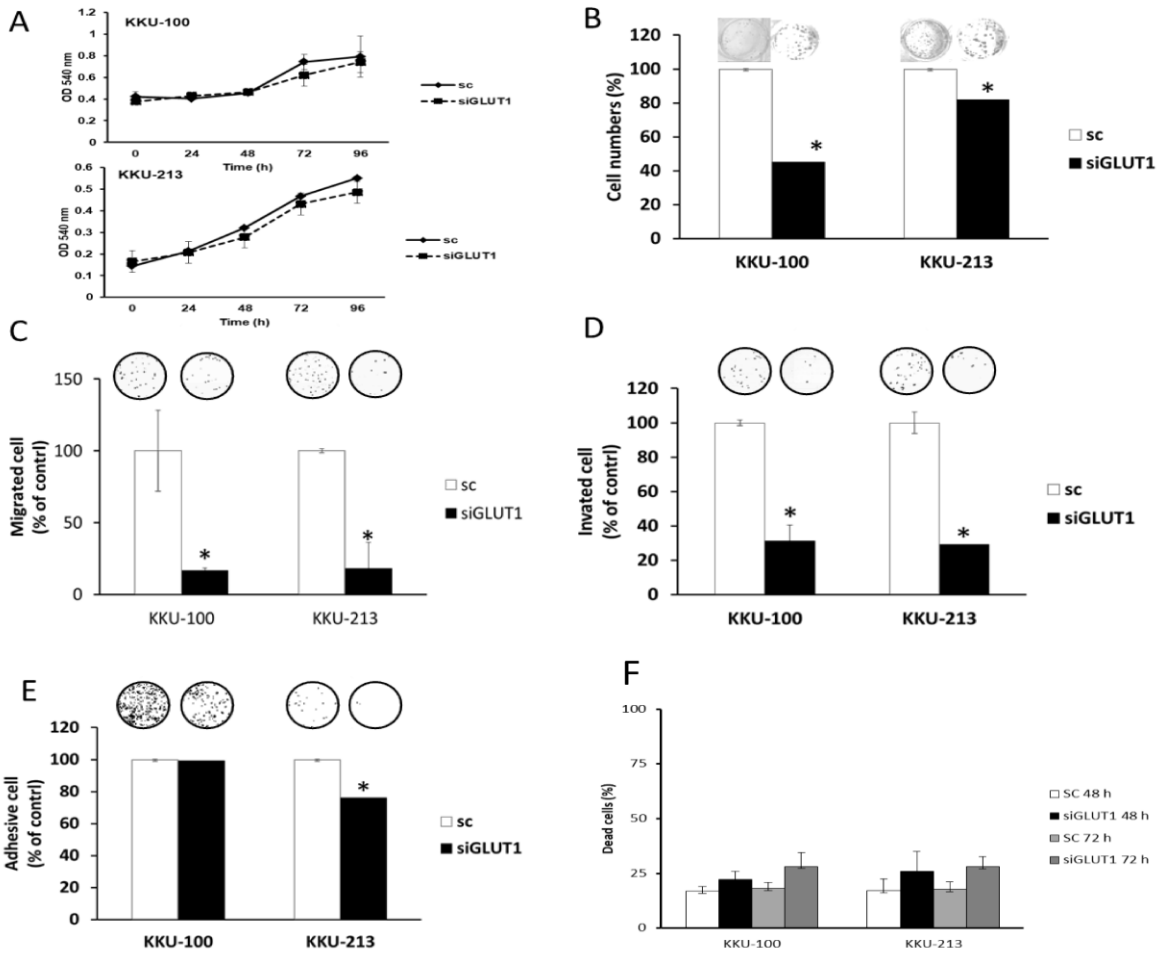
ตารางที่ 2-2 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ GLUT1, HK2, PKM2 และ LDHA ต่อการแสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

Variable		GLUT1			HK2			PKM2			LDHA		
		Low	**High**	**p-value**	**Low**	**High**	**p-value**	**Low**	**High**	**p-value**	**Low**	**High**	**p-value**
	<56	14	28	0.392	25	17	0.679	16	22	0.658	17	23	0.280
	≥56	17	23		22	18		20	22		23	19	
	Male	23	32	0.285	26	29	**0.009**	23	31	0.633	25	30	0.482
	Female	8	19		21	6		13	13		15	12	
	Non papillary	16	39	**0.020**	30	25	0.469	22	31	0.477	27	28	1.000
	Papillary	15	12		17	10		14	13		13	14	
	≥ 7	17	27	0.867	28	16	0.213	13	26	**0.047**	16	22	0.278
	< 7	14	24		19	19		23	18		24	20	
T stage	I	4	8	0.173	6	6	0.441	6	7	1.000	4	2	0.104
	II	3	8		5	6		4	5		7	3	
	III	8	21		20	9		13	16		18	15	
	IV	16	14		16	14		13	16		11	22	
Tumor stage	I/II	4	10	0.622	5	9	0.188	7	7	0.771	8	3	0.278
	III/IV	27	41		42	26		29	37		32	39	

<u>โครงการที่ 4 บทบาทของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิสต่อ การเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และการต้านการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี</u>

4.1 GLUT1

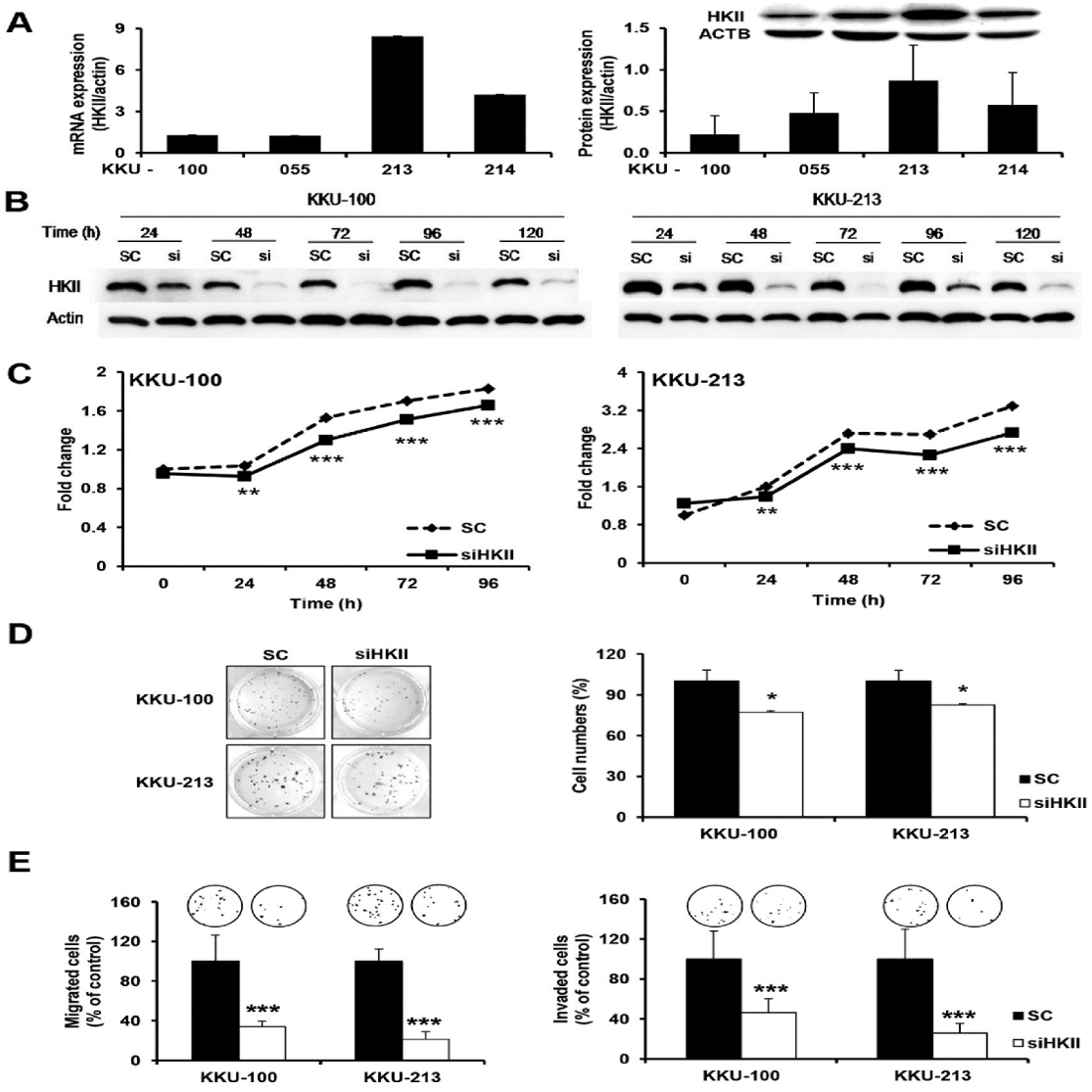
เนื่องจากมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ GLUT1 บ่งชี้ถึงบทบาทของ GLUT1 ในการส่งเสริมความเป็นมะเร็ง คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของ GLUT1 ต่อกระบวนการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-100 และ KKU-213 และลดการแสดงออกของ GLUT1 โดยใช้ siRNA ต่อ GLUT1 พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ GLUT1 สามารถยับยั้งความสามารถในการเจริญเติบโต (รูปที่ 2-10A, 10B) รวมถึงการเคลื่อนที่ (migration) และการแพร่กระจาย (invasion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้งแบบ และ (รูปที่ 2-10C, 10D) แต่ไม่มีผลต่อ adhesion และ apoptosis (รูปที่ 2-10E, 10F) ซึ่งแสดงว่า GLUT1 มีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติการแพร่ลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งการใช้ตัวยับยั้งจำเพาะต่อ GLUT1 สามารถเป็นหนึ่งทางเลือกในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแบบมุ่งเป้าได้



<u>รูปที่ 2-10</u> ผลของ siRNA-GLUT1 ต่อกระบวนการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (A) MTT assay, (B) clonogenic assay, (C) migration assay, (D) invasion assay, (E) adhesion assay, (F) dead assay. siRNA-GLUT1 (siGLUT1), scramble control (SC), *P < 0.05.

4.2 HK2

นอกจากผลของ GLUT1 ต่อกระบวนการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีดังกล่าวแล้ว การยับยั้งการแสดงออกของ HK2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-100 และ KKU-213 โดยใช้ siRNA-HK2 ให้ผลในทำนองเดียวกับ GLUT1 โดยพบว่า การลดการแสดงออกของ HK2 (รูปที่ 2-10B) สามารถลดความสามารถในการเจริญเติบโต (รูปที่ 2-10C, 10D) รวมถึงการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ (รูปที่ 12-10C, 10D) แต่ไม่มีผลต่อ adhesion และ apoptosis (รูปที่ 2-10E) ผลเหล่านี้สรุปได้ว่า HK2 มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่ลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี และการใช้ตัวยับยั้งจำเพาะต่อ HK2 อาจเป็นหนึ่งทางเลือกในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแบบมุ่งเป้าได้

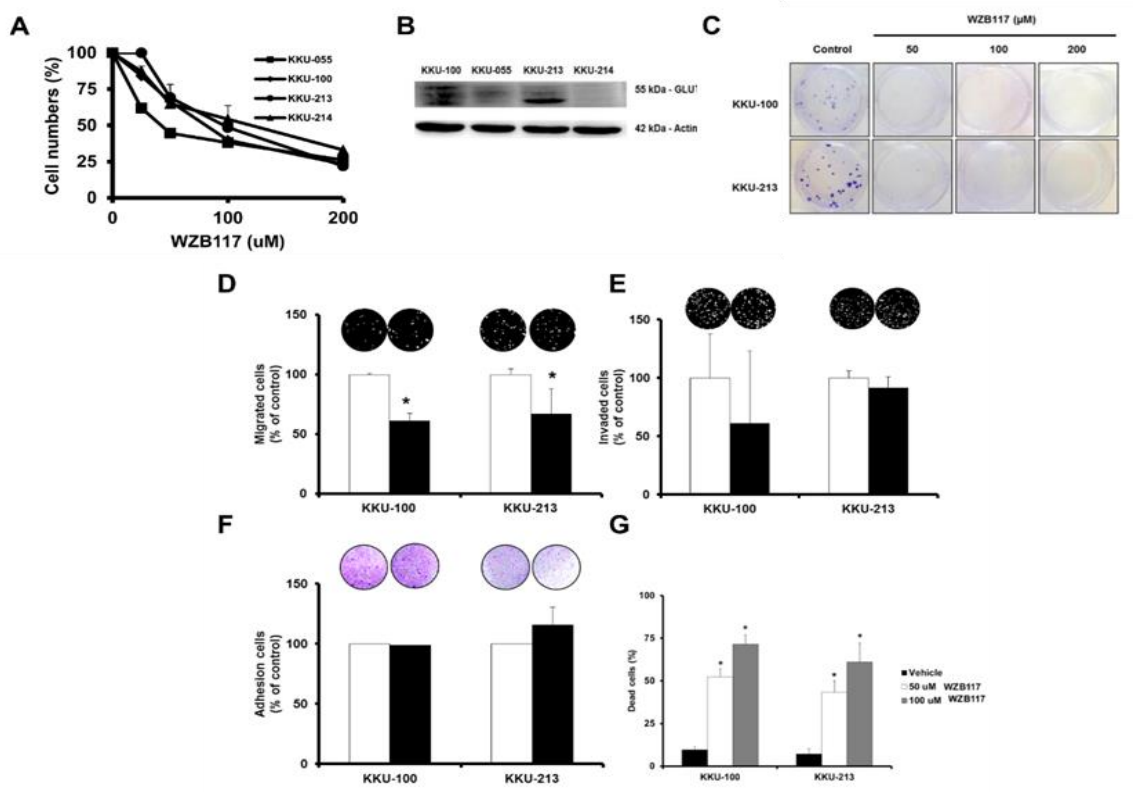


<u>รูปที่ 2-11</u> ผลของ siRNA-HK2 ต่อกระบวนการแพร่ลุกลามของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (A) การแสดงออกของ HK2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ในระดับ mRNA และโปรตีน, (B) ผลของ siRNA-HK2 ต่อการแสดงออกของ HK2 ในระดับโปรตีน, (C) MTT assay, (D) clonogenic assay, (E) migration assay และ invasion assay, scramble control (SC), *P < 0.05, ***P < 0.001.

<u>โครงการที่ 5 การใช้ Glycolytic enzyme inhibitors เป็นยาต้านมะเร็งท่อน้ำดี</u>

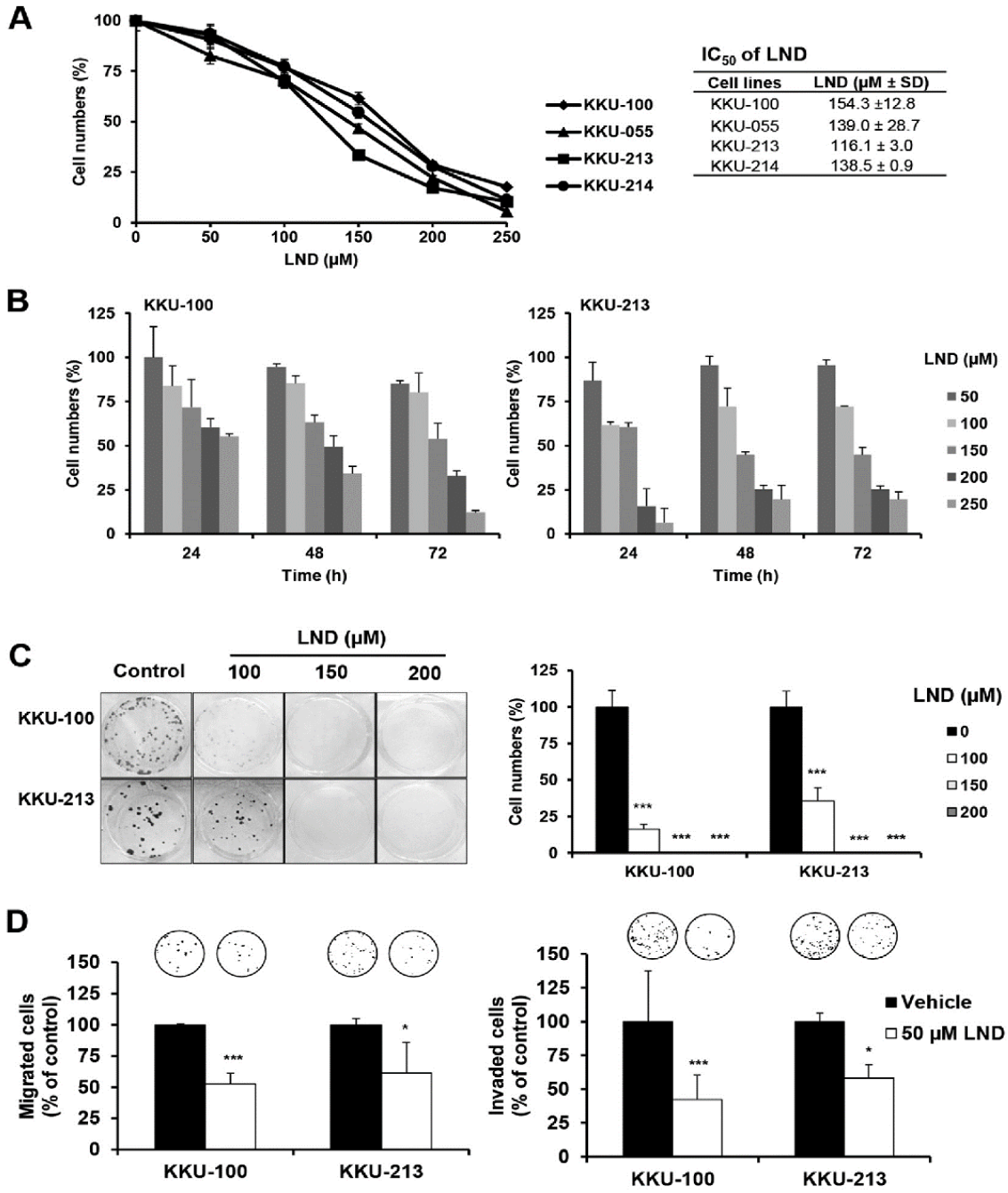
เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้ตัวยับยั้งจำเพาะต่อกลูโคสหรือวิถีไกลโคไลซิสในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาฤทธิ์ต้านมะเร็งของตัวยับยั้งจำเพาะต่อ tumor specific glycolytic enzymes ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ WBZ117 (GLUT1 inhibitor), lonidamine (HK2 inhibitor), shikonin (PKM2 inhibitor) และ oxamate (LDHA inhibitor) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการศึกษาในระดับห้องทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีหลายชนิด โดยเน้นเซลล์ชนิด KKU-100 เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาเคมีบำบัดเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีอื่น ๆที่ทดสอบ พบว่า WBZ117 (รูปที่ 2-12), lonidamine (รูปที่ 2-13) และ shikonin (รูปที่ 2-14) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านมะเร็งใน oxamate โดย shikonin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ดีมากที่สุด มี effective dose อยู่ในช่วง 0.5-2 μM

WBZ117 (GLUT1 inhibitor): สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ตามขนาดและเวลาที่ได้รับยา โดยค่า effective dose ของ WZB117 อยู่ในช่วง 25-200 μM นอกจากนี้ยังพบว่า WBZ117 สามารถยับยั้งการแพร่กระจาย และกระตุ้น apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ขึ้นกับความเข้มข้นของยา (รูปที่ 2-12)



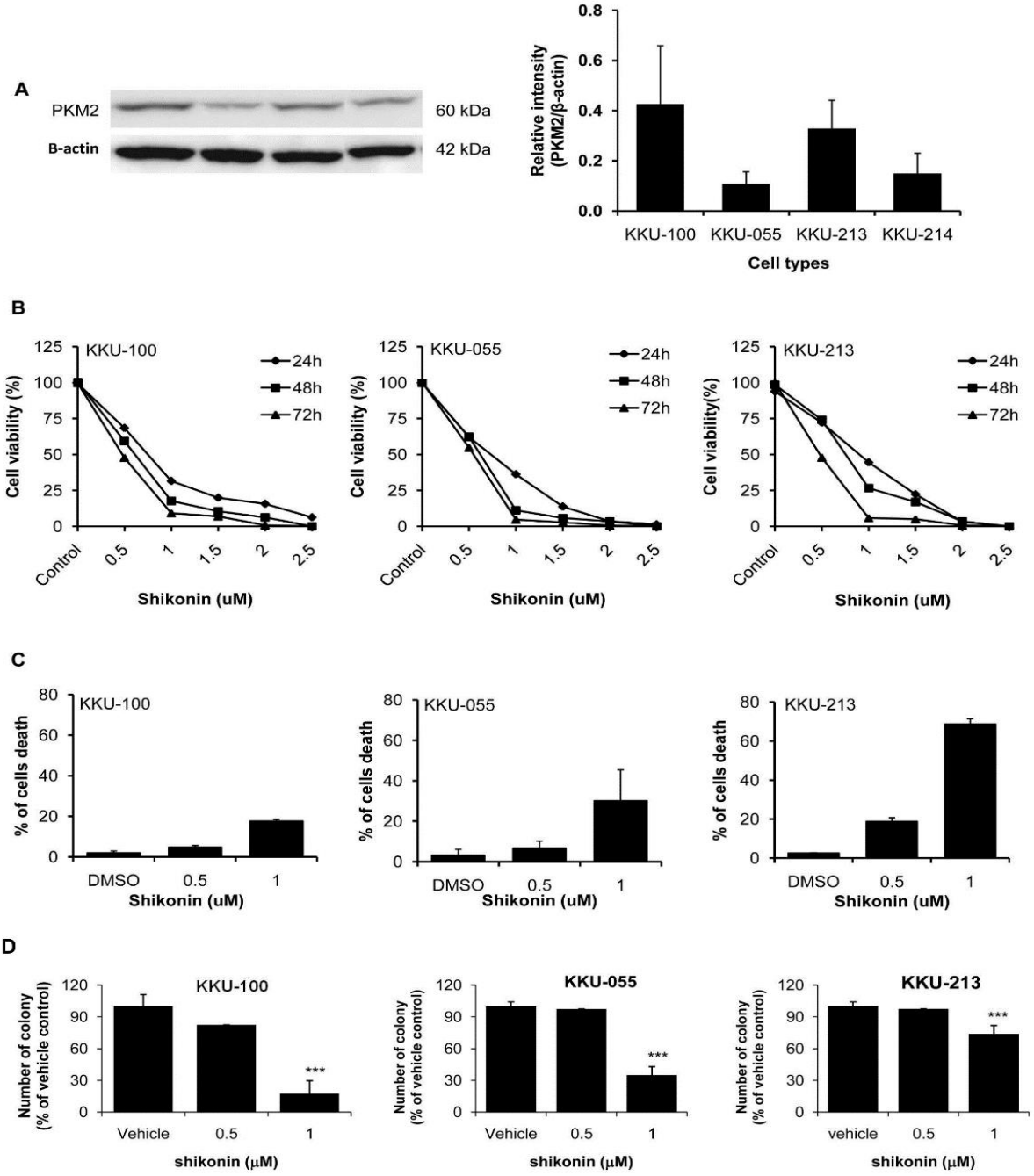
<u>รูปที่ 2-12</u> ผลของ WZB117, GLUT1 inhibitor, ต่อการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) MTT assay, (B) การแสดงออกของ GLUT1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโปรตีน, (C) Colony formation, (D) Cell migration, (E) invasion, (F) adhession, (G) cell dead, *P < 0.05.

Lonidamine (Hexokinase 2 inhibitor) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ตามขนาดและเวลาที่ได้รับยา โดย effective dose ของ lonidamine อยู่ในช่วง 150-250 µM นอกจากนี้ sub-lethal dose ของ lonidamine ยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้อีกด้วย (รูปที่ 2-13)



<u>รูปที่ 2-13</u> ผลของ lonidamie, HK2 inhibitor, ต่อการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี. (A-B) MTT assay, (C) Colony formation, (D) Cell migration และ invasion, *P < 0.05, ***P < 0.01.

Shikonin (PKM 2 inhibitor) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ตามขนาดและเวลาที่ได้รับยา รวมถึงกระตุ้นการตายและยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (รูปที่ 2-14) โดย eff ective dose ของ shikonin อยู่ในช่วง 0.5-2 μM



<u>รูปที่ 14</u> ผลของ shikonin (PKM2 inhibitor) ต่อการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) การแสดงออกของ PKM2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ในระดับ mRNA และโปรตีน, (B) MTT assay, (C) Cell death (%), (D) Colony formation, ***P < 0.01.

<u>วิจารณ์และข้อเสนอแนะ</u>

ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของสภาวะกลูโคสสูงและการเมแทบอลิซึมของกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิสต่อกระบวนการมีชีวิตและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

1. พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิส ได้แก่ glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2), lactate dehydrogenase A (LDHA) ในชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

2. เมื่อยับยั้งการแสดงออก หรือการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิสทั้ง 4ชนิดที่ศึกษาดังกล่าวข้างต้น สามารถยับยั้งการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

3. ผลการศึกษาบ่งชี้ถึงความต้องการใช้น้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเมื่อทดสอบเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าระดับปกติ ก็พบผลที่สอดคล้องกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิส กล่าวคือเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีความต้องการใช้น้ำตาลปริมาณสูงเพื่อส่งเสริมความสามารถในการแพร่ลุกลาม

จึงสรุปได้ว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอยู่ในสภาวะติดกลูโคส (Glucose Addiction) ซึ่งบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยมุ่งเป้าที่การยับยั้งวิถีการสร้างพลังงานและชีวสารที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็งผ่านกลูโคส

ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยนี้

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 4 เรื่อง

1.1 Thamrongwaranggoon U, Seubwai W, Phoomak C, Sangkhamanon S, Cha'on U, Boonmars T, et al. Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2017;484(2):409-15.

1.2 Thonsri U, Seubwai W, Waraasawapati S, Sawanyawisuth K, Vaeteewoottacharn K, Boonmars T, et al. Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis. Histol Histopathol. 2017;32(5):503-10.

1.3 Saengboonmee C, Seubwai W, Pairojkul C, Wongkham S. High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells via STAT3 activation. Scientific reports. 2016;6:18995.

1.4 Saengboonmee C, Seubwai W, Wongkham C, Wongkham S. Diabetes mellitus: Possible risk and promoting factors of cholangiocarcinoma: Association of diabetes mellitus and cholangiocarcinoma. Cancer epidemiology. 2015;39(3):274-82.

2. ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและระดับนานาชาติรวม xxx เรื่อง โดยเป็นการนำเสนอแบบ oral presentation จำนวน 2 เรื่อง และ poster presentation จำนวน 4 เรื่อง

2.1 การเสนอผลงานแบบ oral presentation

2.1.1 Ubonrat Thamrongwaranggoon et al. Anti-cancer activity of glucose transporter 1 inhibitor, phloretin, in cholangiocarcinoma cells. The 12th Mahasarakham University Research Conference, Mahasarakham, Thailand September 8th, 2016. (*Outstanding presentation)*

2.1.2 Thonsri U et al. Pyruvate kinase M2: a potential therapeutic target of cholangiocarcinoma. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in NAGOYA, Nagoya, Japan October 9th, 2015. *(Travelling grant award)*

2.2 การเสนอผลงานแบบ poster presentation

2.2.1 Ubonrat Thamrongwaranggoon et al. Increasing of glucose transporter 1 (GLUT1) expression related with early carcinogenesis and poor survival outcome of cholangiocarcinoma patients. Pre-Congress Symposium 2014, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand October 6th, 2014. *(Outstanding presentation award)*

2.2.2 Ubonrat Thamrongwaranggoon et al. The overexpression of glucose transporter 1 (GLUT1) in cholangiocarcinoma patients related with early carcinogenesis and poor prognosis. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in NAGOYA, Nagoya, Japan, October 9th, 2015. *(Travelling grant award)*

2.2.3 Ubonrat Thamrongwaranggoon et al. Inhibition of glucose transporter 1 (GLUT1) suppresses growth, metastasis and induces apoptosis of cholangiocarcinoma cell lines. The 5th International

Biochemistry and Molecular Biology Conference 2016, B. P. Samila Beach Hotel, Songkhla June 26th, 2016. (*Good poster presentation award)*

2.2.4 Thonsri U et al. Expression of pyruvate kinase M2 in cholangiocarcinoma. The 12th Mahasarakham University Research Conference, Mahasarakham, Thailand, September 8th, 2016. *(Outstanding presentation award)*

3. บัณฑิตศึกษา ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาโท จำนวน 2 คน ได้แก่

- น.ส. อัญชลี ต้นศรี สาขาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบัน ศึกษาต่อปริญญาเอกในสาขาเดียวกัน
- น.ส. อุบลรัตน์ ธำรงวรางกูร สาขาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบัน ศึกษาต่อปริญญาเอกในสาขาเดียวกัน

4. **ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย**

ดร. วันชนะ สืบไวย

- ได้รับความเห็นชอบในการกำหนดตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เมื่อวันที่ 31 สิงหาคม 2558
- ได้รับรางวัลนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีผลงานด้านการวิจัยระดับดีเยี่ยม สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ประจำปี 2557 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ได้รับเชิญเป็นวิทยากร เรื่อง “ทำวิจัยอย่างไรจึงจะประสบความสำเร็จและวางแผนงานวิจัยอย่างไรจึงจะได้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ” งานปฐมนิเทศนักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2559 วันที่ 13 กรกฎาคม 2558 ณ ห้องประชุมคณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
- เป็น invited speaker เรื่อง “Systems approach for biomedicine research III: current applications and prospective research work” การประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์สามสถาบัน พ.ศ.2558: จุฬาฯ-รามาฯ-ศิริราช (Joint Conference in Medical Sciences 2015) “Health Equity through Innovation and Collaboration” ระหว่างวันที่ 4 - 6 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
- เป็น invited speaker เรื่อง “The impact of type 2 diabetes mellitus on progression of cholangiocarcinoma” โครงการบรรยายพิเศษ “System biology week” วันที่ 20 พฤศจิกายน 2558 ณ ห้องประชุม ชั้น 4 ห้องสมุดคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- ได้รับการแต่งตั้งเป็นรองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพลุ่มน้ำโขง ฝ่ายบริหารสำนักงานเลขานุการสถาบัน คำสั่งมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ 1188/2560 ลงวันที่ 10 มีนาคม 2560
- ได้รับการแต่งตั้งเป็นคณะกรรมการการดำเนินงาน โครงการการแพทย์แบบแม่นยำในโรคมะเร็ง (precision medicine in cancer) คำสั่งมหาวิทยาลัยมหิดล ที่ 1652/2559 ลงวันที่ 15 มิถุนายน 2559

แผนงานวิจัยที่ 3 มุ่งเป้าที่ระบบนิเวศน์ของมะเร็ง (tumor environment)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาโปรตีนที่สร้างและหลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง รวมทั้งการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อค้นหาโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งหวังว่าหากสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าวได้ จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยบางโปรตีนอาจจะเกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์กับระบบนิเวศน์ของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งการทำลายระบบนิเวศน์ของเซลล์มะเร็งได้นั้น เป็นเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว กลุ่มวิจัยได้แบ่งการศึกษาเป็น 4 โครงการย่อย ดังนี้

โครงการที่ 1 การสร้างและการศึกษาคุณสมบัติการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่เหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง

การแพร่กระจาย (Metastasis) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตหลักของผู้ป่วยมะเร็งโดยทั่วไป รวมทั้งผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่าอวัยวะที่เป็นเป้าหมายหลักในการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง และปอด คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายไปที่ปอดสูงเทียบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำกว่า คณะผู้วิจัย ได้พัฒนาเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไทย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ KKU-213 และ KKU-M214 ให้มีความสามารถในการแพร่กระจายไปที่ปอดสูงกว่าเซลล์ตั้งต้น โดยการฉีดเซลล์ดังกล่าวเข้าที่หลอดเลือดที่หางของหนูที่พร่องภูมิคุ้มกัน (NOD Rag2$^{-/-}$-Jak3$^{-/-}$ mouse) พบว่าเซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายและเจริญเติบโตที่ปอดของหนูทดลองได้ เมื่อแยกเซลล์มะเร็งที่แพร่ไปยังปอดหนูและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แล้วฉีดเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้เข้าที่หลอดเลือดที่หางของหนูทดลองตัวใหม่ พบว่าการเกิดก้อนเนื้อมะเร็งที่ปอดหนูทดลองเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้นลงเป็นลำดับ เมื่อทำซ้ำเช่นนี้ 5 รอบ จะได้เซลล์ที่สามารถสร้างก้อนมะเร็งที่ปอดหนูได้ในระยะเวลาอันสั้น และได้ให้ชื่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่พัฒนาหลังจากฉีดเข้าหลอดเลือดที่หางหนูและแยกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 รอบว่า KKU-213L5 และ KKU-M214L5

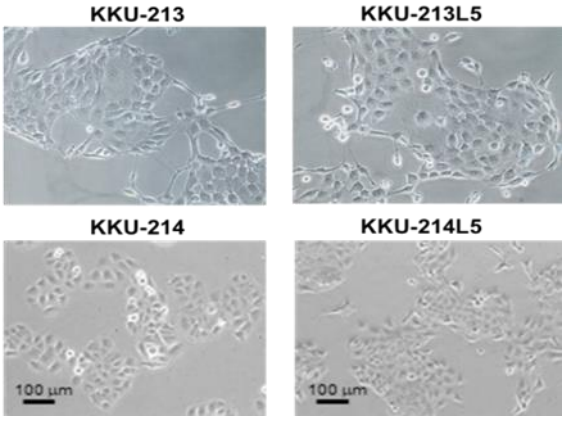
คณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ (KKU-213 และKKU-214) กับเซลล์ที่พัฒนาให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง (KKU-213L5 และ KKU-M214L5) ในเรื่องรูปร่าง ความสามารถในการเจริญเติบโต และความสามารถในการเคลื่อนที่และการแพร่รุกราน พบว่า แม้เซลล์ KKU-213L5 และ KKU-M214L5 จะถูกพัฒนาด้วยวิธีการเดียวกัน แต่เซลล์ทั้งสองมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ เซลล์ KKU-213L5 มีรูปร่างยืดยาวคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นแบบ KKU-213 ในขณะที่ เซลล์ KKU-214L5 มีรูปร่างยืดยาว (spindle shape) ในขณะที่เซลล์ต้นแบบ KKU-214 มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (hexagonal shape) (รูปที่ 3-1) เซลล์ KKU-213L5 สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเซลล์ KKU-213 โดยจะเริ่มสังเกตเห็นอย่างชัดเจนในวันที่ 4 หลังการเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์ KKU-214L5 มีการเจริญเติบโตเทียบเคียงกับเซลล์ KKU-214 (รูปที่ 3-2)

รูปร่างที่ยืดยาวที่พบในเซลล์ KKU-213, KKU-213L5 และ KKU-214L5 นี้คล้ายคลึงกับรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าเซลล์ดังกล่าวมีการเปลี่ยนรูปร่างจาก

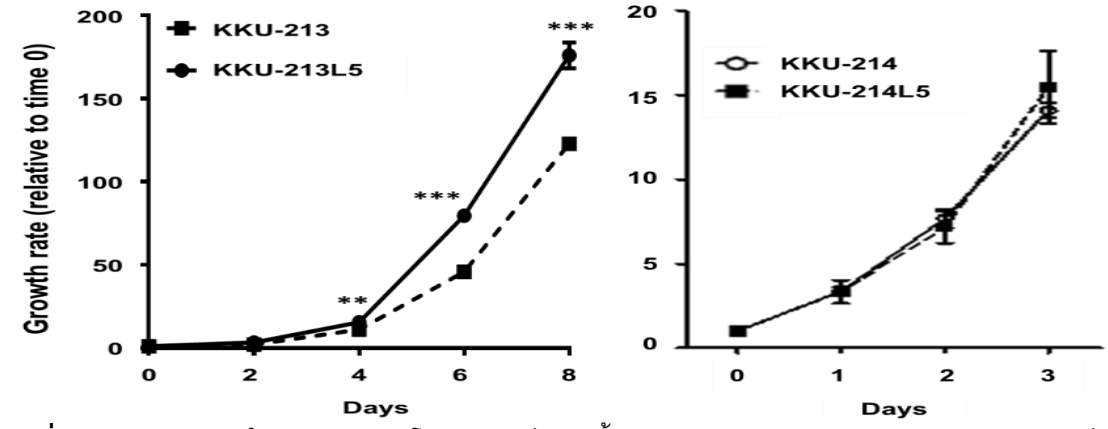
epithelial เป็นmesenchymal cells (epithelial-mesenchymal transition, EMT) ซึ่งพบมากในเซลล์ที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ (migration) และการรุกราน (invasion) ของเซลล์ทั้ง 2 ชุด (รูปที่ 3-3)พบว่าเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-M214L5 มีความสามารถในการเคลื่อนที่และรุกรานมากกว่าเซลล์ต้นแบบ KKU-213 และ KKU-214 ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ กล่าวคือ เซลล์ KKU-213L5 มีรูปร่างต่างจาก KKU-213 เล็กน้อยและมีคุณสมบัติในการรุกรานต่างกันเล็กน้อย (การรุกรานเพิ่มขึ้น 1.5 เท่าใน KKU-213L5) ในขณะที่เซลล์ KKU-214L5 และ KKU-214 มีรูปร่างแตกต่างกันมาก และคุณสมบัติในการรุกรานต่างกันมากเช่นกัน (การรุกรานเพิ่มขึ้น 4 เท่าใน KKU-214L5) อย่างไรก็ดี ข้อสรุปนี้เป็นเพียงข้อสังเกต ซึ่งต้องอาศัยการพิสูจน์ด้วยกระบวนการอื่นต่อไป

เพื่อพิสูจน์คุณสมบัติการแพร่กระจายที่เพิ่มขึ้นของเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-214L5 ที่ตรวจวัดได้ในระดับ *in vitro* ได้ทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-213L5 และการแพร่กระจายของ KKU-213L5 และ KKU-214L5 ในหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c Rag-2$^{-/-}$/Jak3$^{-/-}$ ซึ่งผลการทดสอบยืนยันผลที่พบในระดับ *in vitro* คือ เมื่อปลูกถ่ายเซลล์ KKU-213L5 และเซลล์ KKU-213 เข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลองพบว่า เซลล์ KKU-213L5 เจริญเติบโตเร็วกว่าเซลล์ KKU-213 (รูปที่ 3-4A) และเมื่อฉีดเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-214L5 เข้าที่หลอดเลือดที่หางหนูเพื่อตรวจวัดการกระจายไปที่ปอด พบว่าทั้งเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-214L5 มีความสามารถในการกระจายและสร้างก้อนมะเร็งที่เนื้อเยื่อปอดได้มากกว่าเซลล์ต้นแบบ (รูปที่ 3-4B-C) และมีผลต่ออัตราการรอดชีพของหนูทดลอง (รูปที่ 3-4D) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-214L5 มีคุณสมบัติในการแพร่กระจายสูงกว่าเซลล์ต้นแบบ KKU-213 และ KKU-214 ทั้งในหลอดทดลองและในหนูทดลอง

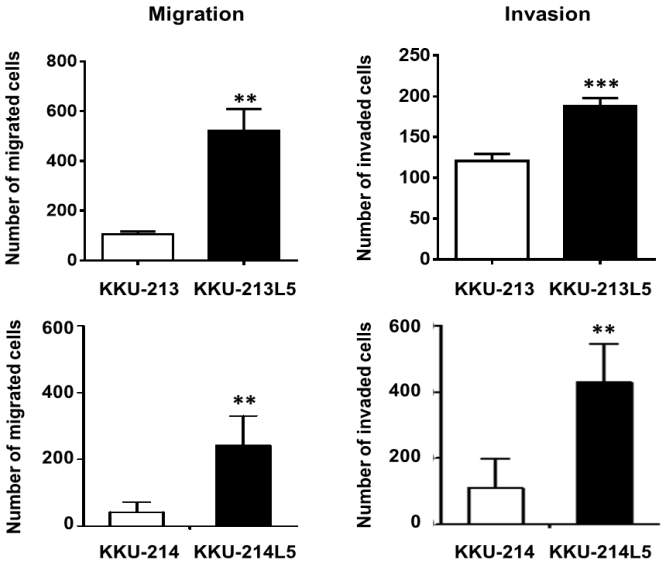
เนื่องจากมีการรายงานว่าเซลล์ที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูงมักมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ stem cell marker คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดการแสดงออกของ stem cell marker จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ CD29, CD44 และ CD133 บนผิวเซลล์ของเซลล์ทั้ง 2 ชุด (รูปที่ 3-5) ผลการทดลองพบว่าในเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-214L5 มีการแสดงออกของ stem cell marker ชนิด CD133 เพิ่มขึ้น และการแสดงออกของ stem cell marker ชนิด CD44 ลดลง โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของ stem cell marker ชนิด CD29 ผลการทดลองชี้แนะว่าการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งคุณสมบัติแพร่กระจายสูง โดยระบบการคัดเลือกในหนูทดลองนี้ อาจเหนี่ยวนำหรือคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ stem cell marker ซึ่งสมมติฐานนี้ต้องอาศัยการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ต่อไป



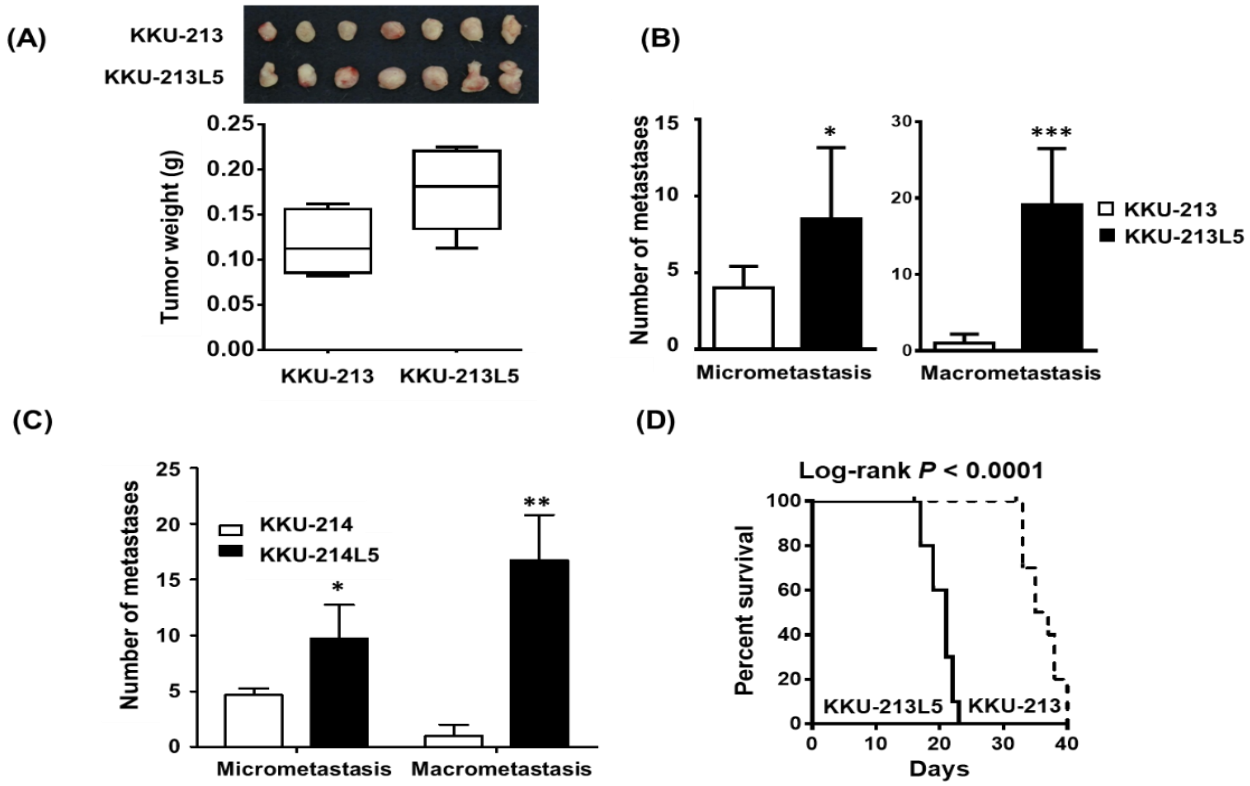
รูปที่ 3-1 รูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ (KKU-213 และKKU-214) และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง (KKU-213L5 และ KKU-M214L5)



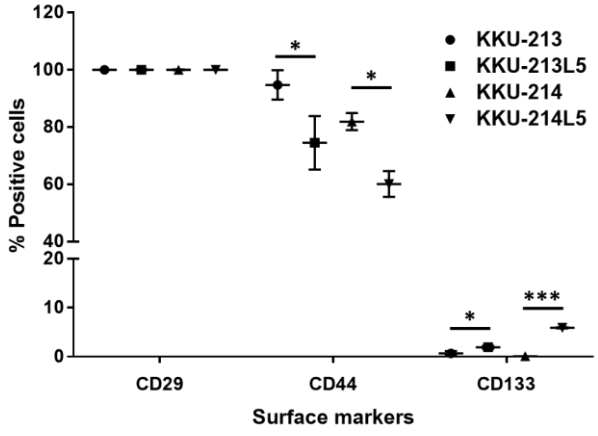
รูปที่ 3-2 ความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ (KKU-213 และKKU-214) และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง (KKU-213L5 และ KKU-M214L5)



รูปที่ 3-3 คุณสมบัติการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ (KKU-213 และKKU-214) และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง (KKU-213L5 และ KKU-M214L5) เมื่อทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ (migration) และคุณสมบัติในการรุกราน (invasion) โดยวิธี Matrigel™ coated Boyden chamber assay (**P<0.01, ***P<0. 001)



<u>รูปที่ 3-4</u> คุณสมบัติการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ (KKU-213 และKKU-214) และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง (KKU-213L5 และ KKU-M214L5) (A) การเจริญเติบโตเมื่อฉีดเซลล์เข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง เมื่อตรวจวัดที่วันที่ 12 (B)-(C) การแพร่กระจายของเซลล์ไปที่ปอด เมื่อฉีดเข้าที่หลอดเลือดที่หางหนู ตรวจวัดที่วันที่ 13 สำหรับชุด KKU-213 และ KKU-213L5 และวันที่ 31 สำหรับชุด KKU-214 และ KKU-214L5 โดยวิธี cytokeratin-19 immunohistochemistry ซึ่งเป็น bile duct epithelial marker ของเนื้อเยื่อปอดหนูทดลองและวัดขนาดก้อนมะเร็งที่แสดงออก cytokeratin-19 ก้อน macrometastases คือ มีขนาดใหญ่กว่า 150 μm (D) อัตราการรอดชีพของหนูทดลองที่ถูกฉีดเซลล์ KKU-213 และ KKU-213L5 เข้าที่หลอดเลือดที่หาง (หมายเหตุ *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)



<u>รูปที่ 3-5</u> การแสดงออกของ stem cells marker จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ CD29, CD44 และ CD133 ที่ผิวของเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบ และเซลล์ที่มีคุณสมบัติแพร่กระจายสูง (KKU-213L5 และ KKU-M214L5) แสดงผลเป็น Mean ± SD จาก 3 การทดลอง (Student t-test *P<0.05, ***P<0.001)

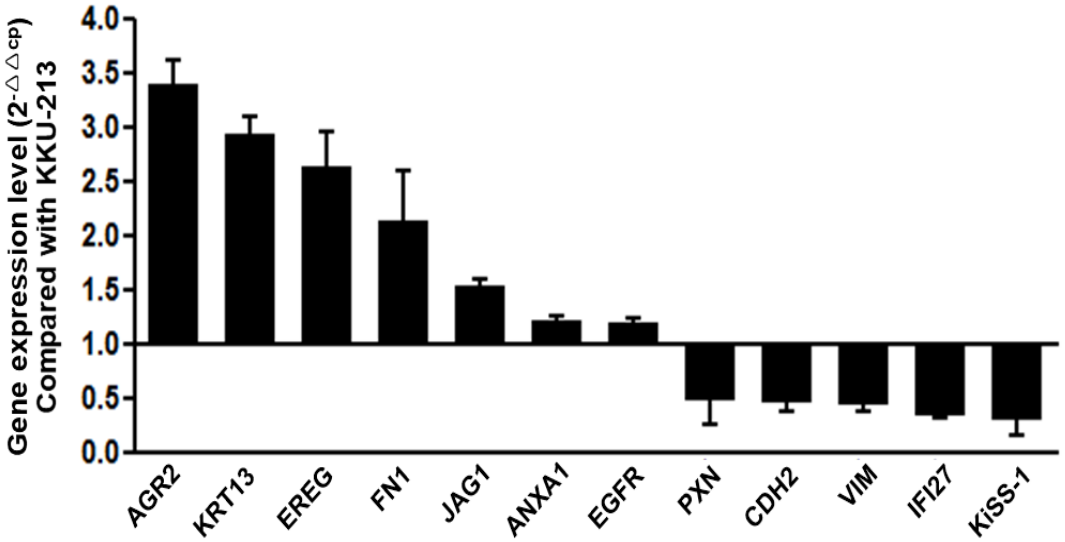
โครงการที่ 2 การศึกษาเพื่อหาโปรตีนหรือผลผลิตจากยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

เพื่อหาโปรตีนหรือผลผลิตของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้ วิจัยได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเซลล์ KKU-213 และ KKU-M213L5 เปรียบเทียบกับเซลล์ตั้งต้น KKU-213 และ KKU-214 โดยใช้ home-made PCR array และวิธี tandem mass spectrometry

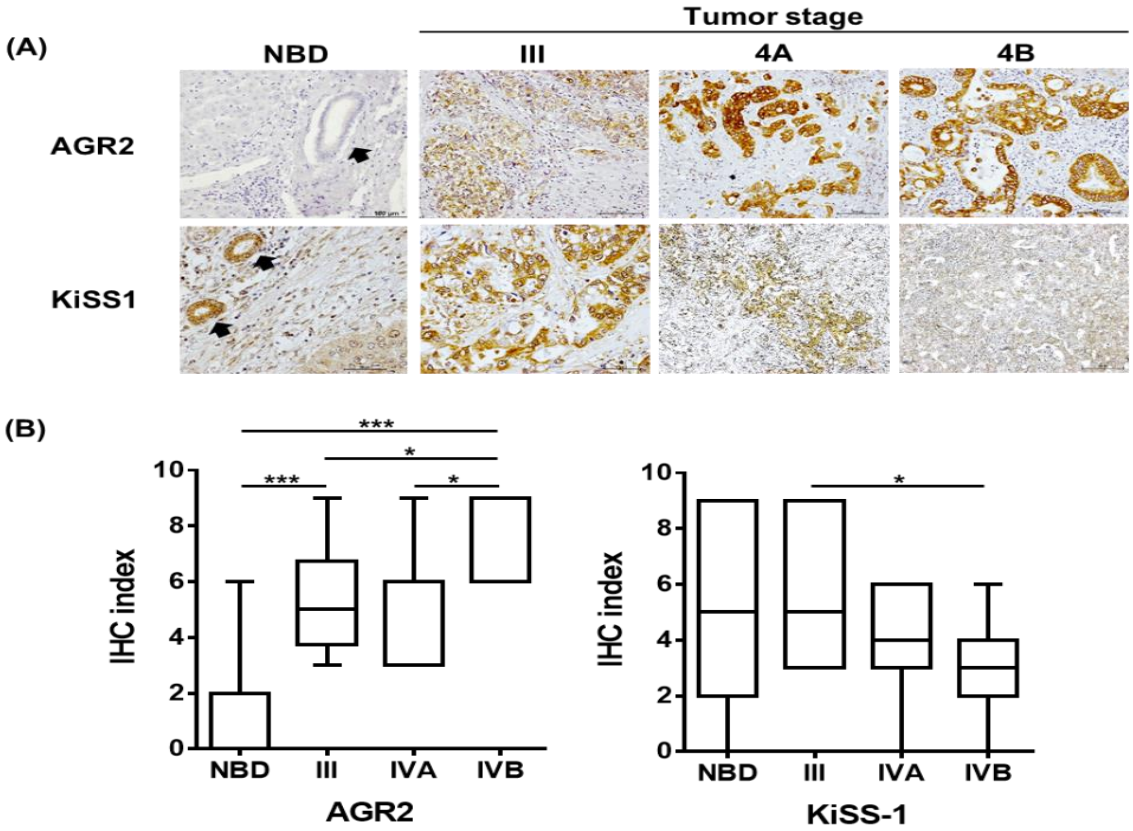
2.1 การศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งในเซลล์ KKU-M213 และ KKU-M213L5 โดยใช้ home-made PCR array

คณะผู้วิจัยได้พัฒนา home-made PCR array ที่ประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งจำนวน 77 ยีน เปรียบเทียบระหว่าง KKU-213 และ KKU-M213L5 พบการแสดงออกของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงและเป็นไปตามข้อกำหนด คือ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกใน KKU-213L5/KKU-213 มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.2 เท่าหรือน้อยกว่า 0.5 เท่า จำนวนทั้งสิ้น 12 ยีน ได้แก่ *AGR2, KRT13, EREG, FN1, JAG1, ANXA1, EGFR, PXN, CDH2, VIM, IFI27, KiSS-1* (รูปที่ 3-6) โดยคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกยีน AGR2 และ KiSS-1 ซึ่งเป็นยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกมากที่สุดเพื่อศึกษาต่อ

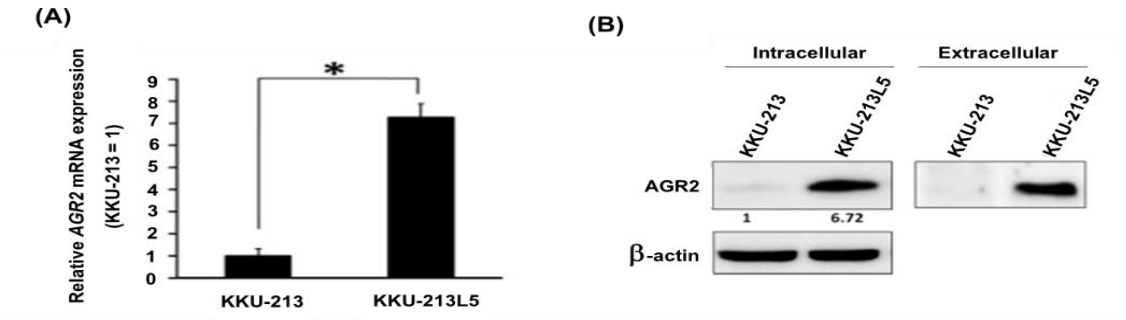
เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วย โดยเลือกวิเคราะห์ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระยะของโรคที่แตกต่างกัน พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน AGR2 นั้น มีการแสดงออกต่ำในท่อน้ำดีที่มีรูปร่างปกติ (normal bile duct; NBD) และเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระยะของโรคที่รุนแรงและมีการแพร่กระจายของมะเร็งมากขึ้น (รูปที่ 3-7) ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของโปรตีน KiSS-1 มีการแสดงออกสูงในท่อน้ำดีที่มีรูปร่างปกติ และการแสดงออกลดลงเมื่อระยะของโรคมะเร็งเป็นมากขึ้น



รูปที่ 3-6 การแสดงออกของยีนในเซลล์ KKU-213L5 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.2 เท่าและลดลงน้อยกว่า 0.5 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตั้งต้น KKU-213 จำนวนทั้งสิ้น 12 ยีน

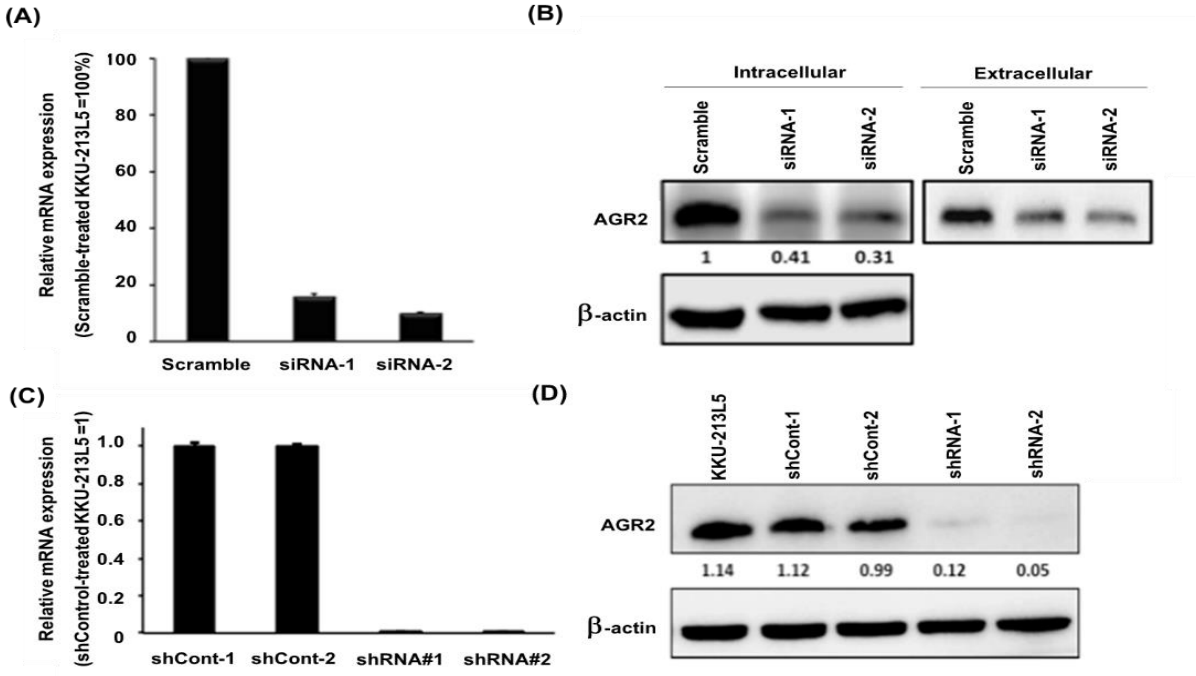


รูปที่ 3-7 การแสดงออกของโปรตีน AGR2 และ KiSS-1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระยะของโรคที่แตกต่างกัน ได้แก่ ระยะที่ 3 (III), 4A (IVA) และ 4B (IVB) เปรียบเทียบกับท่อน้ำดีที่มีรูปร่างปกติที่ตรวจพบในปริเวณข้างคียงเนื้อเยื่อมะเร็ง (normal bile duct; NBD) (A) การแสดงออกของโปรตีน AGR2 และโปรตีน KiSS-1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่างๆ ตรวจวัดด้วยวิธี immunohistochemistry และ (B) ค่าประเมินการแสดงออกของโปรตีน AGR2 และโปรตีน KiSS-1 ในเนื้อเยื่อประเมินโดยการคำนวณ IHC score (หมายเหตุ *P<0.05, ***P<0.001)

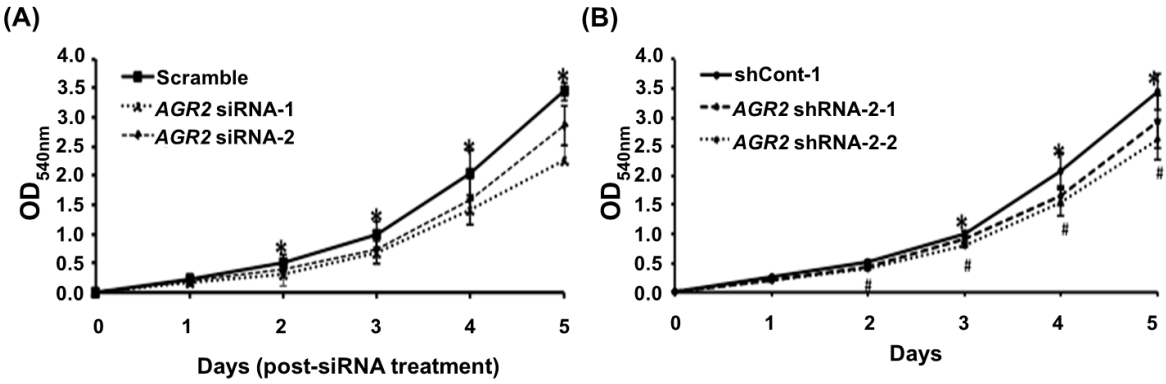


รูปที่ 3-8 การแสดงออกของ AGR2 ทั้งในระดับ mRNA (A) และโปรตีน (B) โดยในระดับโปรตีนมีการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนทั้งภายใน (intracellular) และภายนอกเซลล์ (extracellular)

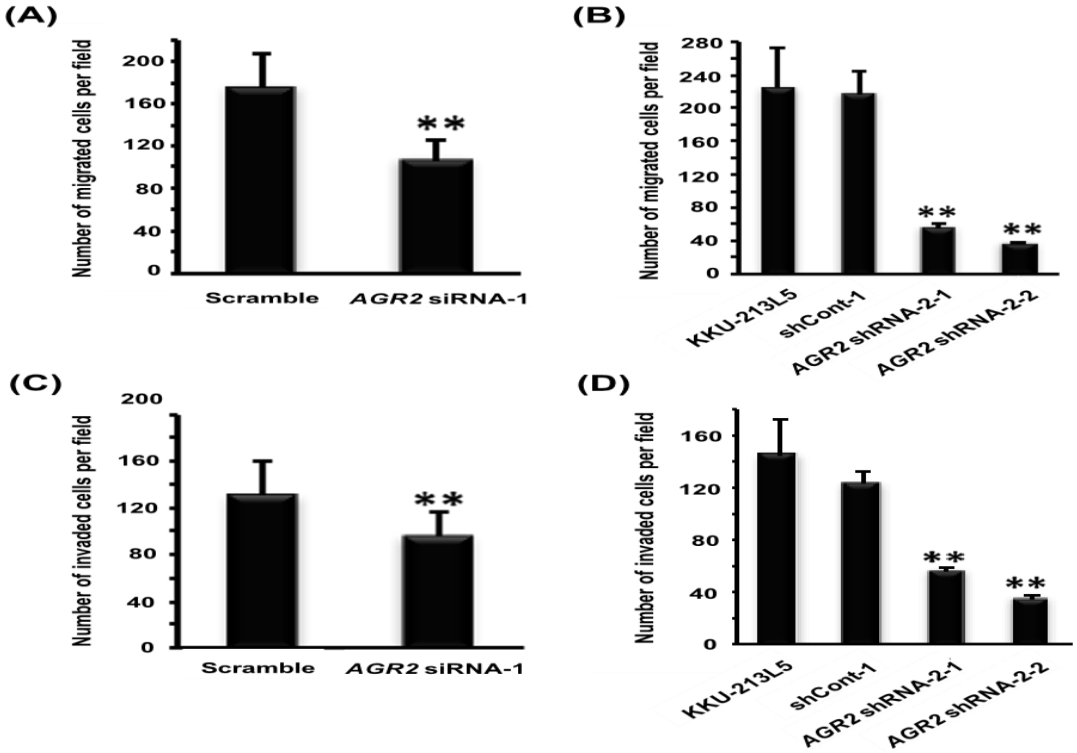
เนื่องจาก AGR2 เป็นยีนในเซลล์ KKU-213L5 ที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุดจากยีนที่ทดสอบทั้งหมด 77 ยีน และเมื่อตรวจวัดการแสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วย พบว่ามีการแสดงออกของ AGR2 เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยเฉพาะเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยที่อยู่ในระยะโรคสูงขึ้นและเพิ่มสูงที่สุดในเนื่อเยื่อมะเร็งระยะที่ 4B ซึ่งมักพบการแพร่กระจายสูง คณะผู้วิจัยได้เลือกศึกษา AGR2 เพิ่มเติมในเชิงกลไกและบทบาทในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในขั้นต้น คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดการแสดงออกของ AGR2 ในระดับ mRNA และโปรตีน เปรียบเทียบระหว่าง KKU-213 และ KKU-213L5 พบว่า KKU-213L5 มีการแสดงออกของ AGR2 เพิ่มสูงขึ้นทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน นอกจากนี้ยังตรวจพบว่า AGR2 ในน้ำเลี้ยงของเซลล์ KKU-213L5 (รูปที่ 3-8) คณะผู้วิจัยได้สร้าง siRNA และ shRNA ที่จำเพาะต่อ AGR2 เพื่อใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของ AGR2 พบว่าทั้ง siRNA และ shRNA ที่เลือกใช้สามารถยับยั้งการแสดงออกของ AGR2 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รูปที่ 3-9) เมื่อยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน AGR2 ด้วย siRNA และ shRNA พบว่าทั้ง siRNA และ shRNA ต่อ AGR2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-213L5 (รูปที่ 3-10) และยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานของของเซลล์ KKU-213L5 ได้ (รูปที่ 3-11) แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ matrix metallo proteinase 2 และ 9 (MMP2 และ MMP9) (รูปที่ 3-12) ผลการศึกษายืนยันสมมติฐานว่าผลผลิตของยีนหรือโปรตีน AGR2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีน AGR2 ที่ควบคุมกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของ AGR2 ในหนูทดลองต่อไป



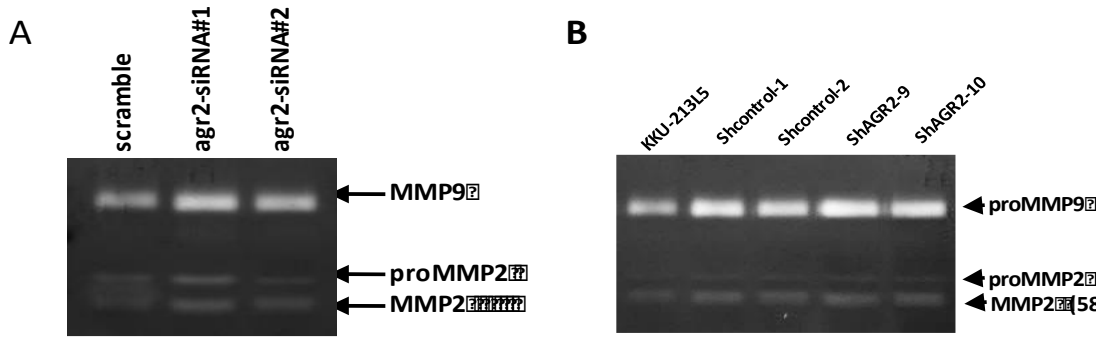
<u>รูปที่ 3-9</u> ระดับ mRNA และโปรตีน AGR2 ในเซลล์ KKU-213L5 เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ AGR2 ด้วย siRNA หรือ shRNA การแสดงออกของ AGR2 ระดับ mRNA (A, C) และโปรตีน (B, D) ในเซลล์ KKU-213L5 ตรวจวัดหลังจากใส่ siRNA (A, B) หรือ shRNA (C, D) ที่จำเพาะสำหรับ AGR2 โดยในการทดลองนี้ได้ใช้ siRNA จำนวน 2 เส้นและ shRNA จำนวน 2 เส้นที่แตกต่างกัน เพื่อยืนยันผลการทดลอง



รูปที่ 3-10 ผลของการยับยั้ง AGR2 โดย siRNA (A) และ shRNA (B) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-213L5 การแสดงออกของ AGR2 ทั้งในระดับ mRNA ตรวจวัดด้วยวิธี MTT และแสดงค่าเป็น OD540nm ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ Scramble หรือ shCont-1 (หมายเหตุ * ในรูป A แทน $P<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Scramble และ AGR2 siRNA-1, * ในรูป B แทน $P<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง shCont-1 และ AGR2 shRNA-2-1, # ในรูป B แทน $P<0.01$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง shCont-1 และ AGR2 shRNA-2-2)



รูปที่ 3-11 ผลของการยับยั้ง AGR2 โดย siRNA (A, C) และ shRNA (B, D) ต่อการเคลื่อนที่ (A, B) และการรุกราน (C, D) ของเซลล์ KKU-213L5 ตรวจวัดด้วยวิธี Boyden chamber assay เมื่อไม่มี (A, B) และมี (C, D) Matrigel (** $P<0.01$)



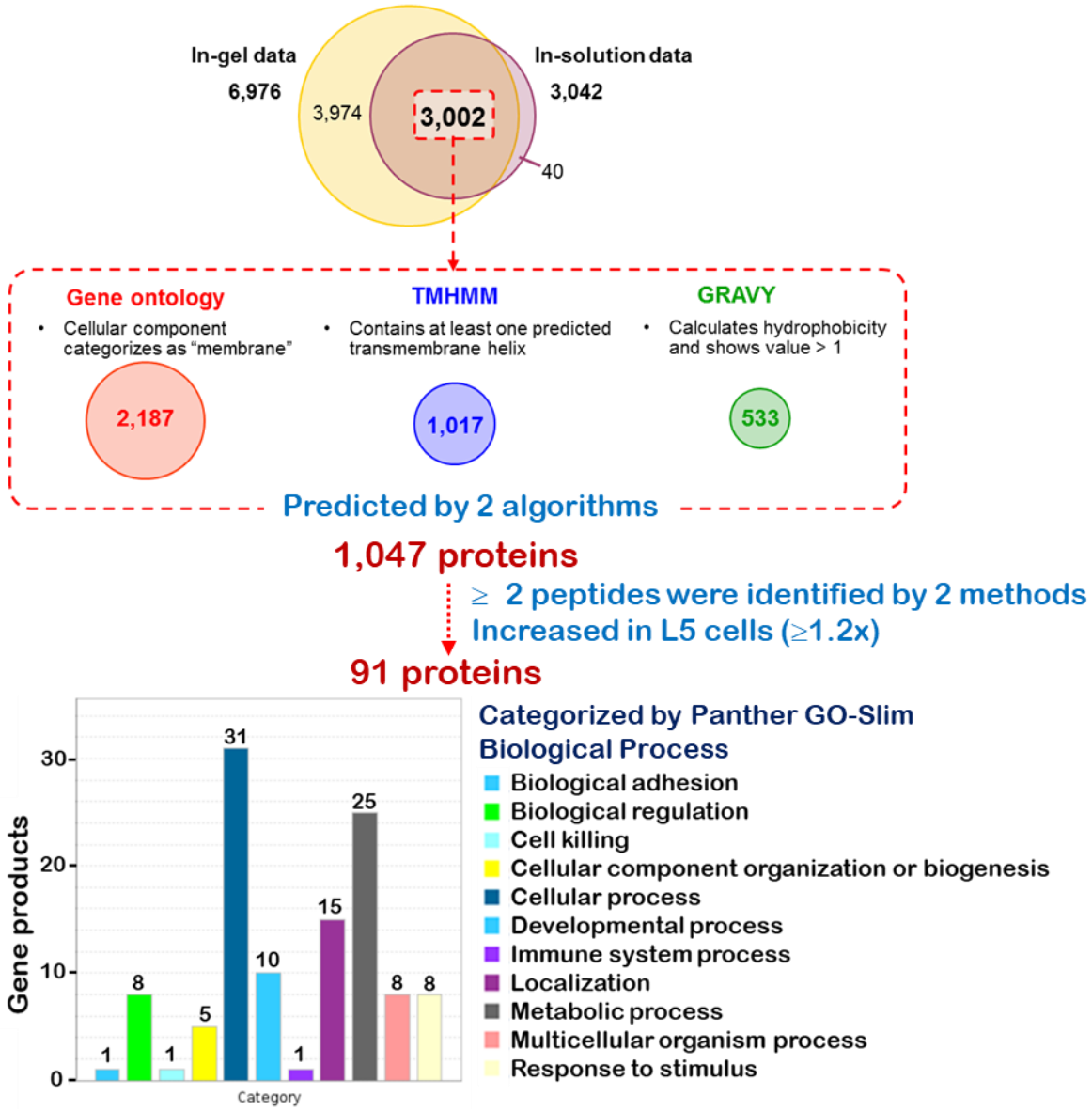
รูปที่ 3-12 ผลของ AGR2-siRNA (A) และ AGR2-shRNA (B) ต่อการทำงานของเอนไซม์ MMP2 และ MMP9 ใน conditioned media ของเซลล์ KKU-213L5 เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค gelatin zymography

2.2 การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ KKU-M214 และ KKU-M214L5 ด้วยวิธี tandem mass spectrometry

เนื่องจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในหลาย ๆขั้นตอนต้องอาศัยคุณสมบัติจำเพาะของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างเซลล์ KKU-M214 และ KKU-M214L5 โดยได้ทำการสกัดโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M214 และ KKU-M214L5 และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำ ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้ด้วย proteomic 2 วิธี คือ in gel digestion-LC-MS/MS และ in solution digestion-LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์โปรตีนได้ทั้งหมด จำนวน 7,016 ชนิด เป็นโปรตีนที่พบร่วมกันจากการวิเคราะห์ 2 วิธี จำนวน 3,002 โปรตีน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม 3 โปรแกรม ได้แก่ GO analysis, TMHMM และ GRAVY เพื่อยืนยันความเป็นโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยผ่าน criteria ของโปรแกรมอย่างน้อย 2 โปรแกรม จำนวน 1,047 ชนิด (รูปที่ 3-13) ในจำนวนนี้ มีโปรตีนที่ผ่านการคัดกรองโดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ KKU-M214L5 เมื่อเทียบกับ KKU-M214 อย่างน้อย 1.2 เท่าและตรวจพบเปปไทด์อย่างน้อย 2 เปปไทด์ จำนวน 91 ชนิด เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ตามหน้าที่พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานของเซลล์และเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งโปรตีนที่พบมาก 5 อันดับแรกเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี in gel และ in solution analysis ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3-1

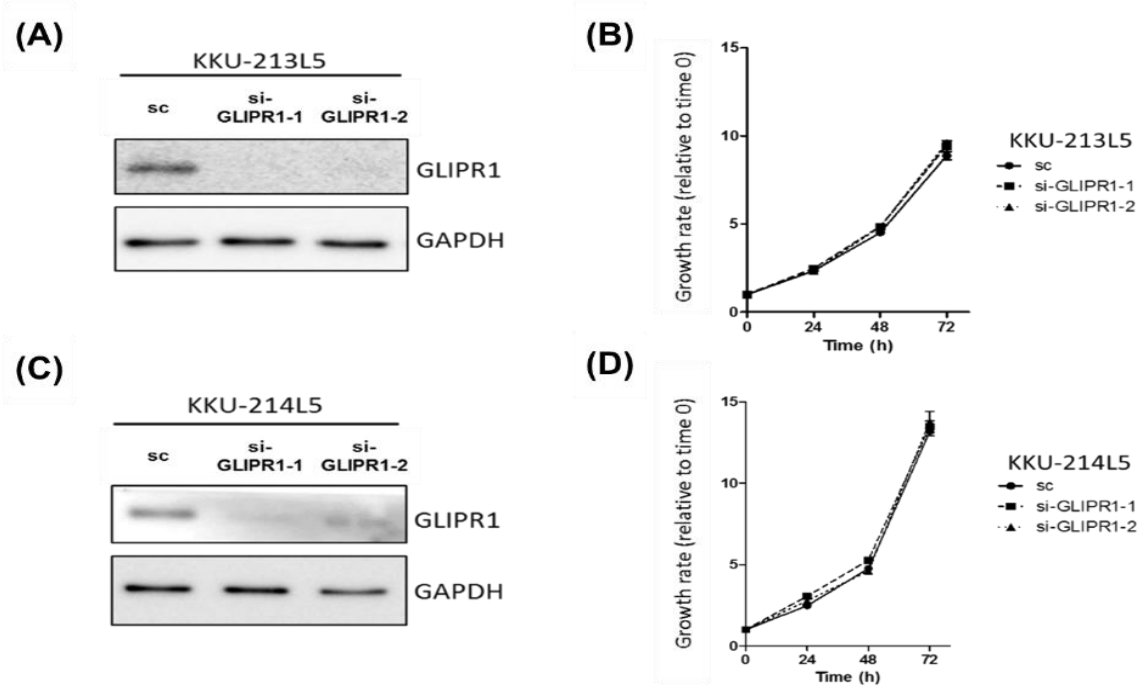
ตารางที่ 3-1 โปรตีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 5 อันดับแรกที่ได้จากเทคนิค in-gel และ in-solution analysis

In gel analysis		**In solution analysis**	
	Fold change		**Fold change**
1. Glioma pathogenesis-related protein 1 (GLIPR1)	6.79	1. Glioma pathogenesis-related protein 1	Found only in KKU-214L5
2. Erythrocyte band 7 integral membrane protein	6.38	2.Transmembrane protein 59	Found only in KKU-214L5
3. NKG2D ligand 2	3.27	3.Keratinocyte-associated transmembrane protein 2	Found only in KKU-214L5
4. Endoglin	3.13	4. Endoglin	Found only in KKU-214L5
5. Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 6	3.06	5. Neuropilin-1	Found only in KKU-214L5

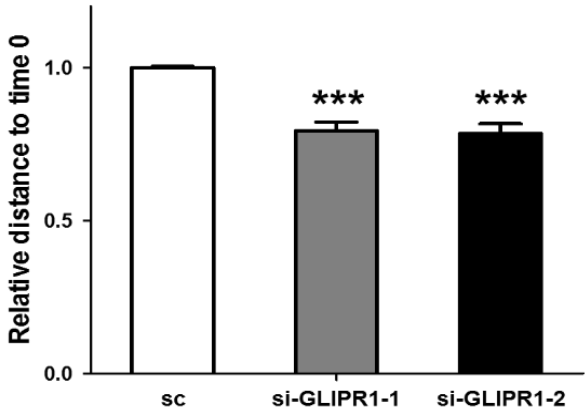


รูปที่ 3-13 การวิเคราะห์ membrane protein ที่แสดงออกแตกต่างกันใน KKU-M214 และ KKU-M214L5 โดยวิธี tandem mass spectrometry 2 แบบ ได้แก่ in gel digestion-LC-MS/MS และ in solution digestion-LC-MS/MS

จากตารางที่ 3-1 โปรตีน Glioma pathogenesis-related protein 1 หรือ GLIPR1 เป็นโปรตีนที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นมากที่สุดบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ KKU-214L5 เมื่อเปรียบเทียบกับ KKU-214 คณะผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกโปรตีนดังกล่าวเพื่อศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของ GLIPR1 โดยใช้เทคนิค siRNA ในการทดลองนี้ได้เพิ่มเติมเซลล์ KKU-213L5 เพื่อใช้ในการศึกษาเชิงเปรียบเทียบและยืนยันผล พบว่าเมื่อทำการ knockdown GLIPR1 ด้วย siRNA ในเซลล์ KKU-213L5 และ KKU-214L5 พบว่า siRNA ที่ใช้ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน GLIPR1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบว่าการลดลงของ GLIPR1 ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ scramble (รูปที่ 3-14) แต่การลดลงของ GLIPR1 มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยทำให้ KKU-214L5 มีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3-15)



<u>รูปที่ 3-14</u> ผลของการยับยั้งการแสดงออกของ GLIPR1 โดย siRNA ต่อการแสดงออกของ GLIPR1 (A, C) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (B, D) KKU213L5 (A, B) และ KKU-214L5 (C, D)

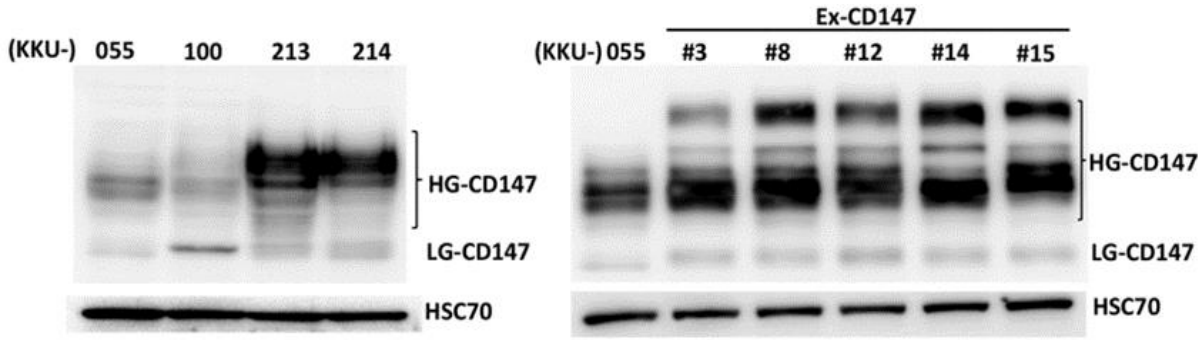


<u>รูปที่ 3-15</u> ผลของการยับยั้งการแสดงออกของ GLIPR1 โดย siRNA ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-214L5 เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี wound scratching (หมายเหตุ ****P*<0.001)

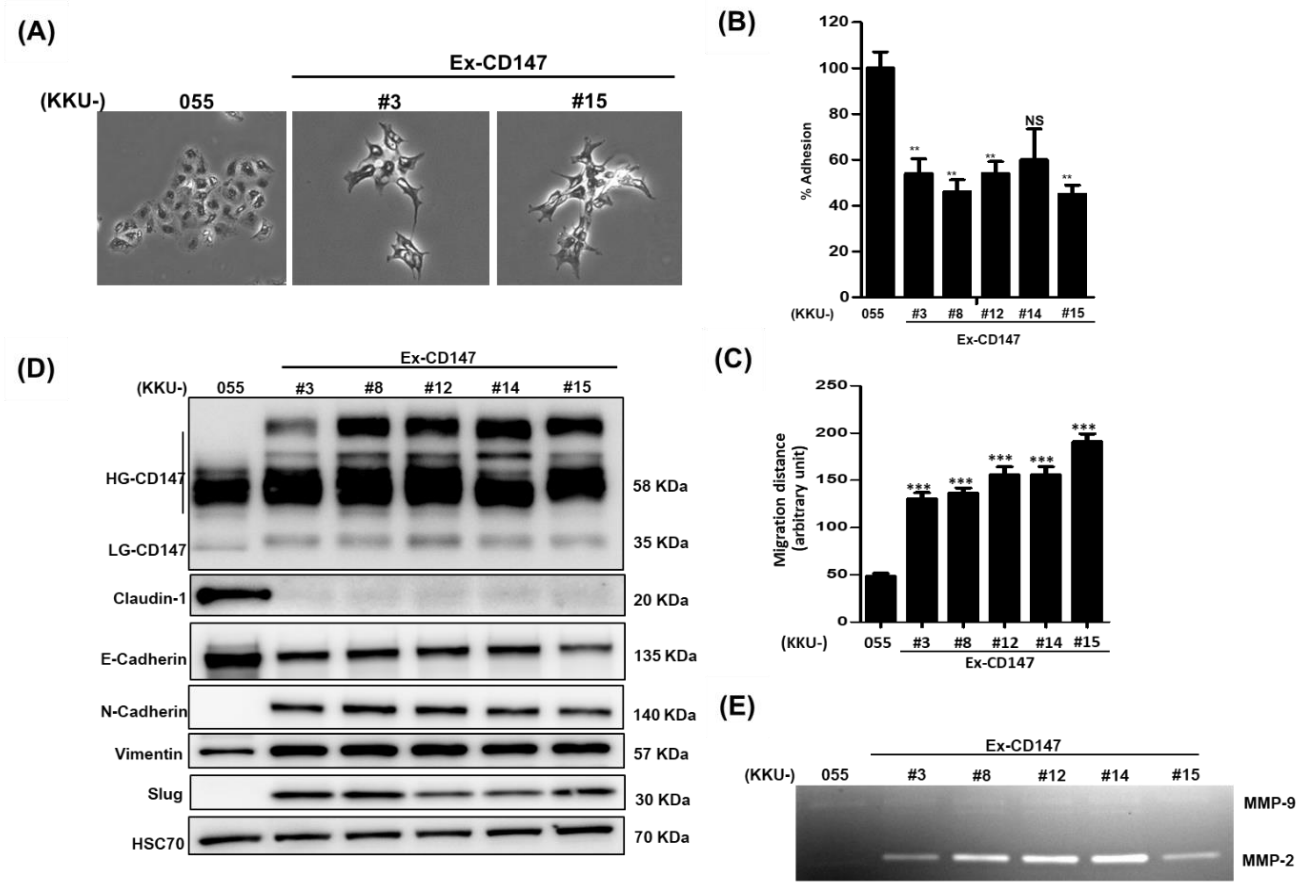
<u>โครงการที่ 3 การศึกษาเพื่อค้นหาโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและมีผลต่อการดำเนินโรค</u>

นอกเหนือจากการค้นหาโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยอาศัยวิธี proteomics ซึ่งเป็นเทคนิค high throughput แล้ว คณะผู้วิจัยใช้ข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อนเพื่อคัดเลือกโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดี โดยอาศัยข้อมูลจาก serial analysis of gene expression (SAGE) โดย Sawanyawisuth K., et. al., 2012 ที่รายงานเปรียบเทียบเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีระหว่างมะเร็งที่พบที่ตับ (Primary site) กับมะเร็งที่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง พบยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งหมด 142 ยีน ได้คัดเลือกผลผลิตของยีน 5 ชนิด ได้แก่ Thymosin beta-10, galectin-3, vitamin D receptor, cyclophilin A และ CD147 เพื่อศึกษาหาการแสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าทั้งโปรตีนทั้ง 5 ชนิด มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจริง ฃคณะผู้วิจัยได้ศึกษาเชิงกลไกของโปรตีน Thymosin beta-10, galectin-3, vitamin D receptor, cyclophilin A ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี และได้ตีพิมพ์ผลงานแล้ว

ในโครงการนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน CD147 ต่อการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของ CD147 ที่แตกต่างกัน โดยในเซลล์ KKU-055, KKU-100 ที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และแพร่รุกรานต่ำ มีการแสดงออกของ CD147 ต่ำ และในเซลล์ KKU-213 และ KKU-214 ที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และแพร่รุกรานสูงมีการแสดงออกของ CD147 สูง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของ CD147 ต่อการเคลื่อนที่และแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-055 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 ในระดับต่ำ ได้ทำการสร้างเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้น (Ex-CD147) โดยอาศัย retrovirus expression system ในการเพิ่มการแสดงออกของ CD147 และคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้นทั้งหมด 5 โคลน ได้แก่ Ex-CD147 โคลน #3, #8, #12, #14, และ #15 (รูปที่ 3-16) เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษากลไกการทำงานของ CD147 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มสูงขึ้นมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ต้นแบบ โดยมีรูปร่างยาวเรียวคล้ายกระสวย คล้ายกับเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดกระบวนการ epithelial to mesenchymal transition (EMT) (รูปที่ 3-17A) และเมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ดังกล่าวพบว่าเซลล์มีความสามารถในเกาะพื้นผิว (adhesion) ลดลง แต่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ (migration) เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3-17B และ 3-17C เมื่อพิสูจน์กลไกในระดับโมเลกุล พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้นมีการแสดงออกของ EMT marker เปลี่ยนแปลงไป คือมีการแสดงออกของ mesenchymal marker เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของของ epithelial marker ลดลง ยกเว้น E-cadherin (รูปที่ 3-17D) ซึ่งสอดคล้องกับรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้น มีการทำงานของเอนไซม์ Metrix metalloproteinase (MMP)-2 เพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 3-17E) ซึ่งคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงเหล่านี้ส่งเสริมให้เซลล์มีคุณสมบัติแพร่กระจายได้สูงขึ้น

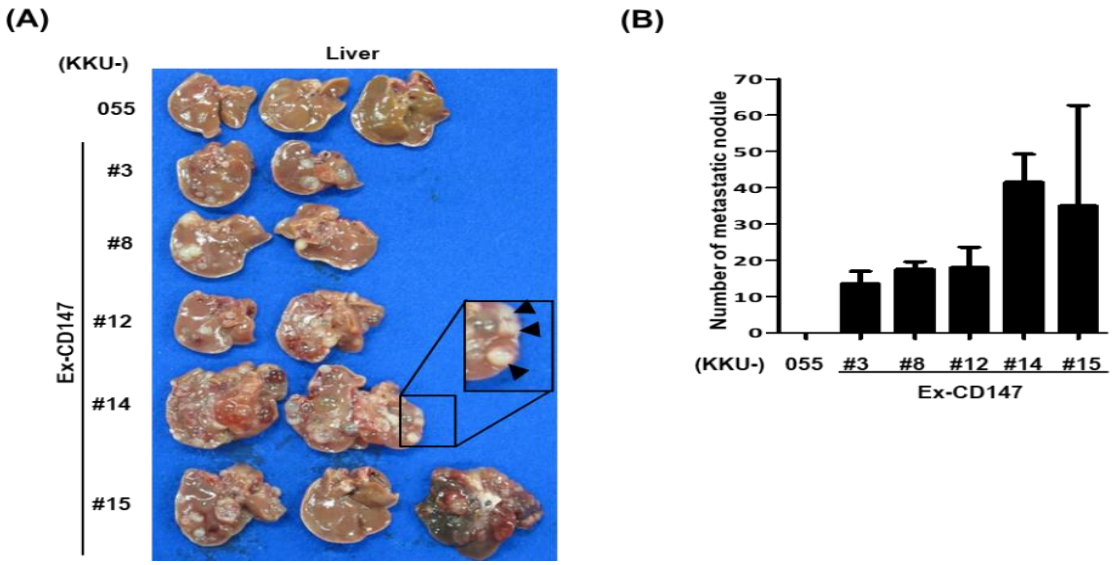


รูปที่ 3-16 การแสดงออกของ CD147 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย western blot (A) ระดับการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 4 ชนิด เซลล์ KKU-055 มีระดับการแสดงออกของ CD147 ต่ำ และ (B) ระดับการแสดงออกของ CD147 ในเซลล์ KKU-055 เพิ่มสูงขึ้นหลังจากได้รับ CD147 overexpression plasmid โดยวิธี retrovirus expression system และคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้นจำนวน 5 โคลน



รูปที่ 3-17 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มขึ้นของ CD147 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (A) รูปร่างของเซลล์ (B) คุณสมบัติในการ adhesion และ (C) migration, (D) EMT marker ที่ไปและ (E) การทำงานของ MMP-2

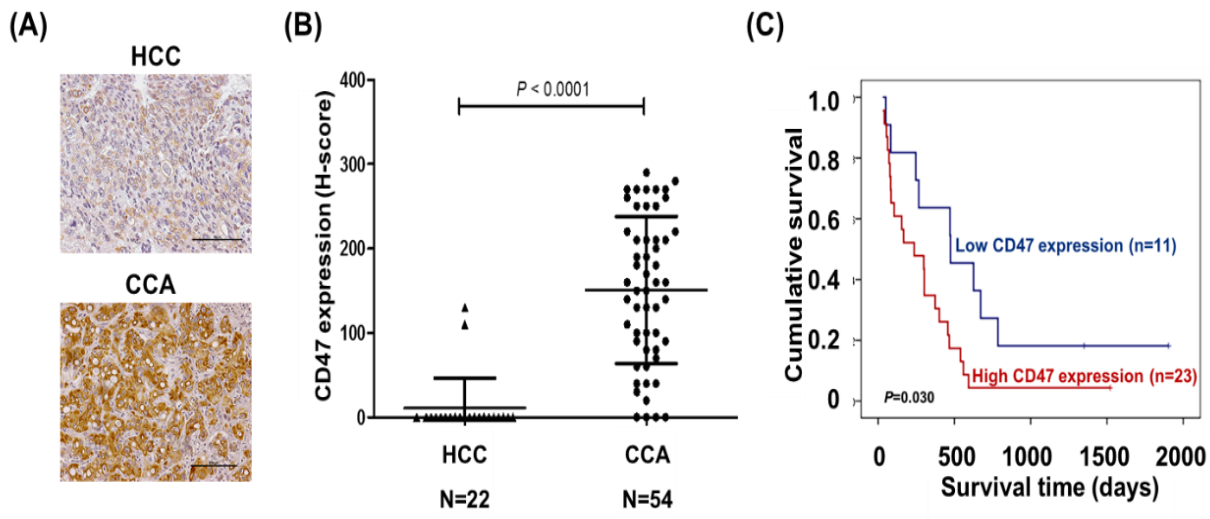
เพื่อยืนยันบทบาทสำคัญของ CD147 ในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผู้วิจัยได้พิสูจน์คุณสมบัติดังกล่าวในหนูทดลอง โดยฉีดเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้นเข้าที่หลอดเลือดที่หางของหนูทดลอง และเปรียบเทียบก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้นกับเซลล์ต้นแบบ ดังแสดงในรูปที่ 3-18 เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 เพิ่มขึ้นมีความสามารถในการแพร่กระจายไปที่ตับของหนูทดลองได้ทั้ง 5 โคลน ซึ่งเซลล์ต้นแบบ KKU-055 ไม่มีคุณสมบัติในการแพร่กระจายได้ ขณะนี้ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาบทบาทของ CD147 เพิ่มเติมในเซลล์ที่ถูก knock-out CD147 เพื่อยืนยันผลและพิสูจน์กลไกในเชิงลึก โดยมุ่งหวังว่าหากสามารถบ่งชี้กลไกการทำงานของ CD147 ได้จะทำให้สามารถประยุกต์เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการแพร่กระจายของมะเร็ง



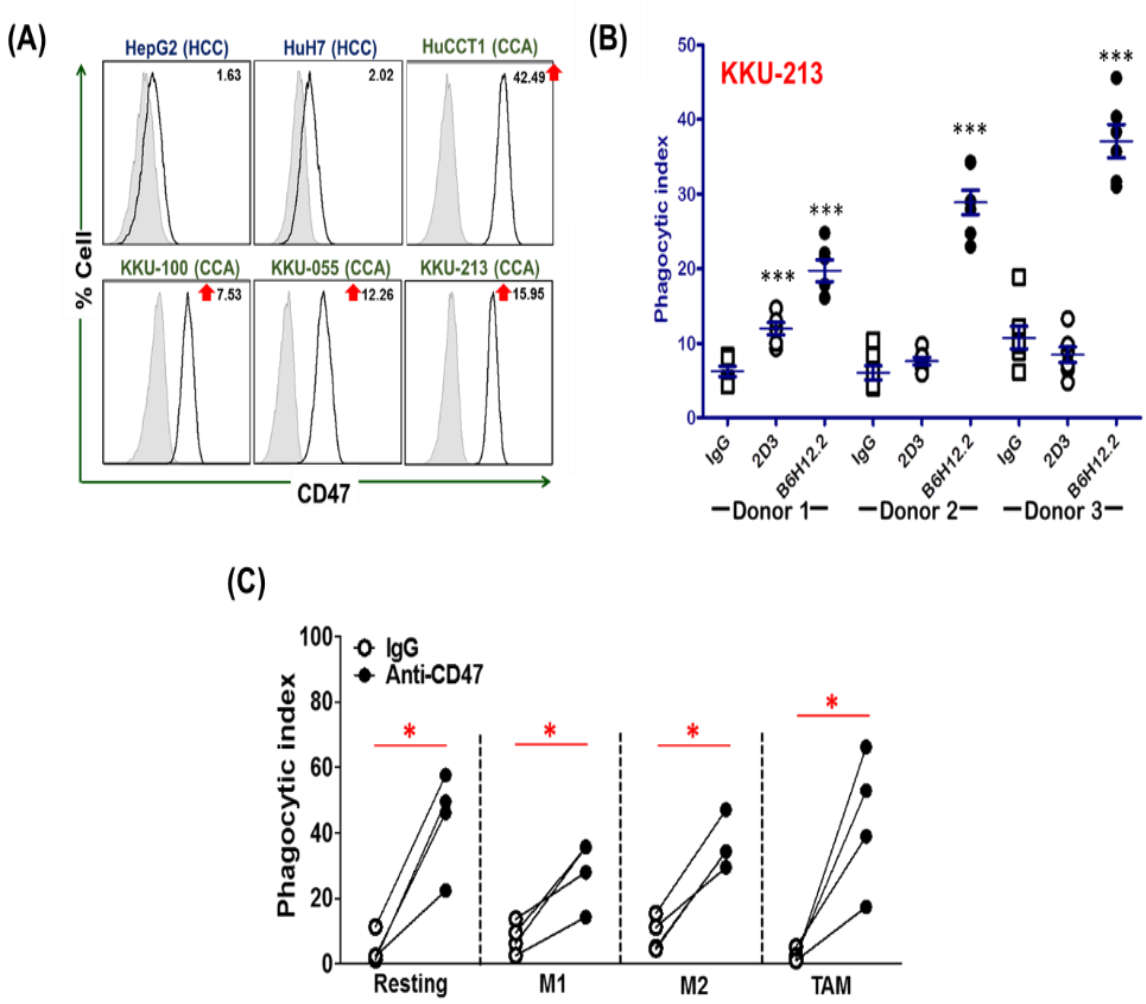
<u>รูปที่ 3-18</u> การเพิ่มการแสดงออกของ CD147 ทำให้เซลล์มะเร็งกระจายไปที่ตับหนูได้มากขึ้น (A) ก้อนมะเร็งที่ตับของหนูทดลองที่ถูกฉีดเซลล์มะเร็งเข้าที่หลอดเลือดที่หาง (B) จำนวนของก้อนมะเร็งที่ตับของหนูทดลองจาก A (C)

เนื่องจากมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังที่มาจากหลายสาเหตุ และมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการอักเสบเรื้อรังในมะเร็งท่อน้ำดีกับการดำเนินโรค จากผลงานที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย พบว่าการเพิ่มขึ้นของ monocyte ในกระแสเลือดหรือการเพิ่มขึ้นของ tumor associated fibroblast (TAM) สัมพันธ์กับการดำเนินโรคที่แย่ลงของผู้ป่วย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะค้นหาโมเลกุลเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ TAM หรือ macrophage กับการดำเนินโรคที่แย่ลง พบว่ามีการรายงานความเกี่ยวข้องของโมเลกุล CD47 กับการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งหากเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ CD47 ที่เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้น จะทำให้เซลล์มะเร็งสามารถหลบเลี่ยงการจดจำโดย macrophage ได้และไม่ถูกกำจัดโดยกระบวนการ phagocytosis ได้

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดการแสดงออกของ CD47 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับจากผู้ป่วย พบว่า เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของ CD47 สูง ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ CD47 ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับ (รูปที่ 13-19A และ 3-19B) นอกจากนี้การแสดงออกของ CD47 ที่สูงยังสัมพันธ์กับมะระยะรอดชีพที่สั้นของผู้ป่วย(รูปที่ 3-19C) เพื่อพิสูจน์บทบาทของ CD47 ในมะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดการแสดงออกของ CD47 บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ HuCCT1, KKU-055, KKU-100, KKU-213 ด้วยวิธี flow cytometry เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ HepG2 และ Huh7 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ทดสอบมีการแสดงออกของ CD47 ในนั้ระดับที่สูงกว่าเพาะเลี้ยงมะเร็งตับ (รูปที่ 3-20A) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบในเนื้อเยื่อมะเร็ง เมื่อทดสอบบทบาทในการยับยั้งการเกิด phagocytocytosis พบว่า การแสดงออกของ CD47 มีผลยับยั้งการเกิด phagocytosis และสามารถกระตุ้นการเกิด phagocytosis ได้โดยใช้ neutralizing antibody ต่อ CD47 (B6H12.2) (รูปที่ 3-20B) และการยับยั้ง phagocytosis ของเซลล์ที่มี CD47 นั้น เกิดขึ้นกับ macrophage ทุกชนิด ทั้ง M1, M2, TAM หรือ macrophage ที่ไม่ถูกกระตุ้น (resting) (รูปที่ 3-20C) ซึ่งคณะผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษาเพื่อยืนยันบทบาทหน้าที่ของ CD47 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยยับยั้งการแสดงออกของ CD47 ด้วยเทคนิค CRISPR-Cas9 และศึกษาผลของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD47 ลดลง หรือการยับยั้งการทำงานของ CD47 โดยอาศัย neutralizing antibody ต่อการก่อมะเร็งในหนูทดลอง เพื่อยืนยันผลและวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการใช้ CD47 เป็นเป้าหมายในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป



รูปที่ 3-19 การแสดงออกของ CD47 ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับ (HCC) เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) จากผู้ป่วย (A) แสดงการแสดงออกของ CD47 ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี (B) เปรียบเทียบการแสดงออกของ CD47 ในมะเร็ง 2 ชนิด เมื่อตรวจวัดการแสดงออกโดยอาศัยการวัด H-score



<u>รูปที่ 3-20</u> การแสดงออกและบทบาทของ CD47 บนผิวเซลล์มะเร็งต่อการยับยั้งการเกิด phagocytosis (A) การแสดงออกของ CD47 บนผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 4 ชนิด ได้แก่ HuCCT1, KKU-055, KKU-100, KKU-213 เทียบกับเซลล์มะเร็งตับ 2 ชนิด ได้แก่ HepG2 และ Huh7 ตรวจวัดโดยวิธี flow cytometry โดยแสดงค่าเป็น mean fluorescent intensity ของเซลล์เมื่อย้อมด้วย anti-CD47 antibody เทียบกับเซลล์ที่ย้อมด้วย isotype control antibody (B) ผลของการแสดงออกของ CD47 ต่อการยับยั้งการเกิด phagocytosis (หมายเหตุ IgG = isotype control, 2D3 = anti-CD47 non-neutralizing antibody และ B6H12.2 = anti-CD47 neutralizing antibody, ***P<0.001 เมื่อเทียบกับ IgG) (C) ผลของการแสดงออกของ CD47 ต่อการยับยั้งการเกิด phagocytosis ของเซลล์ macrophage ทั้งประเภท resting, M1, M2 และ TAM (หมายเหตุ *P<0.05)

โครงการที่ 4 การค้นหา secretory protein ที่มีผลต่อการแพร่และการกระจายของมะเร็งท่อน้ำดี

เป็นที่ทราบกันดีว่าเซลล์มะเร็งชนิดก้อนอยู่ร่วมกับเซลล์อื่น ๆในระบบนิเวศน์ และเซลล์มะเร็งสามาถส่งสื่อสัญญาณเพื่อปรับให้เซลล์อื่น ๆเป็นพันธมิตรกับเซลล์มะเร็ง โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโปรตีนที่ผลิตและหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ทำหน้าที่สื่อสารกับเซลล์ข้างเคียงทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์อื่นๆที่อยู่แวดล้อมมะเร็ง

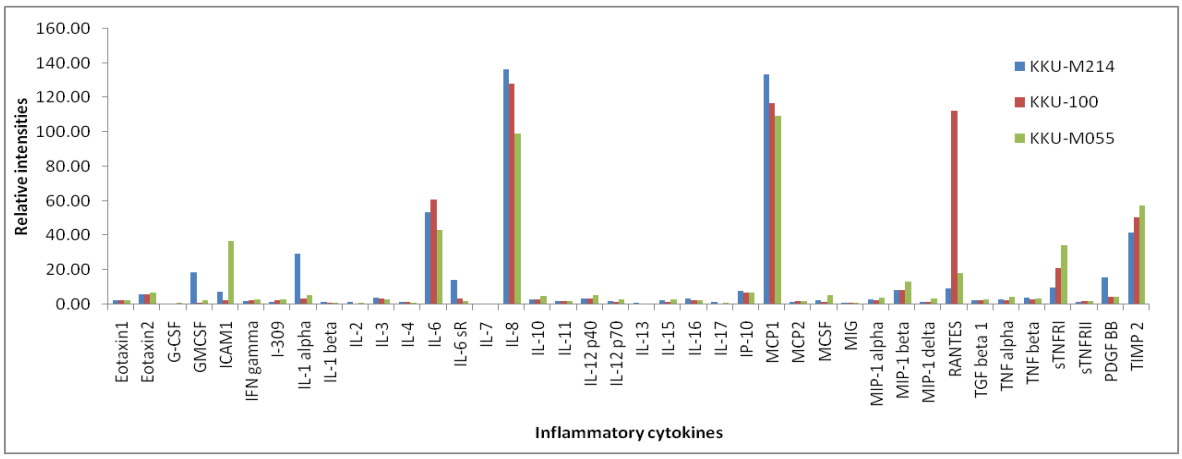
4.1 ผลของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อ macrophage

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยอาศัย inflammatory cytokine array ซึ่งสามารถวัดปริมาณ inflammatory cytokine ได้ 40 ชนิด โดยในขั้นต้นได้วัดปริมาณการแสดงออกของ inflammatory cytokine ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 3 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-M055, KKU-M214 เพื่อให้ทราบลักษณะการแสดงออกและการหลั่งโปรตีนโดยทั่วไปในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการแสดงออกของ inflammatory cytokine ที่หลั่งจากเซลล์ทั้ง 3 ชนิดมีแบบแผนที่มีลักษณะเฉพาะของแต่ละเซลล์ แต่ทั้ง 3 เซลล์มีการหลั่ง interleukin-6 (IL-6), IL-8, MCP-1 และ TIMP2 เหมือนกัน (รูปที่ 3-21) และเมื่อเปรียบเทียบการหลั่งของ inflammatory cytokine ทั้ง 40 ชนิดระหว่าง KKU-M214 และ KKU-M214L5 พบว่าเซลล์ KKU-M214L5 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ inflammatory cytokine 9 ชนิดใน (cut-off = 1.5 เท่า) ได้แก่ GM-CSF, IL-6, sTNGRI, TNF-α, IL-1β, PDGF-BB IL-12p70, IP-10, RANTES (รูปที่ 3-22) โดยจากค้นคว้าเอกสารอ้างอิงพบว่า cytokine เหล่านี้มีเป้าหมายออกฤทธิ์ที่ fibroblast หรือเม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะ macrophage

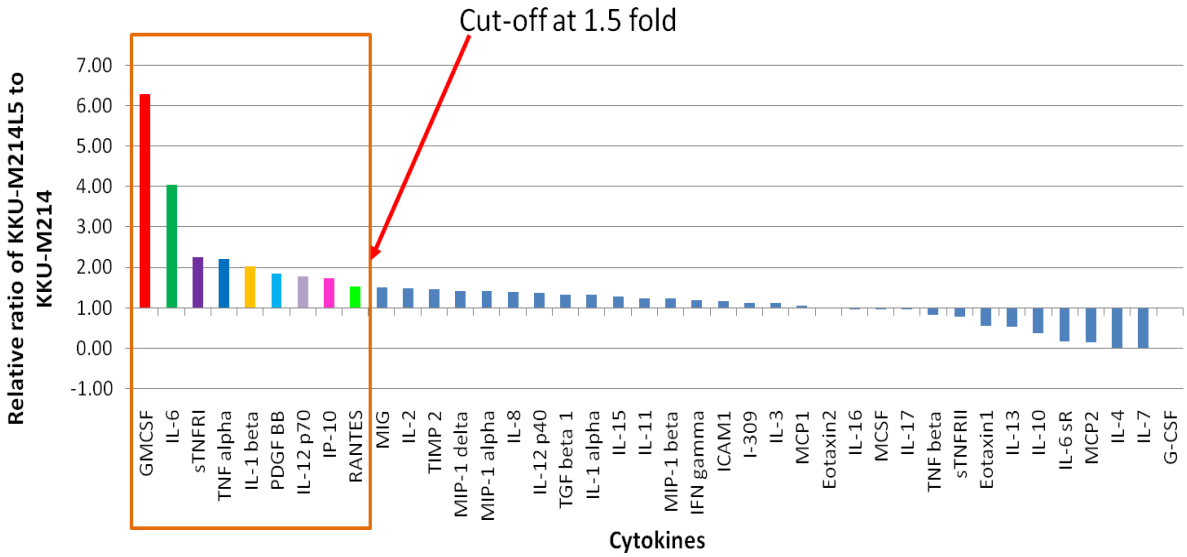
เนื่องจากผลจาก cytokine array พบการหลั่งของ GM-CSF มากขึ้นในเซลล์ KKU-214L5 ซึ่งมีความสามารถในการแพร่กระจายสูง คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าการแสดงออกของ GM-CSF ที่เพิ่มขึ้นใน KKU-214L5 นั้นอาจสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้น จึงทำการตรวจวัดการแสดงออกของ GM-CSF ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดการแสดงออกของ GM-CSF โดยวิธี immunohistochemistry (รูปที่ 3-23) เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจะดำเนินการตรวจวัดในเนื้อเยื่อมะเร็งและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ GM-CSF กับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วย และจะศึกษาบทบาทของ cytokine อีก 8 ชนิดที่พบการสร้างและหลั่งเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสามารถแพร่กระจายสูงต่อไป

เพื่อศึกษาบทบาทของสารคัดหลั่งของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อเซลล์แวดล้อม คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารคัดหลั่งของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ต่อความสามารถในการจดจำและ phagocytosis ของเซลล์ macrophage ที่ได้จากการกระตุ้น monocyte ในเลือดให้พัฒนาเป็นเซลล์ macrophage (monocyte-derived macrophage; MDM) พบว่าการเลี้ยงเซลล์ MDM ในอาหารที่มีสารคัดหลั่งจาก KKU-M213 ทำให้ความสามารถในการจดจำและ phagocytosis เซลล์มะเร็งของเซลล์ MDM มีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3-24A) และเมื่อวิเคราะห์โปรตีนคัดหลั่งพบว่าการเลี้ยง MDM ในสารคัดหลั่งจาก KKU-M213 ทำให้เซลล์ MDM ที่ถูกกระตุ้นหลั่งโปรตีน (secreted products) ต่างจากเซลล์ MDM ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารคัดหลั่งจาก KKU- M213 (รูปที่ 3-24B) เช่น มีการหลั่งเพิ่มขึ้นของ IL-6, IL-8, GRO, MCP-2, MCP-3 และ

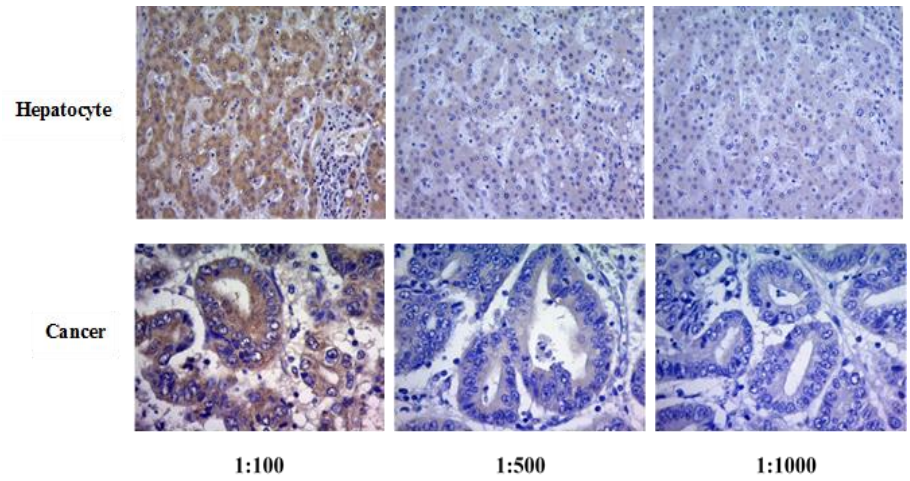
ANG ซึ่งอยู่ในระหว่างการค้นคว้าหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวเพื่อวางแผนศึกษากลไกการทำงาน โดยมุ่งหวังว่าจะสามารถนำไปเป็นเป้าหมายในการรักษาโดยยับยั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีกับ macrophage ได้



รูปที่ 3-21 การแสดงออกของ inflammatory cytokine 40 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-100, KKU-M055, KKU-M214 เมื่อตรวจวัดโดย cytokine array

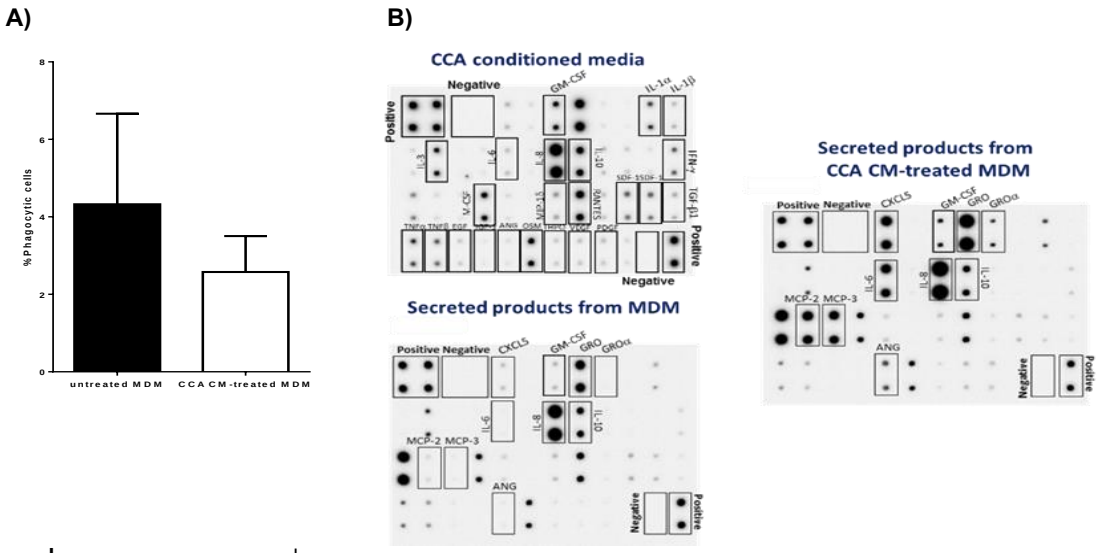


รูปที่ 3-22 การแสดงออก inflammatory cytokine 40 ชนิดในเซลล์ KKU-M214L5 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ KKU-214 พบว่ามี 9 cytokine ที่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน KKU-M214L5 มากกว่า 1.5 เท่า (แสดงในกรอบสีแดง)



รูปที่ 3-23 การแสดงออกของ GM-CSF ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตับปกติ เมื่อทำการย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ความเข้มข้นของ antibody ที่แตกต่างกัน

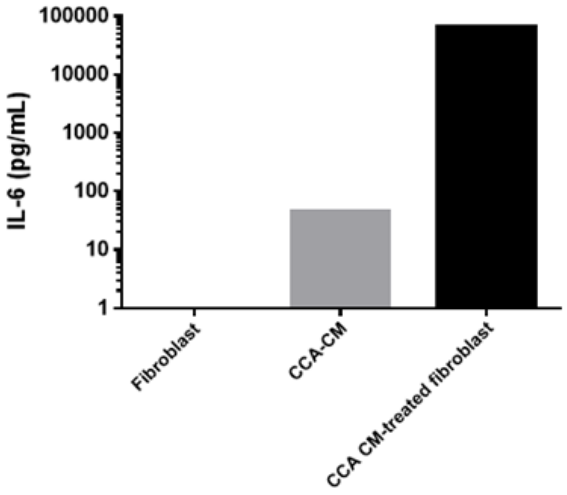
เพื่อศึกษาบทบาทของสารคัดหลั่งของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อเซลล์แวดล้อม คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารคัดหลั่งของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ต่อความสามารถในการจดจำและ phagocytosis ของเซลล์ macrophage ที่ได้จากการกระตุ้น monocyte ในเลือดให้พัฒนาเป็นเซลล์ macrophage (monocyte-derived macrophage; MDM) พบว่าการเลี้ยงเซลล์ MDM ในอาหารที่มีสารคัดหลั่งจาก KKU-M213 ทำให้ความสามารถในการจดจำและ phagocytosis ของเซลล์ MDM มีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3-24A) และเมื่อวิเคราะห์โปรตีนคัดหลั่งพบว่าโปรตีน (secreted products) ในสารคัดหลั่งของ MDM ที่ถูกกระตุ้นจาก KKU-M213 ต่างจากเซลล์ MDM ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารคัดหลั่งจาก KKU- M213 (รูปที่ 3-24B) เช่น มีการหลั่งเพิ่มขึ้นของ IL-6, IL-8, GRO, MCP-2, MCP-3 และ ANG ซึ่งอยู่ในระหว่างการค้นคว้าหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวเพื่อเป็นเป้าหมายในการรักษาโดยยับยั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีกับ macrophage ต่อได้



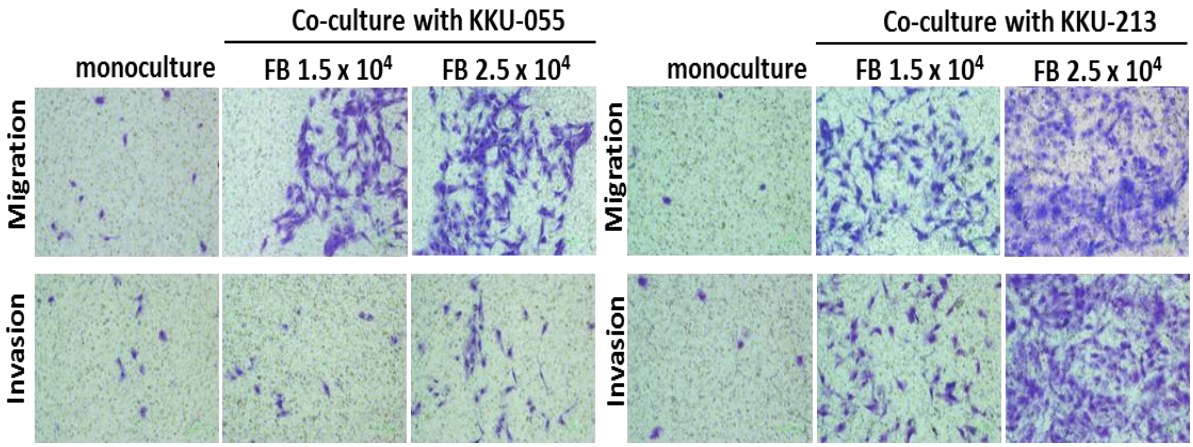
รูปที่ 3-24 ผลของสารคัดหลั่งจาก KKU-213 (CCA conditioned media; CCA-CM) ต่อ (A) การ phagocytosis ของ MDM และ (B) ต่อการหลั่งสารของ MDM (secreted products)

4.2 ผลของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อ fibroblast

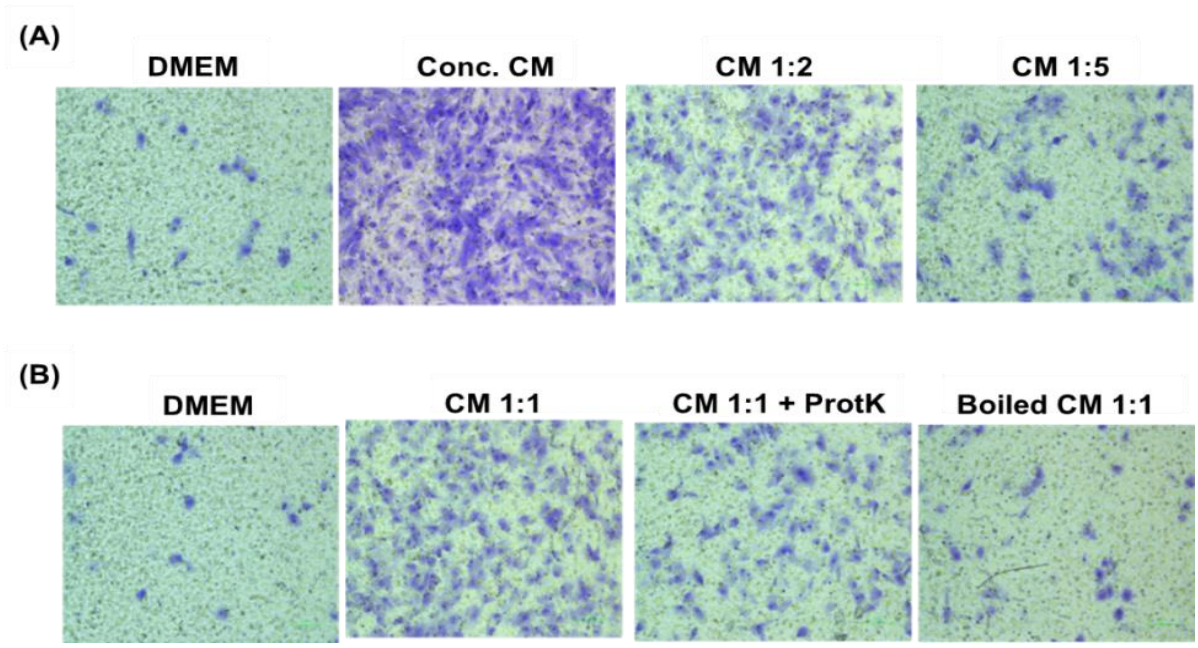
คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารคัดหลั่งของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ต่อเซลล์ fibroblast โดยอาศัย immortalized fibroblast (OUMS-24) พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ immortalized fibroblast ในอาหารที่มีสารคัดหลั่งจาก KKU-M213 (CCA conditioned media; CCA-CM) พบว่า CCA-CM กระตุ้นให้ fibroblast หลั่ง IL-6 เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3-25) ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาบทบาทของ IL-6 ที่เพิ่มขึ้นต่อทั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์แวดล้อมมะเร็ง นอกจากนี้ได้ศึกษาบทบาทของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในการดึงดูด (chemotactic activity) เซลล์ fibroblast โดยเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์ fibroblast ร่วมกันแบบไม่สัมผัส (non-contact co-culture) ใน Boyden chamber ทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-055 และ KKU-213 (cell-type specific) และทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblast ในภาวะที่มีหรือไม่มี extracellular matrix (Matrigel) ที่ด้านบนของ transwell ของ Boyden chamcer พบว่าเมื่อเลี้ยง KKU-055 และ KKU-213 ร่วมกับเซลล์ fibroblast มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast เคลื่อนที่และรุกรานมากขึ้น ตามปริมาณของเซลล์ fibroblast ตั้งต้นที่ใช้ (รูปที่ 3-26) เพื่อพิสูจน์ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการดึงดูด fibroblast นั้น อยู่ในน้ำเลี้ยงหรือเป็นสารที่หลั่งจากจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 (conditioned media; CM) ต่อการเคลื่อนที่ของ fibroblast พบว่า เมื่อเลี้ยง fibroblast ใน Boyden chamber โดยมีน้ำเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ใน lower chamber สามารถดึงดูดเซลล์ fibroblast ได้ ตามความเข้มข้นของ CM (รูปที่ 3-27A) กล่าวคือ น้ำเลี้ยงที่เจือจาง 1:5 สามารถดึงดูดเซลล์ fibroblast ได้น้อยกว่าน้ำเลี้ยงที่เข้มข้น (conc. CM) และเพื่อพิสูจน์เบื้องต้นว่าสารในน้ำคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติดึงดูดเซลล์ fibroblast เป็นโปรตีน ได้ทดลองทำลายโปรตีนในน้ำคัดหลั่งโดยใช้เอนไซม์ Proteinase K และทำให้เสียสภาพโดยความร้อน พบว่าทั้ง 2 วิธี ทำให้จำนวนเซลล์ fibroblast ที่ถูกดึงดูดลดลง (รูปที่ 3-27B) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่า สารในน้ำคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติดึงดูดเซลล์ fibroblast น่าจะเป็นโปรตีน



รูปที่ 3-25 ผลของสารคัดหลั่งจาก CCA (CCA conditioned media; CCA-CM) ต่อการหลั่ง IL-6 ของ immortalized fibroblast



รูปที่ 3-26 ผลของการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่และรุกรานของของเซลล์ fibroblast โดยเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-055 และ KKU-213 เมื่อตรวจวัดโดยใช้วิธี Boyden chamber assay เมื่อไม่มี (migration) และมี matrigel (invasion) ที่ด้านบนของ transwell ของ Boyden chamber



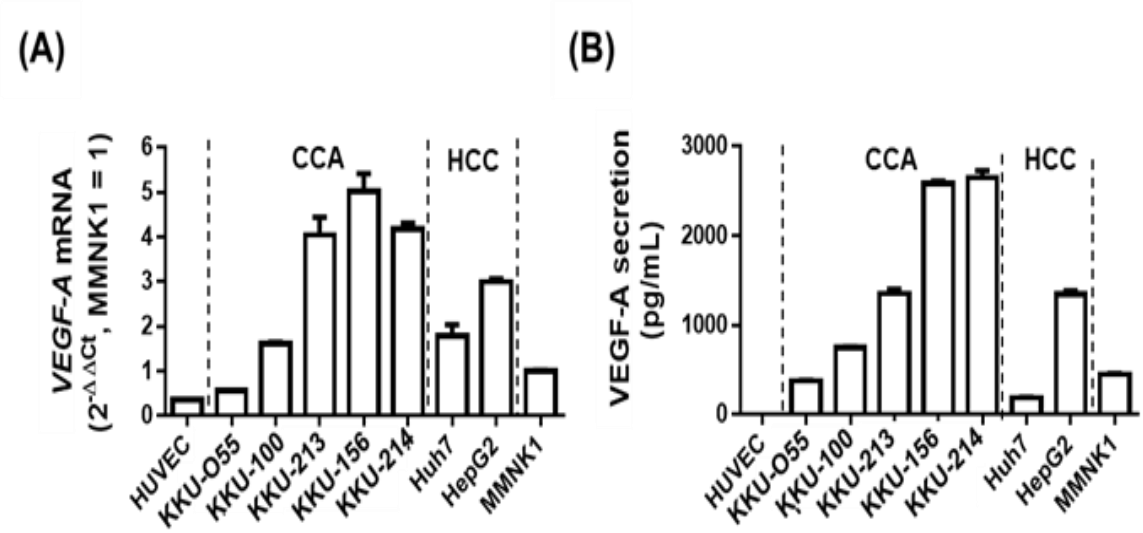
รูปที่ 3-27 ปัจจัยของสารคัดหลั่งจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ที่มีผลต่อการดึงดูดเซลล์ fibroblast เปรียบเทียบ กรณีที่ (A) ใช้น้ำเลี้ยงจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (CM) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (หมายเหตุ conc. CM = CM ที่ไม่ได้เจือจาง, CM 1:1 = CM ที่เจือจางด้วย DMEM อัตราส่วน CM 1 ส่วนผสมกับ DMEM 1 ส่วน) (C) ความสามารถของ CM ในการดึงดูดเซลล์ fibroblast เมื่อย่อยโปรตีนใน CM ด้วยเอนไซม์ Proteinase K หรือทำให้เสียสภาพโดยความร้อน (หมายเหตุ ProtK = Proteinase K, boiled = แช่ CM ในน้ำเดือด 10 นาที)

จากผลการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยจะทำการแยกวิเคราะห์องค์ประกอบของ CM ที่มีผลดึงดูด fibroblast และศึกษาหน้าที่และกลไกทำงานต่อไป โดยมุ่งหวังว่าหากสามารถป้องกันการทำงานของโปรตีน

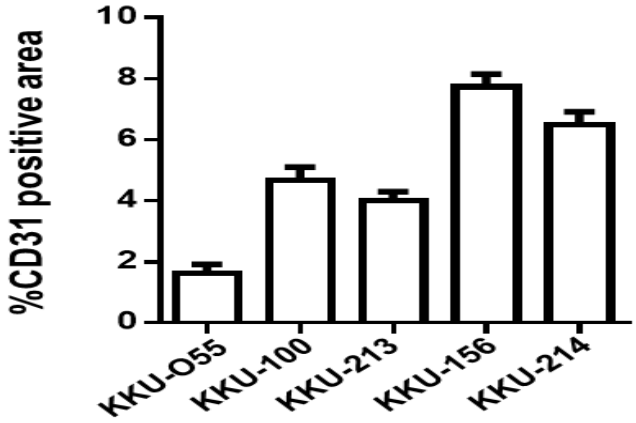
ดังกล่าวได้ อาจทำลายระบบนิเวศน์ของมะเร็ง ทำให้ก้อนมะเร็งเกิด fibrosis ลดลง ทำให้ยาหรือการรักษาอื่น ๆ เข้าถึงเซลล์มะเร็งได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต

4.3 ผลของสารคัดหลั่ง VEGF ต่อการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดีและการรักษา

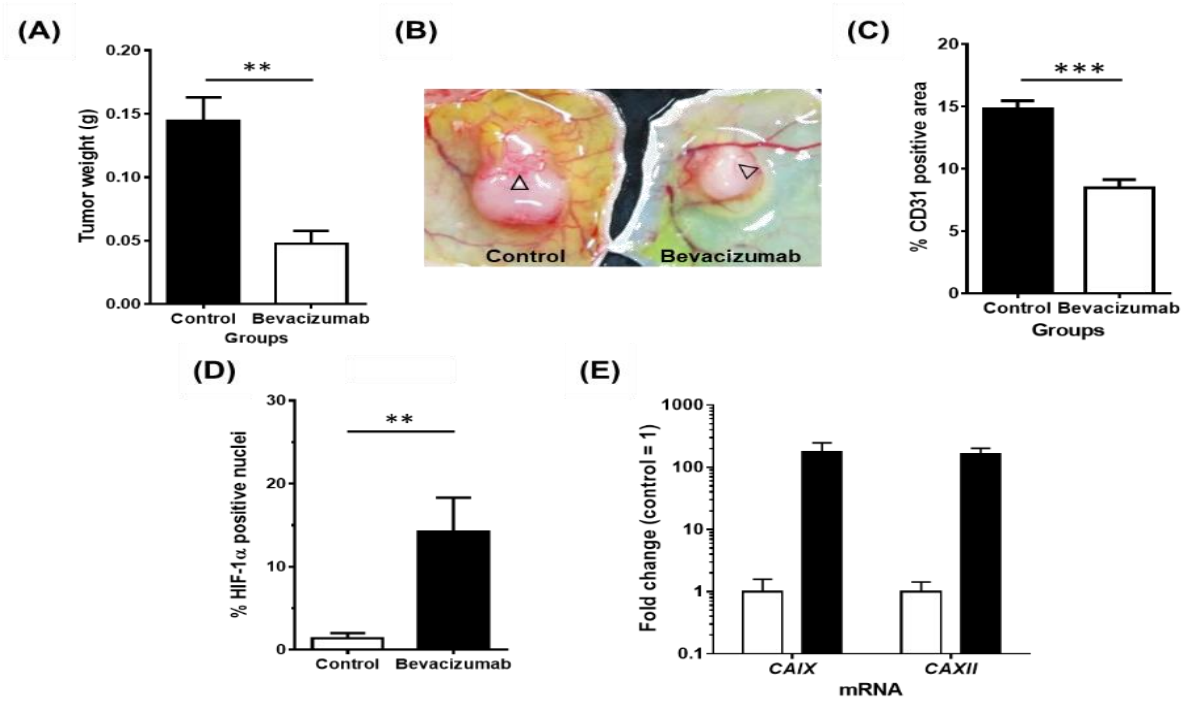
นอกเหนือจากนี้ เนื่องจากมีรายงานว่าในมะเร็งท่อน้ำดี มีการแสดงออกและการหลั่งของ vascular endothelial growth factor (VEGF) มาก แต่พบว่าการรักษาโดยอาศัย neutralizing antibody ต่อ VEGF หรือ bevacizumab ไม่ให้ผลดีเท่าที่ควร คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาบทบาทของ VEGF ในมะเร็งท่อน้ำดี และผลของการรักษาด้วย bevacizumab ต่อมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของ VEGF เพิ่มขึ้นทั้งในระดับ mRNA และระดับโปรตีนที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 3-28) โดยปริมาณ VEGF ที่สร้างและหลั่งออกมานั้นสูงกว่าเซลล์มะเร็งตับ เนื่องจากหน้าที่หลักของ VEGF คือการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือด และคณะผู้วิจัยได้ทดสอบบทบาทของ VEGF ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่ไม่พบผลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (ไม่ได้แสดงผล) จึงทดสอบบทบาทของ VEGF ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในหนูทดลอง โดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง พบว่า VEGF ที่สร้างออกมามีผลต่อการสร้างหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง โดยก้อนมะเร็งที่เกิดจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่สร้างและหลั่ง VEGF ปริมาณมากจะพบหลอดเลือดหนาแน่นมากกว่าก้อนมะเร็งที่เกิดจากเซลล์มะเร็งที่สร้างและหลั่ง VEGF น้อย (รูปที่ 3-29) ผลที่ได้สนับสนุนสมมติฐานว่า VEGF ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือด ดังนั้นการรักษาด้วยการยับยั้งการทำงานของ VEGF โดยใช้ neutralizing antibody ต่อ VEGF เช่น bevacizumab น่าจะได้ผลดี คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบสมมติฐานในหนูทดลองโดยปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง และทำการรักษาโดยการฉีด bevacizumab เข้าที่ช่องท้องหนูทดลองทุก 3 วัน พบว่าการใช้ bevacizumab มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ (รูปที่ 3-30A) โดยผลยับยั้งการเจริญเติบโตนั้นเกิดจากการยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (รูปที่ 3-30B และ 3-30C) แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดส่งผลให้เกิดกระบวนการปรับตัว โดยการกระตุ้นการแสดงออกของ HIF-1α (รูปที่ 3-30C) ซึ่งมีผลกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ carbonic anhydrase (CA)-IX และ CA-XII (รูปที่ 3-30D) ซึ่งจะส่งผลให้มะเร็งเกิดการปรับตัวอยู่ได้ในสภาวะที่มีหลอดเลือดลดลงและเกิดการดื้อต่อการรักษาด้วย bevacizumab ในภายหลัง คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carbonic anhydrase ด้วย acetazolamide โดยให้ acetazolamide ร่วมกับ bevacizumab ในหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการรักษาได้ผลดีกว่าการรักษาด้วย bevacizumab หรือ acetazolamide เพียงอย่างเดียว เมื่อตรวจวัดน้ำหนักของก้อนมะเร็งและวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยตรวจวัดปริมาณที่แสดงออก proliferative marker, Ki-67 โดยวิธี immunohistochemistry (รูปที่ 3-31) จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ามะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีการแสดงออกของ VEGF ในปริมาณสูง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง เมื่อยับยั้งการทำงานของ VEGF จะลดความหนาแน่นของหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง ทำให้เกิดการปรับสภาพโดยเพิ่มการแสดงออกของ HIF-1∞, CA-IX และ CA-XII ทำให้มะเร็งเกิดการดื้อต่อการรักษาด้วย bevacizumab ในภายหลัง ดังนั้นการรักษาร่วมระหว่าง CA inhibitor, acetazolamide กับ bevacizumab จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและลดอัตราการดื้อต่อการรักษาด้วยยาเดี่ยวได้ ผลการศึกษานี้จะช่วยพัฒนาแนวทางการรักษามะเร็งท่อน้ำดีได้ในอนาคต



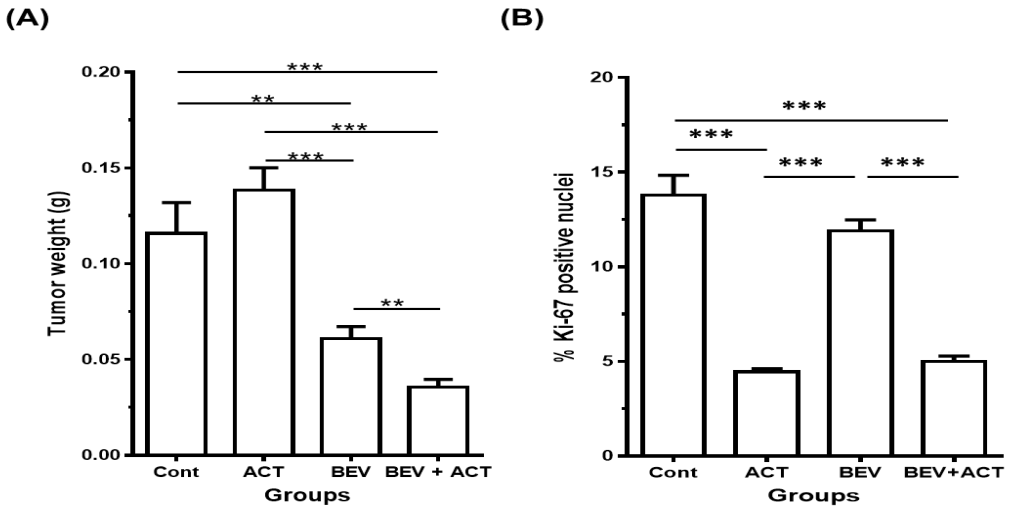
รูปที่ 3-28 การแสดงออกของ VEGF ทั้งในระดับ mRNA (A) และโปรตีนที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ (B) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด ได้แก่ KKU-055, KKU-100, KKU-156, KKU-213, KKU-214 เปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดี (immortalized cholangiocyte; MMNK1) เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) และเซลล์มะเร็งตับ 2 ชนิด ได้แก่ HepG2 และ Huh7



รูปที่ 3-29 ความหนาแน่นของหลอดเลือดในก้อนเนื้อที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 3-30 ผลของการรักษาด้วย VEGF neutralizing antibody (bevacizumab) ต่อการเจริญของก้อนมะเร็ง (A) การสร้างหลอดเลือด (B) ความหนาแน่นของ endothelial cells (C) การแสดงออกของ HIF-1∞ (D) และการแสดงออกของ carbonic anhydrase (CA)-IX และ CA-XII (**P<0.01, ***P<0.001)



รูปที่ 3-31 เปรียบเทียบน้ำหนักของก้อนมะเร็งในหนูที่ปลูกถ่ายด้วยเซลล์ KKU-213 (A) เมื่อได้รับการรักษาด้วย carbonic anhydrase inhibitor (acetazolamide, ACT), bevacizumab (BEV) หรือ bevacizumab ร่วมกับ acetazolamide (BEV+ACT) (B) การแสดงออกของ Ki67 ในชิ้นเนื้อ (**P<0.01, ***P<0.001)

ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยนี้

1. **ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ** จำนวน 6 เรื่อง ได้แก่

1. Vaeteewoottacharn, K., et al., Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma. Tumour Biol, 2016. 37(7): p. 9023-35.

2. Kanlayanee Sawanyawisuth, Nattawat Tantapotinan, Ratthaphol Kraiklang, Anucha Puapairoj, Chaisiri Wongkham, Gregory J Riggins, Sopit Wongkham. Suppression of trophoblast cell surface antigen 2 enhances proliferation and migration in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Annal Hepatol, 2016. 15(1), 71-81. (IF = 2.065)

3. Uthaisar, K., et al., Establishment and characterization of a novel human cholangiocarcinoma cell line with high metastatic activity. Oncol Rep, 2016. 36(3): p. 1435-46.

4. Dana, P., et al., Upregulation of CD147 promotes metastasis of cholangiocarcinoma by modulating the epithelial-to-mesenchymal transitional process. Oncol Res. 2017. 25(7): p 1047-59.

5. Dana P, et. al., Repurposing cimetidine for cholangiocarcinoma: antitumor effects in vitro and in vivo. Oncology Lett. 2017. 13(3): p 1432-6.

6. Saentaweesuk W, et al., Activation of vimentin is critical to promote a metastatic potential of cholangiocarcinoma cells. Oncol Res. 2017 Jul 25. doi: 10.3727/096504017X15009778205068.

2. **ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการ**ทั้งระดับชาติและระดับนานาชาติ จำนวน 28 เรื่อง

2.1 Saentaweesuk W, et. al. เรื่อง Anoikis resistance-associated proteins in a high metastatic cholangiocarcinoma cell line demonstrated by label-free proteomic analysis ในการประชุม Pre-congress symposium: clinical research based on CASCAP tools ในวันที่ 6 ตุลาคม 2557 ณ ห้องบรรยาย 3-4 อาคารเตรียมวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.2 Saentaweesuk W, et. al. เรื่อง Establishment and characterization and proteomic analysis of a highly metastasis cholangiocarcinoma cell line; KKU-M214L5 ในการประชุมวิชาการ International conference on Research and Social Devotion in commemoration of 50th anniversary of Khon Kaen University, Thailand (มหาวิทยาลัยขอนแก่นครบรอบ 50 ปี) ระหว่างวันที่ 22-23 มกราคม 2558 ณ อาคารพจน์สารสิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

2.3 Phimsen S เรื่อง Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of cholangiocarcinoma ในการประชุม Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for cancer research ระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 ณ ห้องประชุม อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.4 Saentaweesuk W, et. al. เรื่อง Differential proteomic profile of a high metastatic cholangiocarcinoma cell line; KKU-M214L5 and its parental; KKU-M214 revealed by a label-free proteomic analysis ในการประชุม The 13th Annual Meeting of The Japanese Proteomics Society

(JHUPO2015) ระหว่างวันที่ 23-24 กรกฎาคม 2558 ณ Kumamoto Shintoshin Plaza, Kumamoto, ประเทศญี่ปุ่น

2.5 Saentaweesuk W, et. al., เรื่อง Altered expressions of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in KKU-214L5; a lung metastatic cholangiocarcinoma cell line ในการประชุม The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association "From collaboration to integration: Cancer researches for patients' benefit" 8-10 October 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya ประเทศญี่ปุ่น

2.6 Sombun T., et. al., เรื่อง Role of Anterior gradient 2 (AGR2) in metastatic cholangiocarcinoma ในการประชุมวิชาการ The 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference. วันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

2.7 Phimsen S., et. al., เรื่อง Roles of Anterior gradient 2 (AGR2) in metastatic cholangiocarcinoma ในการประชุมวิชาการ Frontier for Cancer Research II หัวข้อ Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications ในวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์

2.8 Phimsen S., et. al., เรื่อง Roles of Anterior gradient 2 (AGR2) in metastatic cholangiocarcinoma ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 16 วันที่ 11-13 มกราคม 2560 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

2.9 Saentaweesuk W, et. al. เรื่อง Membrane proteomic analysis revealed glioma pathogenesis-related protein 1 as a key protein for metastasis of cholangiocarcinoma ในการประชุม RGJ - Ph.D. Congress ครั้งที่18 ณ โรงแรม Richmond Stylish Conventional จ. นนทบุรี ระหว่างวันที่ 8 – 10 มิถุนายน 2560

2.10 Saentaweesuk W, et. al. เรื่อง Glioma pathogenesis-related protein 1 might associated with metastasis in cholangiocarcinoma cells ในการประชุม The 5th Asia Pacific Protein Association Conference and the 12th International Symposium of the Protein Society of Thailand. ระหว่างวันที่ 11-14 กรกฎาคม 2560 ณ The Tide Resort บางแสน จ.ชลบุรี

2.11 Sombun T., et. al., เรื่อง Anterior gradient 2 (AGR2) expression promotes metastasis of cholangiocarcinoma. ในการประชุม The 5th Asia Pacific Protein Association Conference and the 12th International Symposium of the Protein Society of Thailand. ระหว่างวันที่ 11-14 กรกฎาคม 2560 ณ The Tide Resort บางแสน จ.ชลบุรี

2.12 Saentaweesuk W, et. al. เรื่อง Heterogeneity of E-cadherin and vimentin expressing cells is essential for highly metastatic cholangiocarcinoma cells. ในการประชุม การประชุม The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ระหว่างวันที่ 28-30 กันยายน 2560 ณ เมืองโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น

2.13 Dana P, et. al., Suppression of CD147 expression reduced metastatic activity of cholangiocarcinoma in vitro and in vivo ในการประชุม 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology ระหว่างวันที่ 9-12 ธันวาคม 2557 ณ School of Life Science and School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad ประเทศอินเดีย

2.14 Dana P, et. al. เรื่อง Silencing of CD147 by RNA interference suppressed tumor cell invasion and metastatic potential of cholangiocarcinoma, in vitro and in vivo ในการประชุม การประชุมสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วทท) ครั้งที่ 40 “Science and Technology towards ASEAN Development” ระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิด จ. ขอนแก่น

2.15 Dana P, et. al . เรื่อง CD147 promotes tumor cell invasion and metastasis of cholangiocarcinomaในการประชุมวิชาการ International conference on Research and Social Devotion in commemoration of 50th anniversary of Khon Kaen University, Thailand (มหาวิทยาลัยขอนแก่นครบรอบ 50 ปี) ระหว่างวันที่ 22-23 มกราคม 2558 ณ อาคารพจน์ สารสิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

2.16 Dana P, et. al. เรื่องCholangiocarcinoma products-treated fibroblast potentiates tumor growth; a promising target for CCA treatment ในการประชุมวิชาการ Frontier for Cancer Research II หัวข้อ Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications ในวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์

2.17 Dana P, et. al., เรื่อง Inhibition of CD147 Expression Suppressed the Metastatic Activity of Cholangiocarcinoma ในการประชุมวิชาการ The 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference. วันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

2.1.18 Vaeteewoottacharn K, et. al., เรื่อง Inhibition of CD47; “don’t eat me”, signaling attenuates cholangiocarcinoma growth and metastasis ในการประชุมวิชาการ The 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference. วันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

2.19 Vaeteewoottacharn K, et. al., เรื่อง Inhibition of CD47; “don’t eat me”, signaling attenuates cholangiocarcinoma growth and metastasis ในการประชุมวิชาการ The 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference. วันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

2.20 Pothipan P, et. al., เรื่อง Role of CD47 on progression of cholangiocarcinoma ใน การประชุมวิชาการประจำปี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 32 ประจำปี 2559 ระหว่าง วันที่ 11-13 ตุลาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.21 Dana P, et. al., เรื่อง Deletion of CD147 gene inhibited ability of cholangiocarcinoma cells by regulating monocarboxylate transporter ในการประชุม การประชุม The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ระหว่างวันที่ 28-30 กันยายน 2560 ณ เมืองโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น

2.22 Vaeteewoottacharn K, et. al., เรื่อง Blocking of CD47 promotes MDM-mediated phagocytosis and suppresses the growth and metastasis of cholangiocarcinoma ในการประชุม การประชุม The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ระหว่างวันที่ 28-30 กันยายน 2560 ณ เมืองโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น

2.23 Pothipan P, et. al., เรื่อง High CD47 expression correlates with a shorter survival and lymph node metastasis of cholangiocarcinoma subgroup ในการประชุม การประชุม The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ระหว่างวันที่ 28-30 กันยายน 2560 ณ เมืองโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น

2.24 Vaeteewoottacharn K, et. al. เรื่อง Inhibition of carbonic anhydrase enhances anti-VEGF, bevacizumab, therapy in CCA in vivo ในการประชุม Pre-congress symposium: clinical research based on CASCAP tools ในวันที่ 6 ตุลาคม 2557 ณ ห้องบรรยาย 3-4 อาคารเตรียมวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.25 Vaeteewoottacharn K, et. al. เรื่อง Roles of tumor releasing factors in CCA-microenvironment interaction and cancer progression ในการประชุม Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for cancer research ระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 ณ ห้องประชุม อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.26 Dana P, et. al. เรื่องCholangiocarcinoma products-treated fibroblast potentiates tumor growth; a promising target for CCA treatment ในการประชุมวิชาการ Frontier for Cancer Research II หัวข้อ Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications ในวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์

2.27 Jantra J., et. al., Overexpression of secretory leukocyte protease inhibitor promotes the proliferation and invasiveness of cholangiocyte. การประชุม The 5th Asia Pacific Protein Association Conference and the 12th International Symposium of the Protein Society of Thailand. July 11-14, 2017, The Tide Resort, Bangsaen, Thailand. ISBN:978-616-92908-0-3; p62-71 (Proceeding)

2.28 Sombun T., et. al., Knockdown of Anterior gradient 2 (AGR2) expression suppresses cell proliferation, migration and invasion of metastatic cholangiocarcinoma cells. การประชุม The 43rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT 43). October 17-19, 2017, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (Proceeding)

3. บัณฑิตศึกษา

3.1. ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาเอก จำนวน 2 คน ได้แก่

- ดร. ปวีณา ดานะ บัณฑิตจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเศก (คปก.) สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เมื่อ 5 มิถุนายน 2559 และได้รับอนุมัติจบจากสภามหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อ 28 มีนาคม 2560 ปัจจุบันทำงานในตำแหน่ง Postdoc ในห้องปฏิบัติการของ ศ. โสพิศ วงศ์คำ

- น.ส. วรพร แสนทวีสุข สอบป้องกันวิทยานิพนธ์แล้ว เมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์อีกฉบับเพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก

3.2 นักศึกษาที่อยู่ระหว่างการศึกษา 6 คน

- นางสาวภัทรินทร์ โพธิพันธุ์ นักศึกษาปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภายใต้การดูแลของ ผศ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์)
- นางสาวปิยะนาฏ บุญเนตร นักศึกษาปริญญาเอก ชั้นปีที่ 2 หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภายใต้การดูแลของ ผศ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์)
- นางสาวภัคสิรี สรณารักษ์ นักศึกษาปริญญาโท ชั้นปีที่ 2 หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภายใต้การดูแลของ ผศ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์)
- นางสาวจีรนันท์ จันทรา นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 หลักสูตรชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภายใต้การดูแลของ อ.ดร.สุชาดา พิมเสน กำหนดสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ วันที่ 7 พฤศจิกายน 2560)
- นายธีระยุทธ สมบุญ นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 หลักสูตรชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภายใต้การดูแลของ อ.ดร.สุชาดา พิมเสน กำหนดสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ วันที่ 17 พฤศจิกายน 2560)
- นายสัจจพจน์ มั่นประสงค์ นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 2 หลักสูตรชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภายใต้การดูแลของ อ.ดร.สุชาดา พิมเสน กำหนดสอบโครร่างวิทยานิพนธ์ วันที่ 29 พฤศจิกายน 2560)

4. **ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย**

4.1 ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์

- ได้รับทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2558 ระหว่างวันที่ 1 มีนาคม 2558 - 29 กุมภาพันธ์ 2559 เรื่องบทบาทของ CD147 ในสารคัดหลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีต่อปฏิสัมพันธ์ของเซลล์มะเร็งและเซลล์แวดล้อมมะเร็งและการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดี เป็นหัวหน้าโครงการ จำนวน 320,000 บาท

- ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2557 ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2557 – 31 มีนาคม 2559 (รวม 1 ปี 6 เดือน) เรื่อง บทบาทของ antiphagocytic signal; CD47 ในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ จำนวน 120,000 บาท
- เป็นผู้ร่วมวิจัย ทุน Sagawa Scientific Research Grant จาก the Japan Science Society โดยมีหัวหน้าโครงการ ได้แก่ Dr. Ryusho Kariya และ Professor Seiji Okada, Kumamoto University, Japan เรื่อง Functional analysis of tumor associated macrophage using human monocyte transplanted mice and therapeutic application ระหว่างปี 2558-2559 จำนวนประมาณ 300,000 บาท
- ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2559-2561 ระยะเวลา 3 ปี เรื่อง บทบาทของมะเร็งท่อน้ำดีในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันต่อการดำเนินโรคเพื่อเป็นเป้าหมายในการรักษา จำนวน 750,000 บาท
- ได้รับทุนส่งเสริมบัญฑิต ของมูลนิธิอานันทมหิดล แผนกแพทยศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 ระยะเวลา 2 ปี เรื่องบทบาทของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์แวดล้อมมะเร็งในการดำเนินโรคมะเร็งท่อน้ำดี เป็นหัวหน้าโครงการ จำนวน 480,000 บาท

4.2 อ. ดร. สุชาดา พิมเสน

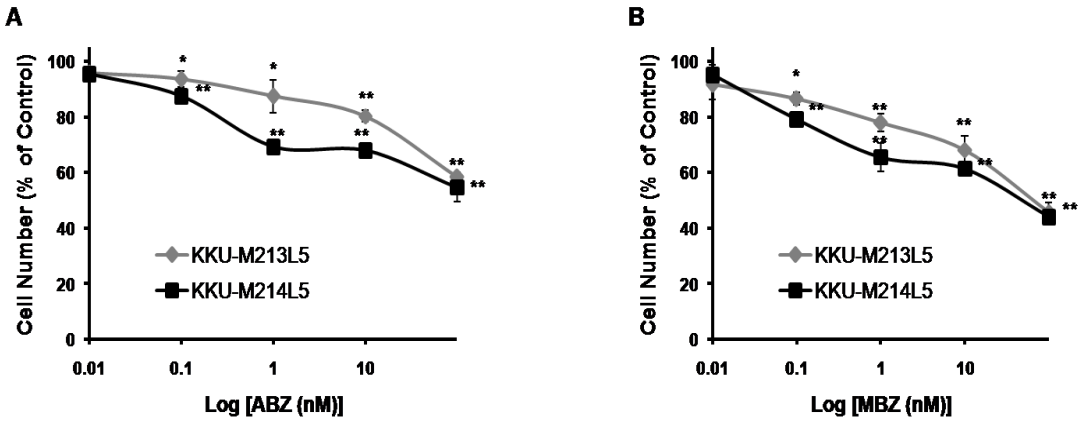
- ได้รับทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558 ระยะเวลา 2 ปี (TRG5880055) จำนวน 600,000 บาท เรื่องบทบาทของ Anterior gradient-2 (AGR2) ต่อการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี

<u>แผนงานวิจัยที่ 4 การพัฒนายาอื่นที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษามะเร็ง (Drug repositioning))</u>

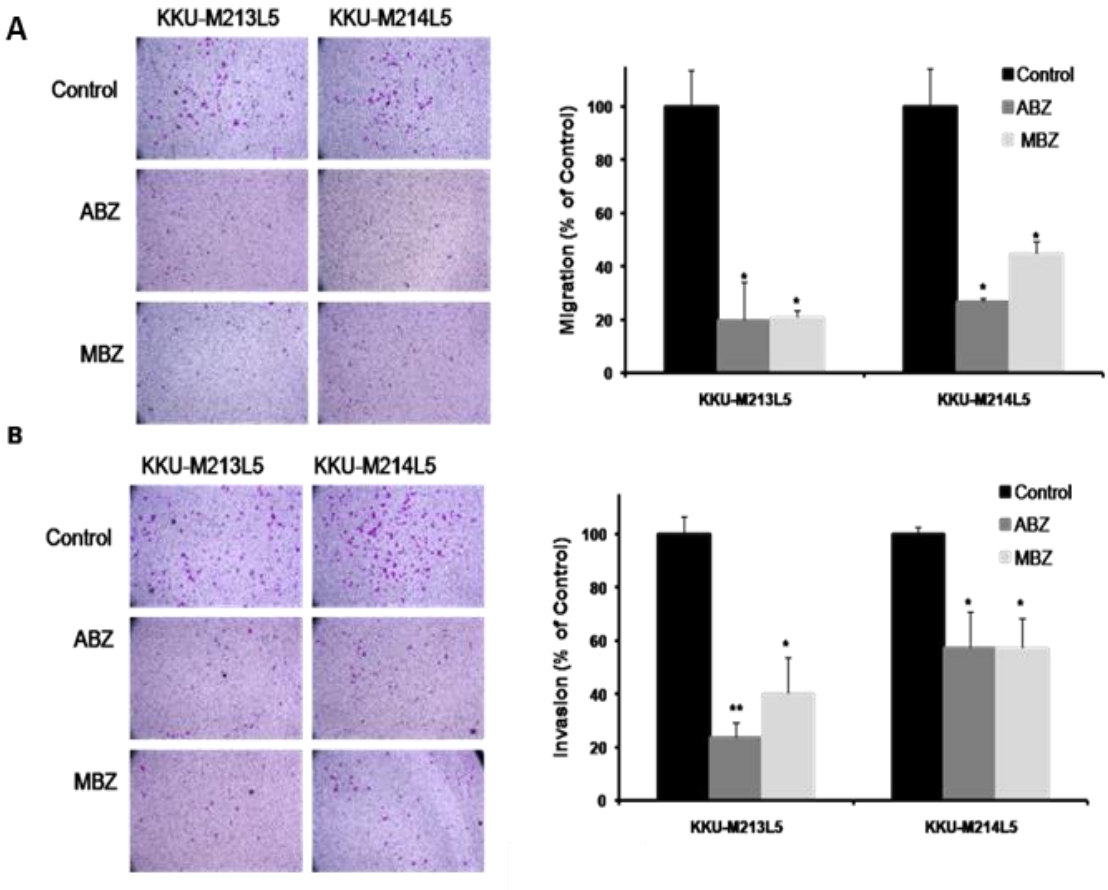
การคิดค้นยาใหม่ในการรักษาโรคมะเร็งต้องผ่านกระบวนการทดสอบต่าง ๆ ทั้งในระดับเซลล์ สัตว์ทดลอง และการทดสอบในมนุษย์หลายระยะ รวมเวลาทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 10-15 ปี ซึ่งเป็นการลงทุนที่ใช้งบประมาณสูงมากกว่าจะได้ยาที่นำมาบริการในท้องตลาด และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยารักษามะเร็งส่วนใหญ่ในปัจจุบันมีราคาแพง สำหรับประเทศไทย นักวิจัยจำนวนมากได้แสวงหาสารสกัดสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งส่วนใหญ่แสดงผลทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ปัจจุบันได้มีแนวคิดใหม่ในการนำยาอื่น ๆที่ไม่ใช่ยารักษามะเร็งแต่มีการใช้แล้วในเวชปฏิบัติ มาทดสอบศักยภาพในการรักษามะเร็ง เรียกแนวทางนี้ว่า Drug repositioning หรือ Drug repurposing มีรายงานหลายชิ้นที่แสดงว่า ยารักษามาลาเรีย chloroquine และ artesunate ยาฆ่าพยาธิ mebendazole และยารักษาเบาหวาน metformin มีศักยภาพสูงในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิดทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง เนื่องจากยาที่กล่าวถึงทั้งหมดเป็นยาที่ผ่านการรับรองและใช้ในมนุษย์มานานแล้ว มีข้อมูลด้านฤทธิ์ยาและเภสัชจลศาสตร์ชัดแจ้ง จึงตัดปัญหาเรื่องความปลอดภัยและผลข้างเคียงเมื่อนำมาใช้กับผู้ป่วยมะเร็ง chloroquine สามารถยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งและสามารถยืดระยะรอดชีพของผู้ป่วยได้เมื่อทดสอบในผู้ป่วยมะเร็ง glioblastoma ส่วน mebendazole มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดเช่นกันและมีการทดสอบแล้วในผู้ป่วย metastatic adrenocortical carcinoma แล้ว อย่างไรก็ตามการนำยาเหล่านี้มาใช้กับมะเร็งผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำเป็นต้องมีการวิจัยศึกษาในระดับโมเลกุลและสัตว์ทดลองก่อน ดังนั้นแผนงานวิจัยนี้ได้แบ่งเป็น 3 โครงการย่อย โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบประสิทธิภาพของยาที่ไม่ใช่ยารักษามะเร็ง แต่มีการใช้แล้วในเวชปฏิบัติเพื่อรักษาโรคอื่น ๆ ได้แก่ ยา albendazole (ALZ), mebendazole (MBZ), artesunate (ART), chloroquine (CQ) และ metformin ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการทดสอบฤทธิ์ในทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง ก่อนที่จะขยายการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

<u>โครงการที่ 1 ผลของยา albendazole (ABZ) และ mebendazole (MBZ) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี</u>

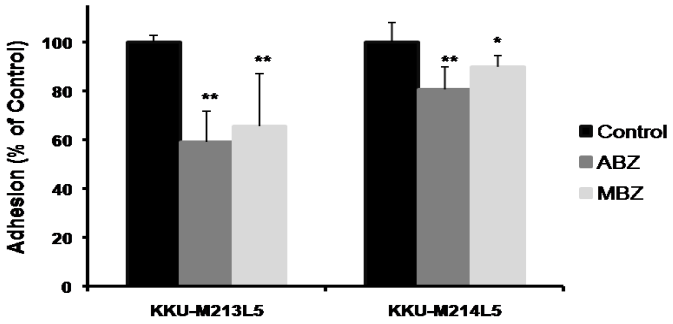
ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยา albendazole (ABZ) และ mebendazole (MBZ) ในการยับยั้ง cell proliferation, migration/invasion และ adhesion ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีคุณสมบัติแพร่รุกรานสูง คือ KKU-213L5 และ KKU-214L5 พบว่า ABZ และ MBZ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งสองชนิดได้ในระดับนาโนโมลาร์ (nM) ดังรูปที่ 4-1A และ 14-1B ตามลำดับ นอกจากนี้ยา ABZ และ MBZ ในระดับนาโนโมลาร์ (nM) สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ (cell migration) และการแพร่รุกราน (invasion) (รูปที่ 4-2) โดยสามารถลดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้มากกว่า 80% และลดจำนวนเซลล์ที่แพร่รุกรานได้ 40-80% นอกจากนี้ยาทั้งสองชนิดสามารถลดการยึดติด (cell adhesion) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด KKU-213L5 และ KKU-214L5 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4-3)



รูปที่ 4-1 ABZ และ MBZ ในระดับนาโนโมลาร์ (nM) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 4-2 ABZ และ MBZ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ความสามารถในการเคลื่อนที่ (A) และการแพร่รุกราน (B) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับ ABZ และ MBZ



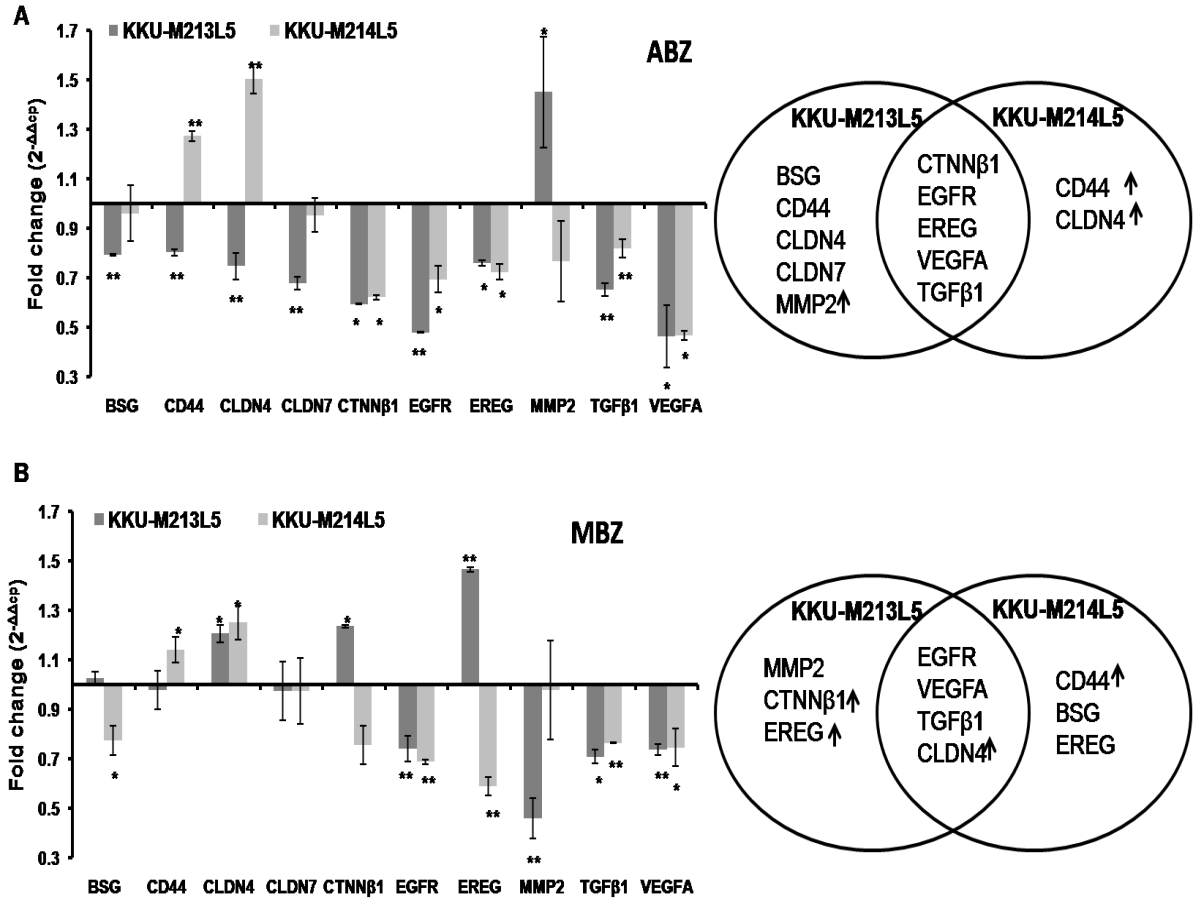
<u>รูปที่ 4-3</u> ABZ และ MBZ สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษา พบว่า ABZ และ MBZ สามารถควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ และหากใช้ในความเข้มข้นต่ำระดับนาโนโมลาร์ ยาสามารถยับยั้งคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อให้เกิดความเข้าใจและองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกของยา ABZ และ MBZ ในการควบคุมการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลกระทบของยา ABZ และ MBZ ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 10 ยีน พบว่า ABZ มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน CTNNβ1, EGFR, EREG, VEGFA, และ TGFβ ในขณะที่ MBZ มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน EGFR, VEGFA, TGFβ และ CLDN4 (รูปที่ 4-4) ซึ่งจะได้ทำการตรวจสอบยืนยันในระดับโปรตีนต่อไป

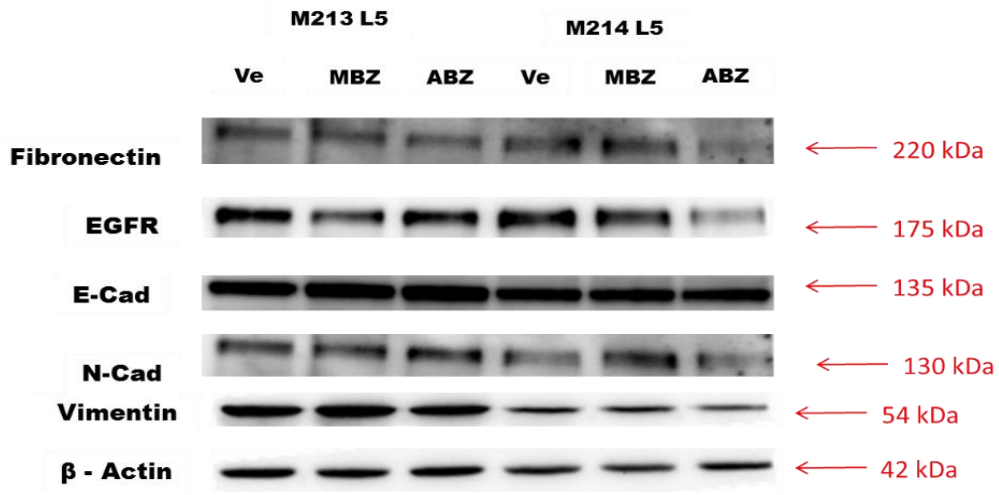
จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cell migration และ invasion ได้แก่ Fibronectin, EGFR, E-cadherin, N-cadherin และ Vimentin โดยวิธี western blot พบว่าการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงทั้ง 2 ชนิดคือ M213L5 และ M214L5 ในยา ABZ และ MBZ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4-5

คณะผู้วิจัยได้ทำ pilot study เพื่อศึกษาแนวทางในการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (xenograft) ใน nude mice ที่ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยสั่งซื้อ nude mice จาก ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมาทดสอบจำนวน 4 ตัว ทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง 3 ตัว และเป็นกลุ่มควบคุม 1 ตัว ผลการทดลองพบว่าสามารถปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (M213, M214) ในหนูได้ทุกตัว และสามารถเลี้ยงได้นานโดยไม่มีการติดเชื้อตลอด 5-6 สัปดาห์ **ยกเว้น** ขนาดก้อนมะเร็งโตเกินไปเมื่อเวลานานขึ้น ทำให้เกิด การแตก (leak) ซึ่งมีผลต่อการวัดขนาดของ tumor ดังแสดงในรูปที่ 4-6 ซึ่งต้องมีการปรับลดขนาดของจำนวนเซลล์มะเร็งที่ฉีดและระยะเวลาในการหยุดการทดสอบ

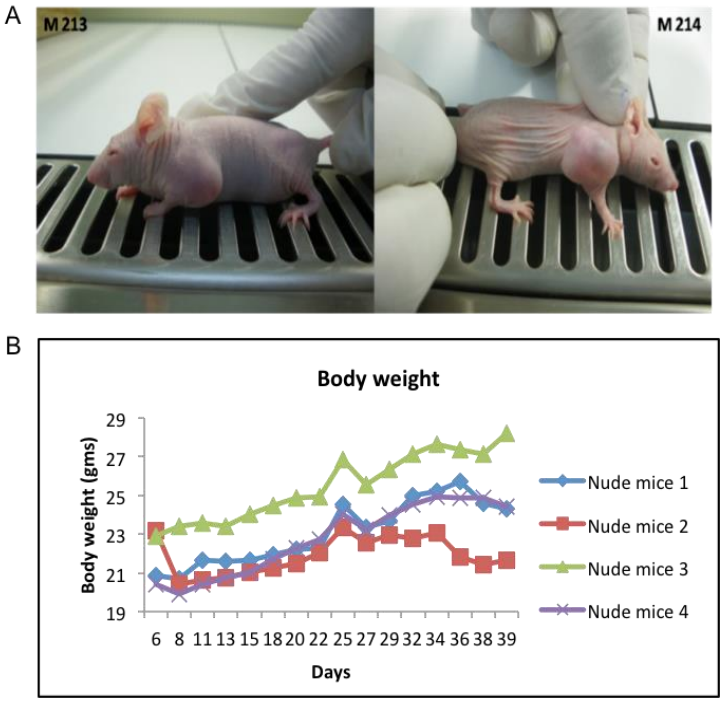
นอกจากนี้ยังได้ทดลองทำ pilot study สำหรับ Tail vein injection metastasis model เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการลุกลามของมะเร็ง ผลการทดสอบพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการและตรวจวิเคราะห์ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีไปยังปอดได้ ดังรูปที่ 4-7 การศึกษาในสัตว์ทดลองประสบปัญหาว่า nude mice ที่สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา มีการติดเชื้อที่ปอด ซึ่งไม่เหมาะสมและไม่ได้คุณภาพที่จะนำมาทดสอบได้ จึงไม่ได้ดำเนินการต่อ อย่างไรก็ตามได้ คณะผู้วิจัยได้พิจารณาปรับแผนการทดลองนี้โดยจะขอความร่วมมือในการวิจัยที่เกี่ยวกับสัตว์ทดลองในต่างประเทศแทน ซึ่งขณะอยู่ระหว่างการเจรจาและวางแผนการทดลองร่วมกัน



รูปที่ 4-4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลของ ABZ (A) และ MBZ (B) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

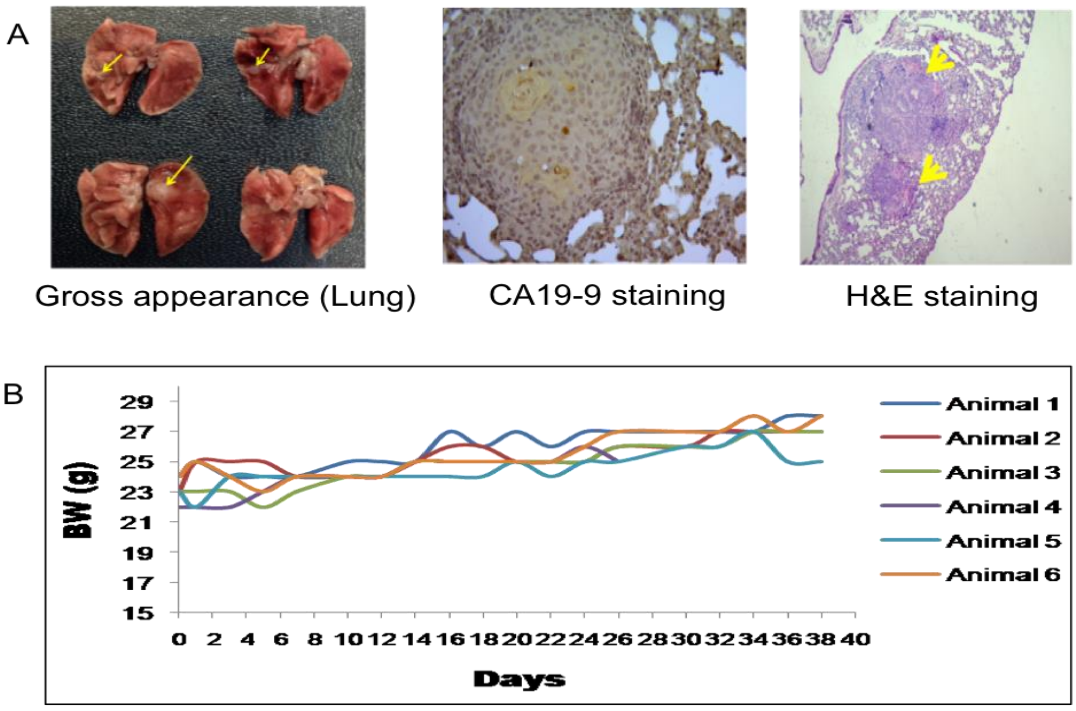


รูปที่ 4-5 MBZ ลดการแสดงออกของโปรตีน Fibronectin, EGFR, E-cadherin, N-cadherin และ Vimentin โดยวิธี western blot



<u>รูปที่ 4-6</u> การปลูกถ่ายเซลล์ มะเร็งท่อน้ำดีใน nude mice

(A) ผลการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (xenograph) โดยการฉีด sub cutaneous สามารถทำให้เกิดก้อน มะเร็งที่วัดขนาดได้ (B) น้ำหนักตัวหนูที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี



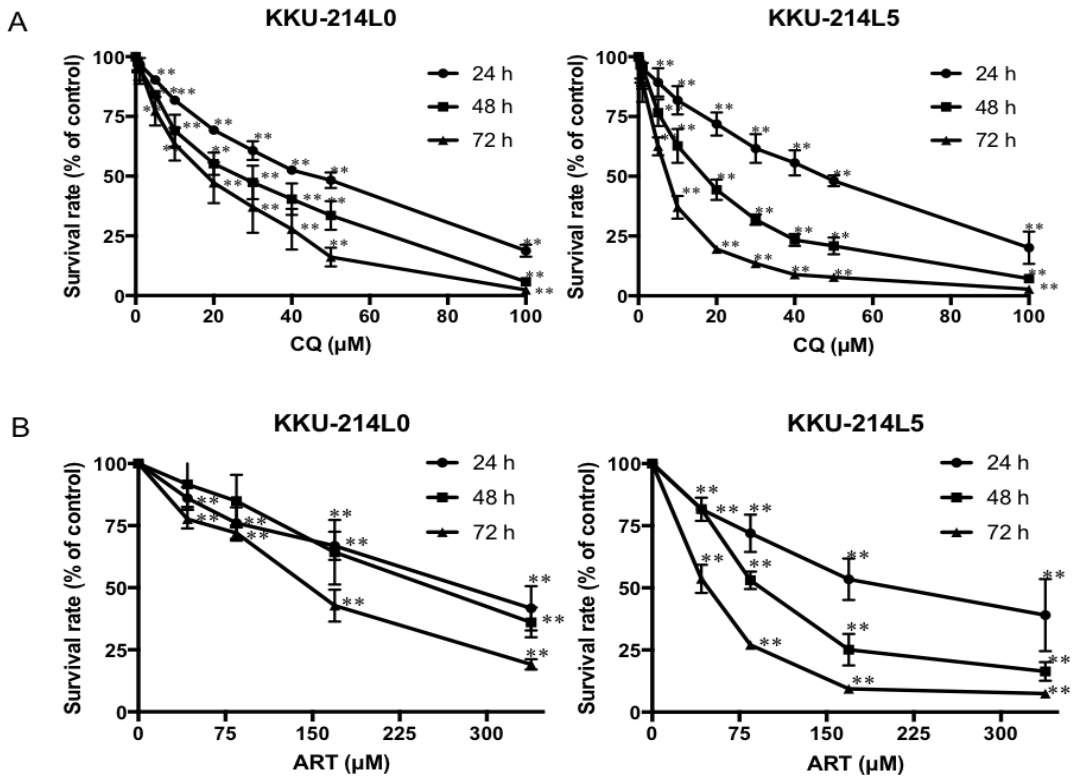
<u>รูปที่ 4-7</u> Tail vein injection metastasis model เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการลุกลามของมะเร็ง

(A) การฉีดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ tail vein ของ nude mouse สามารถทำให้เกิดการแพร่กระจายของ มะเร็งไปยังปอด และแสดงผลด้วยการย้อม CA19-9 และ Hematoxylin-eosin (H&E) โดยที่ (B) น้ำหนักตัวหนู ที่ได้รับการฉีดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทาง tail vein ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวหนู

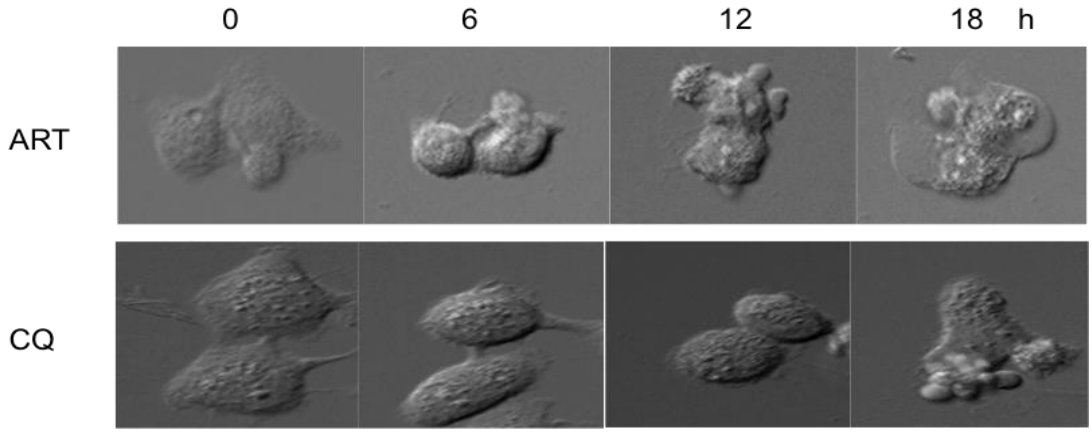
<u>โครงการที่ 2 ผลของยา artesunate และ chloroquine ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี</u>

เนื่องจากมีรายงานการใช้ยารักษามาลาเรียในการกำจัดมะเร็งหลายชนิด คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ artesunate (ART) และ chloroquine (CQ) ในการกำจัดเซลล์มะเร็ง โดยทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีต้นแบบ (KKU-214L0) และ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแพร่กระจายสูง (KKU-214L5) โดยใช้เทคนิค MTT พบว่า ทั้ง ART และ CQ สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้แปรผันตามขนาดของยาและเวลาที่ใช้ทดสอบ (รูปที่ 4-8) จากนั้นได้ศึกษาแบบแผนการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยยา ART และ CQ พบว่า ART กระตุ้นการตาบแบบ necrosis ส่วน CQ กระตุ้นการตายแบบ apoptosis (รูปที่ 4-9)

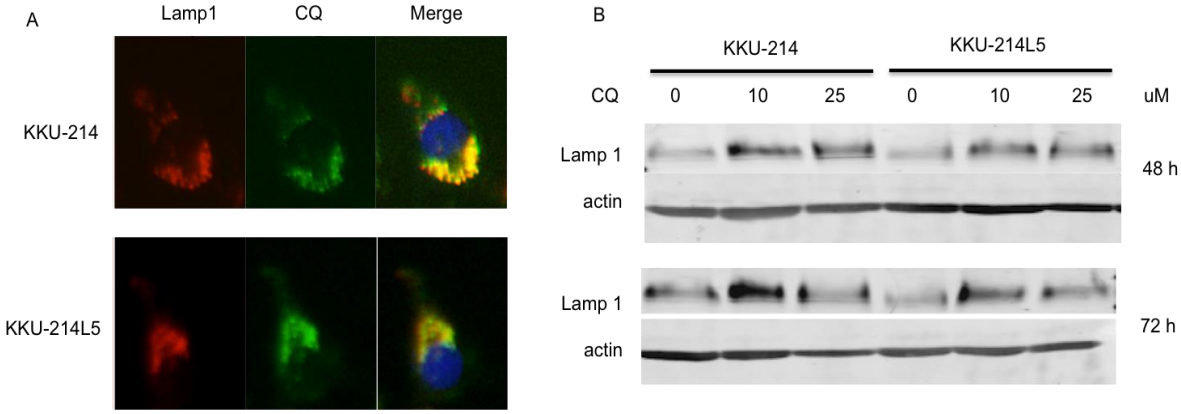
จากนั้นได้ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่กระตุ้นด้วย CQ พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีมีการสะสมของ CQ เพิ่มสูงขึ้นที่บริเวณ lysosme และ CQ สามารถกระตุ้นให้ lysosme เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ได้ทั้งนี้ (รูปที่ 4-10B) สันนิษฐานว่าอาจจะเกิดจากการยับยั้ง maturation ของ lysosome ทำให้กระบวนการทำงานของ lysosome ของเซลล์ผิดไปปกติ เป็นผลให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง



<u>รูปที่ 4-8</u> ผลของ ART และ CQ ต่อการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาอัตราการตายเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-214 (KKU-214L0) และ KKU-214L5 ในสภาวะที่มี ART (A) หรือ CQ (B) ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เทคนิค MTT ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ART และ CQ สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4-9 แบบแผนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกกระตุ้นด้วย ART และ CQ ยา ART และ CQ สามารถกระตุ้นแบบแผนการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-214 ได้แตกต่างกัน โดย (A) ART กระตุ้นการตายแบบ necrosis และ (B) CQ กระตุ้นการตายแบบ necrosis



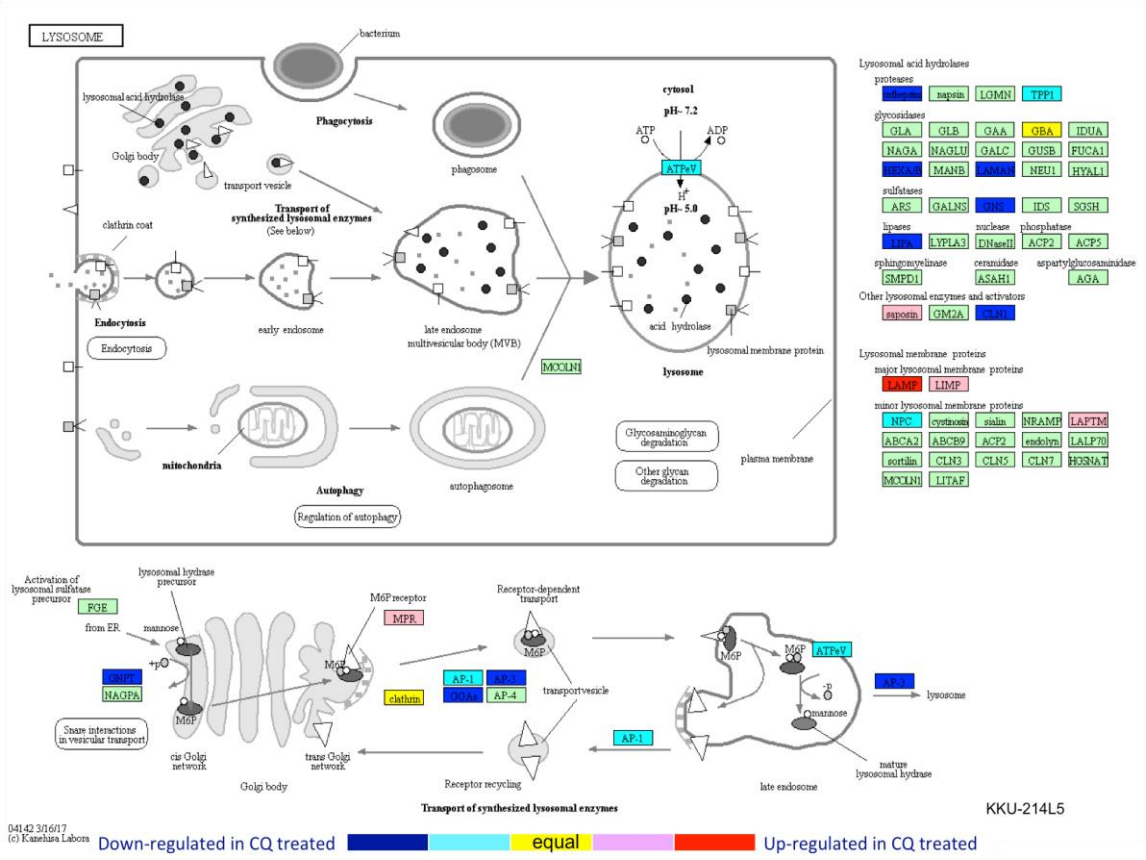
รูปที่ 4-10 ผลของ CQ ต่อ lysosome ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-214 และ KKU-214L5 มีการสะสม CQ ที่บริเวณของ lysosome ดัง แสดงด้วย lamp 1 (marker ของ lysosome) และพบว่า (B) มีการเพิ่มจำนวนของ lysosome เพิ่มขึ้นในเซลล์ ดังแสดงจากการเพิ่มขึ้นของ lamp1 ในเซลล์มากขึ้นเมื่อทดสอบด้วย CQ

เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองต่อยา CQ ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-214 และ KKU-214L5 ในระดับโมเลกุล คณะผู้วิจัยได้เลือกการศึกษาด้วย proteomics analysis โดยวิธี label free LC-MS/MS โดยเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์ที่ได้รับยาและไม่ได้รับ CQ (non-treated controls) พบว่า โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ lysosomal membrane มีการแสดงออกสูงเพื่อตอบสนองต่อยา CQ แต่การแสดงออกของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบใน lysosome มีปริมาณลดลง (ตารางที่ 4-1 และรูปที่ 4-11) แสดงให้เห็นว่า

maturation ของ lysosome มีความบกพร่องในเซลล์มะเร็งที่ได้รับยา CQ และสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้

ตารางที่ 4-1 Lysosomal proteins ที่แสดงออกเพื่อตอบสนองต่อยา CQ

Protein	Gene	KKU-214L0 (CQ to C)	KKU-214L5 (CQ to C)
Lysosomal membrane protein	Lamp1	0.28	Only CQ
	Lamp2	2.031	Only CQ
Mannose 6 -P receptor	M6PR	1.443	1.981
Saposin	PSAP	4.852	13.067
v-ATPase	ATP6V1H	0.708	0.103
lysosomal membrane protein 2	SCARB2	1.569	1.577
Lysosomal-associated transmembrane protein	LAPTM5/Lamp5	9.86	5.573
Dipeptidyl peptidase 9	DPP9	1.236	0.681
	DPP3	0.961	1.068
AP-3 complex	AP3D1	0.458	0.329
	AP3M1	0.588	0.445
	AP3B1	0.706	1.32
AP-1 complex subunit mu-2	AP1M2	0.571	0.768
Sortilin	SORT1	2.497	Not detected
Beta-hexosaminidase	HexA/B	0.3	Only Control
Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	0.157	Only Control
Glucosylceramidase	GBA	0.649	1.118
N-acetylglucosamine	GNS	0.378	Only Control
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	0.756	0.291
Epididymal secretory protein E1	NPC2	0.464	0.395
Cathepsin	CTSD	0.677	0.915
	CTSB	0.295	0.062
	CTSZ	0.169	Only Control
	CTSS	Not detected	Only Control



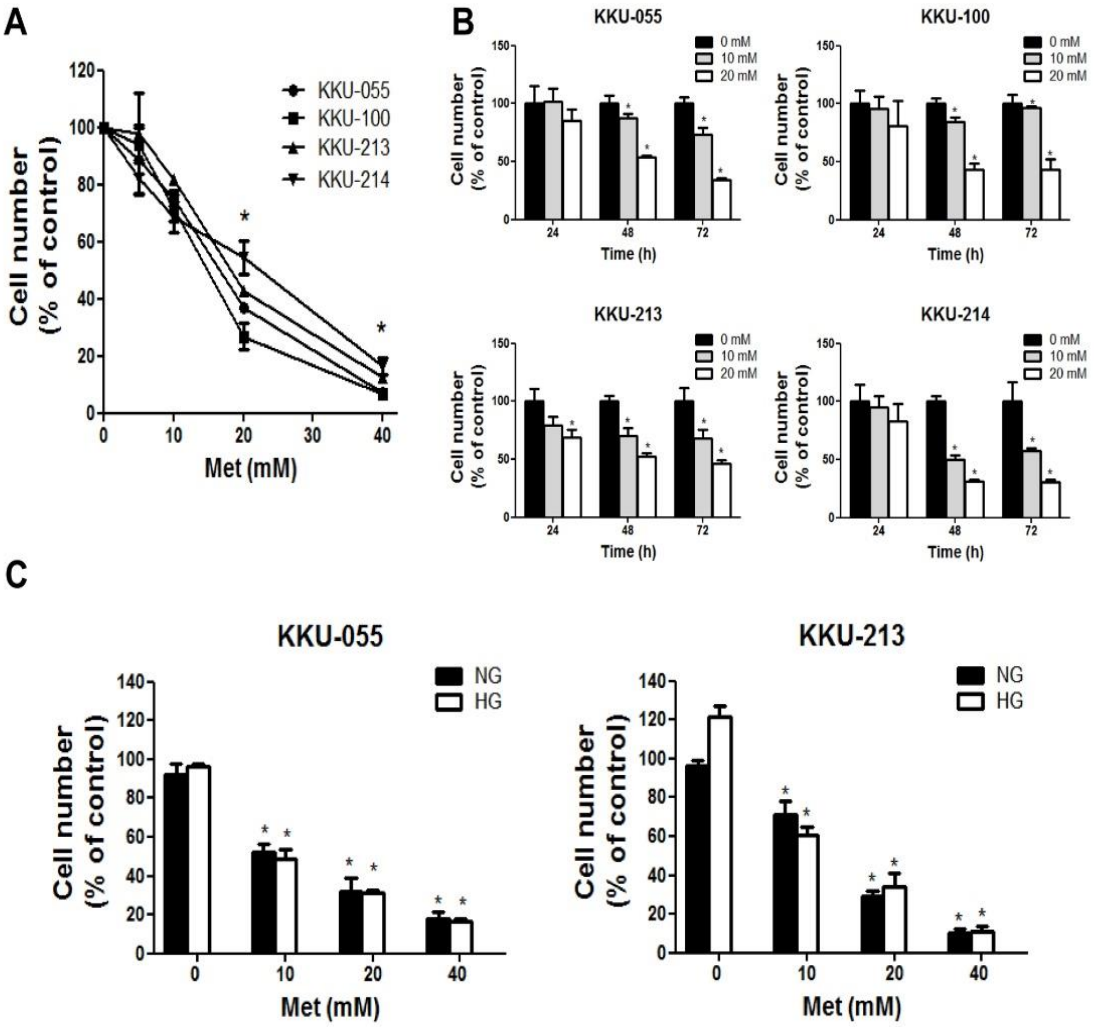
<u>รูปที่ 4-11</u> KEGG pathway analysis แสดงแบบแผนการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อยา CQ โดยวิธี proteomics ผลจากการศึกษาการแสดงออกของจีนเพื่อตอบสนองต่อยา CQ โดยวิธี label free LC-MS/MS analysis ได้นำไปวิเคราะห์แบบแผน (pathway analysis) โดยซอฟต์แวร์ Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes (KEGG, www.genome.jp/kegg/)

<u>โครงการที่ 3 ผลของยา metformin ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี</u>

Metformin เป็นยาที่ใช้รักษาภาวะเบาหวานและมีการใช้แพร่หลาย ในระยะหลังได้มีการนำยา metformin มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ซึ่งได้ผลดีในมะเร็งหลายชนิด อีกทั้งคณะผู้วิจัยได้รายงานความสัมพันธ์ของภาวะน้ำตาลในเลือดสูงสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีรวมทั้งพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และได้ทดสอบภาวะน้ำตาลสูงต่อการกระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ดังนี้ในโครงการนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของยา metformin ในการต้านมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการศึกษาผลของ metformin ต่อ cell proliferation, cell death และ metastasis ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ผลการทดสอบพบว่า metformin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ KKU-055, KKU-100, KKU-213, KKU-214 (รูปที่ 4-12) และผลในการต้านมะเร็งแปรผันตามขนาดของยาและเวลาที่ใช้ทดสอบ จากนั้นทำการศึกษากลไกของ metformin ในการยับยั้งการเจริญ

ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิด cell cycle arrest มากกว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย (apoptosis) โดยลดการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1 และเพิ่มการแสดงออกของ p21 (รูปที่ 4-13)

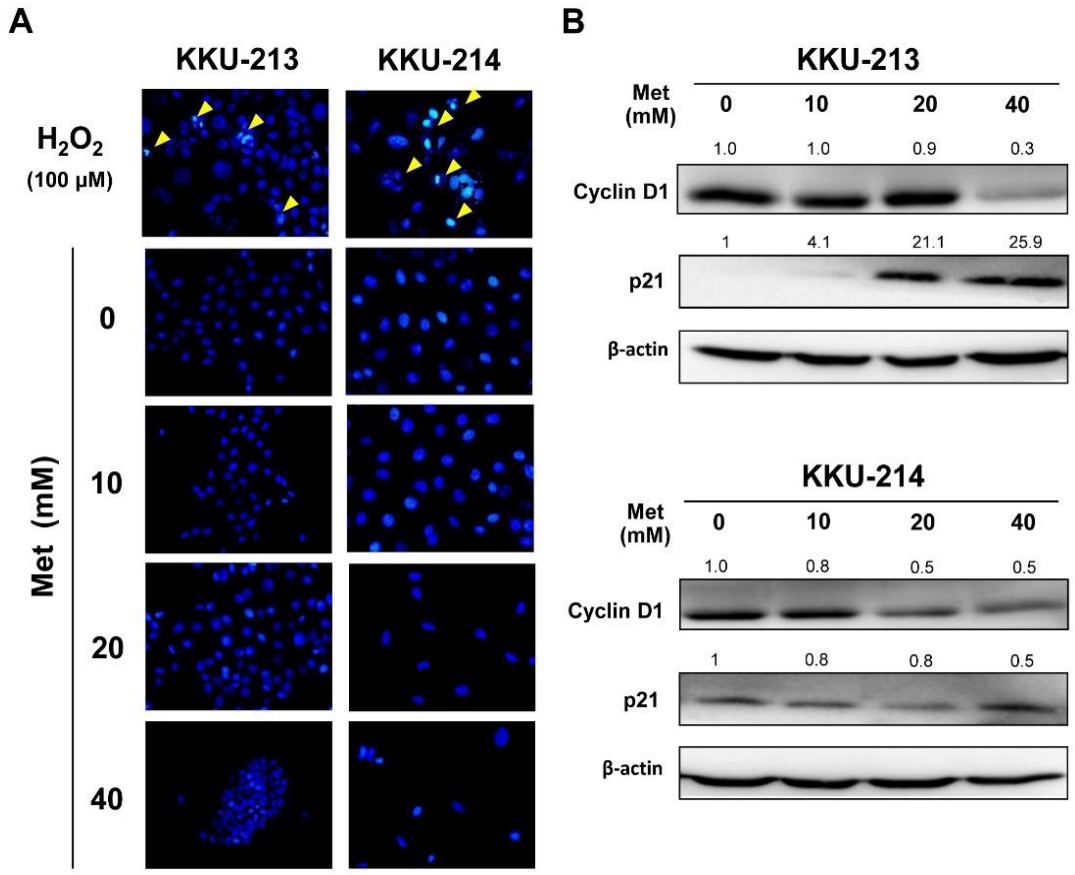
นอกจากนี้ metformin ยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยยับยั้ง migration, invasion และ anoikis resistance (รูปที่ 4-14)



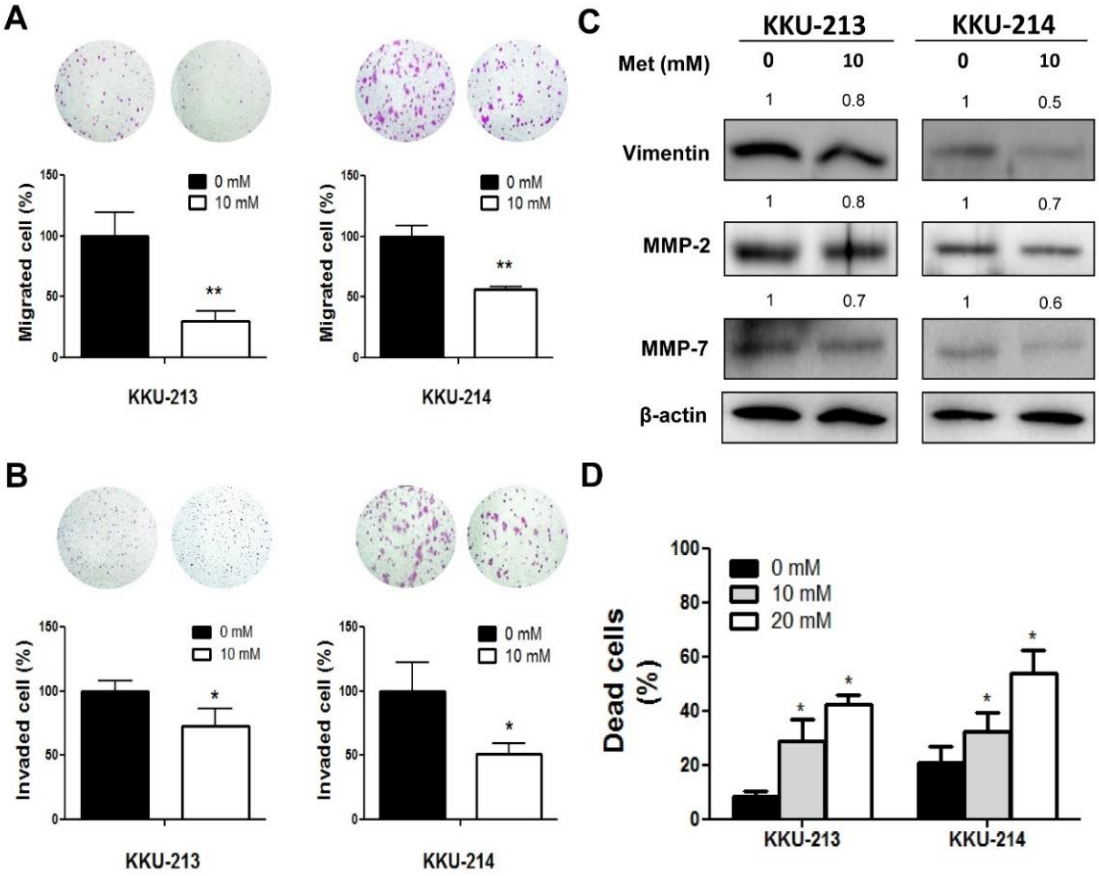
<u>รูปที่ 4-12</u> ยา metformin ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี Metformin ออกฤทธิ์แบบ anti-proliferation ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แปรผันตามขนาดของยาและเวลาที่ได้รับยา (A) ผลของ metformine ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ความเข้มข้นของยา 5, 10, 20 or 40 mM ในเวลา 48 ชั่วโมง (B) ฤทธิ์ของยา metformine ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในความเข้มข้นของยา 10 หรือ 20 mM ที่เวลา 24, 48 and 72 ชั่วโมง และ (C) metformin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้โดยไม่ขึ้นกับระดับน้ำตาล glucose ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (*P < 0.05)

วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

โดยสรุปจากการทดสอบประสิทธิภาพของยา albendazole, mebendazole, artesunate, chloroquine และ metformin ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี พบว่ายาทั้ง 5 ชนิด เมื่อใช้ในความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ และการใช้ยาความเข้มข้นต่ำสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า drug repurposing โดยการใช้ albendazole, mebendazole, artesunate, chloroquine และ metformin เพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดี มีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จในผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการศึกษายังจำเป็นต้องทำการทดลองในสัตว์ทดลองให้ชัดแจ้ง เพื่อให้เกิดความมั่นใจก่อนนำเข้าสู่การศึกษาในมนุษย์ (clinical trial) ต่อไป



รูปที่ 4-13 Metformin ยับยั้งการเจริญของ CCA cell lines ผ่านการกระตุ้น cell cycle arrest. (A) Hoechst staining แสดงให้เห็นการเกิด chromatin condensation (ลูกศรชี้) ในเซลล์ที่ได้รับยา 10-40 mM of metformin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 (100 μM) เป็น positive control (B) การแสดง ออกของ cyclin D1 and p21 โดยวิธี Western blot โดยใช้ β-actin เป็น internal control *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.



<u>รูปที่ 4-14</u> Metformin ยับยั้ง migration, invasion และกระตุ้น anoikis ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 and KKU-214 ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มี metformin (10 mM) เป็น 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบ migration และ invasion assays พบว่า จำนวนของเซลล์ที่สามารถ (a) migrate และ (b) invade ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (C) การแสดงออกของ vimentin, MMP-2 and MMP-7 ด้วยวิธี western blot ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับยา 10 mM metformin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยา (D) metformin เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เมื่อได้รับยา Metformin เพิ่มขึ้นตามขนาดของยา 10 หรือ 20 mM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

ผลงานที่เกิดขึ้นจากแผนงานวิจัยนี้

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 7 เรื่อง อยู่ในระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับ 2 เรื่อง

1.1 Sirinapa Sribenja, Nichapavee Natthasirikul, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Patcharee Jearanaikoon, Sopit Wongkham. Thymosin β10 as a predictive biomarker of response to 5-fluorouracil chemotherapy in cholangiocarcinoma. Annals of hepatology. 2016;15:577-85. (IF = 1.81)

1.2 Wunchana Seubwai, Kulthida Vaeteewoottacharn, Ratthaphol Kraiklang, Kazuo Umezawa, Seiji Okada, Sopit Wongkham. Inhibition of NF-KB Activity Enhances Sensitivity to Anticancer Drugs in Cholangiocarcinoma Cells. Oncology research. 2016; 23:21-8. (IF = 1.059)

1.3 Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Paweena Dana, Sawako Fujikawa, Kouki Matsuda, Koichi Ohkuma, Eriko Kudo, Ratthaphol Kraiklang, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham, Seiji Okada. Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma. Tumor Biology (In press, IF: 3.611)

1.4 Dana P, Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Matsuda K, Wongkham S and Okada S. Repurposing cimetidine for cholangiocarcinoma: Antitumor effect in vitro and in vivo. Oncology letters. 2017;13(3):1432-6. (IF = 1.482)

1.5 Obchoei S, Saeeng R, Wongkham C, Wongkham S. Novel Synthetic Mono-triazole Glycosides Induce G0/G1 Cell-cycle Arrest and Apoptosis in Cholangiocarcinoma Cells. Anticancer research. 2016;36(11):5965-73. (IF = 1.895)

1.6 Puthdee N, Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Boonmars T, Cha'on U, Phoomak C, Wongkham S. Berberine Induces Cell Cycle Arrest in Cholangiocarcinoma Cell Lines via Inhibition of NF-KB and STAT3 Pathways. Biological & pharmaceutical bulletin. 2017; 40(6):751-7. (IF = 1.574)

1.7 Saengboonmee C, Seubwai W, Cha'on U, Sawanyawisuth K, Wongkham S, Wongkham C. Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF-kB. Anticancer research. 2017;37(1):115-23. (IF = 1.895)

<u>อยู่ในระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับ</u> 2 เรื่อง

1.8 Guragain D, Araki N, Seubwai W, Silsirivanit A, Wongkham S, Kobayashi D, Okanishi H, Wongkham C, Prasongwattana V, Nawa Y, Sasao A, Sasao A, Cha`on U. A Proteomics study reveals chloroquine induces apoptosis and impairs formation of lysosomal related vesicles in cholangiocarcinoma. *Cancer Genomics and Proteomics*.

1.9 Guragain D, Cha`on U, Silsirivanit A, Kobayashi D, Okanishi H, Seubwai W, Wongkham C, Prasongwattana V, Nawa Y, Wongkham S, Araki N. Artesunate induces necrosis in cholangiocarcinoma via ROS formation. *Anti-Cancer Research*

2. ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและระดับนานาชาติรวม 5 เรื่อง โดยเป็นการนำเสนอ แบบ oral presentation จำนวน 2 เรื่อง และ poster presentation จำนวน 4 เรื่อง

2.1 การเสนอผลงานแบบ oral presentation

2.1.1 Diwagar Guragain, et. al. Repurposing anti-parasitic drugs as anti-metastatic agents for treatment of cholangiocarcinoma; 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology. 9-12 December, 2014. School of Life Science and School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad, India.

2.1.2 Ubon Cha-on. Upregulation of Lactate Dehydrogenase A is Correlated with Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma. The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559

2.2 การเสนอผลงานแบบ poster presentation

2.2.1 Charupong Saengboonmee, Wunchana Seubwai, Ubon Cha'on, Kanlayanee Sawanyawisuth, Sopit wongkham, Chaisiri wongkham. Anti-metastatic potential of metformin on cholangiocarcinoma cells; The Cholangiocarcinoma Foundation 2017 Annual Conference ในวันที่ 1-3 กุมภาพันธ์ 2560 ณ Salt Lake City, Utah, ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.2 Diwagar Guragain, et. al. The anti-metastasis activities of CQ on CCA cells. ; Research Link Workshop in Cholangiocarcinoma, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand (12 - 14 March 2014).

2.2.3 Diwagar Guragain, et. al. JHUPO 2015, Functional analysis of CQ toxicity; The 13th annual meeting of The Japanese Proteomics Society, Kumamoto, Japan (23-24 July, 2015).

2.2.4 Diwagar Guragain, et. al. ICAHO 2017, Anti-malarial drugs artesunate and chloroquine induce cell death by different mechanisms in bile duct cancer cell lines; 5th International Conferences on Advances on Haematology and Oncology, Coeur d`Alene, Idaho, USA (12-13 August, 2017)

3. บัณฑิตศึกษา

ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาเอก จำนวน 2 คน ได้แก่

- ดร. จารุพงษ์ แสงบุญมี บัณฑิตจากโครงการปริญญาพัฒนานักวิทยาศาสตร์ สวทช. ปัจจุบันศึกษา ต่อคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Mr. Diwagar Guragain สอบป้องกันวิทยานิพนธ์แล้ว เมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์เพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของบัณฑิตวิทยาลัย

4. **ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย**

อาจารย์รุ่นใหม่ในกลุ่ม ได้ยื่นเสนอผลงานเพื่อกำหนดตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ในระยะเวลาที่เสนอความก้าวหน้าจำนวน 2 คน และ คือ

3.1 ดร. อุบล ชาอ่อน

- ได้รับความเห็นชอบในการกำหนดตำแหน่ง ผศ. เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2558

— ได้รับรางวัลชมเชยนักวิจัยที่ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ รางวัล สพสท. ประจำปี 2559 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

— ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “Upregulation of Lactate Dehydrogenase A is Correlated with Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma” ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559

— ได้รับการแต่งตั้งเป็นเลขาธิการกลุ่มวิจัยโรคไต (CKD Net) มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อดำเนินการโครงการลดความเหลื่อมล้ำทางสังคม มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ. 2559 – พ.ศ. 2562)

— ได้รับคัดเลือกให้เข้าฝึกอบรม TRF-Newton Fund สกว. 2560

3.2 ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์

— ได้ยื่นขอกำหนดตำแหน่ง ผศ. เมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม 2559 รอผลพิจารณา

— ได้รับความเห็นชอบจากฝ่ายวิจัยคณะแพทยศาสตร์ เป็นหัวหน้ากลุ่มวิจัย กลุ่มวิจัยไกลโคไซเอนซ์และไกลโคเทคโนโลยี (Research group for Glycosciences and Glycotechnology) ประจำปี 2560

— เป็นตัวแทนนักวิจัยไทยใน Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology แทน ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ

ผลงานที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 22 เรื่อง อยู่ในระหว่าง review หรือเตรียมต้นฉบับ 3 เรื่อง

1. Charupong Saengboonmee, Wunchana Seubwai, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham. Diabetes mellitus: Possible risk and promoting factors of cholangiocarcinoma. Cancer Epidemiology 2015 Jun; 39(3):274-8. (IF = 2.558)
2. Sirorat Pattanapairoja, Atit Silsirivanit, Kanha Muisuk, Wunchana Seubwai, Ubon Cha'on, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Danaipong Chetchotsaka, Sopit Wongkham. Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach. Clin Biochem 2015 Jul; 48(10-11):668-73 (IF = 2.23).
3. Kanha Muisuk, Atit Silsirivanit, Kanokwan Imtawil, Suphawadee Boontot, Ake Pukhem, Chawalit Pairojkul, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. Whole mitochondrial genome sequencing revealed several new mitochondria mutations in cholangiocarcinoma with low frequencies. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16:1737-1742. (IF = 1.5)
4. Piyanard Boonnate, Sakda Waraasawapati, Wiphawi Hipkaeo, Supattra Pethlert, Amod Sharma, Carlo Selmi, Vitoon Prasongwattana, Ubon Cha'on. Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic β-Cell Mass in Adult Wistar Rats. PLoS One. 2015 Jun 29; 10(6):e0131595. (IF = 3.234)
5. Kanlayanee Sawanyawisuth, Nattawat Tantapotinan, Ratthaphol Kraiklang, Anucha Puapairoj, Chaisiri Wongkham, Gregory J Riggins, Sopit Wongkham. Suppression of trophoblast cell surface antigen 2 enhances proliferation and migration in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. (In press, Annal Hepatol, 2016;15(1):71-81. (IF = 2.065)
6. Charupong Saengboonmee, Wunchana Seubwai, Chawalit Pairojkul, Sopit Wongkham. High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells via STAT3 activation. (Under review, Scientific Report, 6: 18995, 2016. (IF = 5.578)
7. Sirinapa Sribenja, Nichapavee Natthasirikul, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Patcharee Jearanaikoon, Sopit Wongkham. Thymosin β10 as a predictive biomarker of response to 5-fluorouracil chemotherapy in cholangiocarcinoma. Annals of hepatology. 2016;15:577-85. (IF = 1.81)
8. Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Wunchana Seubwai, Chaisiri Wongkham, Atit Silsirivanit, Sopit Wongkham. Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kB. Science Report 2016, 6:27853. (IF = 5.228)
9. Wunchana Seubwai, Kulthida Vaeteewoottacharn, Ratthaphol Kraiklang, Kazuo Umezawa, Seiji Okada, Sopit Wongkham. Inhibition of NF-KB Activity Enhances Sensitivity to Anticancer Drugs in Cholangiocarcinoma Cells. Oncology research. 2016; 23:21-8. (IF = 1.059)
10. Kwanthida Uthaisar, Kulthida Vaeteewoottacharn, Wunchana Seubwai, Chutima Talabnin, Kanlayanee Sawanyawisuth, Sumalee Obchoei, Ratthapol. Kraiklang, Seiji Okada, Sopit

Wongkham. Establishment and characterization of a novel human cholangiocarcinoma cell line with high metastatic activity. Oncol Reports. 2016; 36:1435-1446. (IF = 2.486)

11. Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Paweena Dana, Sawako Fujikawa, Kouki Matsuda, Koichi Ohkuma, Eriko Kudo, Ratthaphol Kraiklang, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham, Seiji Okada. Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma. Tumor Biology. 2016; 37: 9023-9035. (IF: 3.611)
12. Paweena Dana, Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Sopit Wongkham, Seiji Okada. Repurposing cimetidine for cholangiocarcinoma: antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. Oncology Lett. 2016, 13:1432-36, 2017. (IF = 1.554)
13. Unchalee Thonsri, Wunchana Seubwai, Sakda Waraasawapati, Kanlayanee Sawanyawisuth, Kulthida Vaeteewoottacharn, Thidarat Boonmars, Ubon Cha'on. Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis. Histology Histopathology. 2017;32(5):503-10. (IF = 2.096)
14. Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Jurupong Saengboonmee, Wunchana Seubwai, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham. High glucose level boost the aggressiveness of high metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation. Science Report 2017, 7:43842. (IF = 5.228)
15. Dana P, Kariya R, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, Seubwai W, Matsuda K, et al. Upregulation of CD147 promotes metastasis of cholangiocarcinoma by modulating the epithelial-to-mesenchymal transitional process. Oncology research. 2017; 25(7):1047-59. (IF = 3.957)
16. Dana P, Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Matsuda K, Wongkham S and Okada S. Repurposing cimetidine for cholangiocarcinoma: Antitumor effect in vitro and in vivo. Oncology letters. 2017;13(3):1432-6. (IF = 1.482)
17. Obchoei S, Saeeng R, Wongkham C, Wongkham S. Novel Synthetic Mono-triazole Glycosides Induce G0/G1 Cell-cycle Arrest and Apoptosis in Cholangiocarcinoma Cells. Anticancer research. 2016;36(11):5965-73. (IF = 1.895)
18. Thamrongwaranggoon U, Seubwai W, Phoomak C, Sangkhamanon S, Cha'on U, Boonmars T, et al. Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma. Biochemical and biophysical research communications. 2017;484(2):409-15. (IF = 2.371)
19. Saengboonmee C, Seubwai W, Cha'on U, Sawanyawisuth K, Wongkham S, Wongkham C. Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF-kB. Anticancer research. 2017;37(1):115-23. (IF = 1.895)
20. Puthdee N, Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Boonmars T, Cha'on U, Phoomak C, Wongkham S. Berberine Induces Cell Cycle Arrest in Cholangiocarcinoma Cell Lines via Inhibition of NF-KB and STAT3 Pathways. Biological & pharmaceutical bulletin. 2017; 40(6):751-7. (IF = 1.574)
21. Waraporn Saentaweesuk, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Ratthaphol Kraiklang, Wunchana Seubwai, Chutima Talabnin, Sopit Wongkham,Norie Araki, Seiji Okada, Chaisiri

Wongkham. Activation of vimentin is critical to promote a metastatic potential of cholangiocarcinoma cells. Oncol Res. 2017 Jul 25. doi: 10.3727/096504017X15009778205068.

22. Waraporn Saentaweesuk, Atit Silsirivanit, Kulthida Vaeteewoottacharn, Somsiri Indramanee, Ubon Cha'on, Chawalit Pairojkul, Somchai Pinlaor, Thidarat Boonmars, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham. Clinical significance of GalNAcylated glycans in cholangiocarcinoma: Values for diagnosis and prognosis. Submitted to Clinica Chimica Acta (under revision; IF = 2.873).

<u>ผลงานวิจัยที่อยู่ในระหว่าง review หรือ เตรียมต้นฉบับ</u>

1. Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit, Kulthida Vaeteewoottacharn, Kanlayanee Sawanyawisuth, Chawalit Pairojkul, Calito Lebrilla, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham. O-GlcNAcylation regulates membranous high-mannose N-glycan via suppression of FOXO3a and MAN1A1 expression that related to metastasis of cholangiocarcinoma. Submitted to Oncogenes (under reviewed; IF = 6)
2. Somsiri Indramanee, Kanlayanee Sawanyawisuth,Atit Sisirivanit, Paweena Dana, Chatcahi Phoomak, Chaisiri Wongkham, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Sopit Wongkham. α1,2-Fucosylated glycans associates with poor survival of cholangiocarcinoma patients and contributes to tumor progression via Akt/Erk activation and epithelial mesenchymal transition. (will be submitted to Journal of Cancer Research and Clinical Oncology: IF = 3.141).
3. Marutpong Detartya, Sriwipa Chuangchaiya, Kanlayanee Sawanyawisuth, Lukkana Sukprasert, Sopit Wongkham, Chaisiri Wongkham, Atit Silsirivanit. Polypeptide GalNAc-transferase 5 regulates progression of cholangiocarcinoma via expression of Vicia villosa-binding glycans (will be submitted to Oncology Research; IF = 1.74)

2. การได้รับเชิญเป็นวิทยากรในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ ทั้งหมด 28 ครั้ง

1. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Pathology of Cholangiocarcinoma: From the basic researches toward the clinics ในการประชุมสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วทท) ครั้งที่ 40 "Science and Technology towards ASEAN Development" ระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิด ขอนแก่น จ. ขอนแก่น
2. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากร (keynote speaker) บรรยายเรื่อง Science and Future Medicine ในการประชุม The international conference on "Research for Social Devotion" in Commemoration of the 50th Anniversary of Khon Kaen University, วันที่ 22-23 มกราคม 2558 ณ อาคารพจน์ สารสิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากร ในการประชุมเสวนาแลกเปลี่ยนประสบการณ์ในการทำวิจัยร่วมกับต่างประเทศ จัดโดยฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 29 มกราคม 2558 เวลา 12.00 – 14.00 น. ณ ห้องประชุม 5314 ชั้น 3 อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยาย “Cholangiocarcinoma: one of the Thailand grand challenges” ในการประชุมวิชาการสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37. 29 พค. 2558 ณ โรงแรม สุนีย์แกรนด์ แอนด์ คอนแวนชั่น เซ็นเตอร์ จ.อุบลราชธานี

5. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยาย “Diabetes mellitus—a missing jigsaw of cholangiocarcinoma” in the International Congress of Liver Flukes and Cholangiocarcinoma:Towards Control and Elimination, 11-12 May 2015, Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand

6. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง การวิจัยเพื่อค้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีเพื่อการตรวจคัดกรอง วินิจฉัยและพยากรณ์โรค ในการประชุมการวิเคราะห์สถานภาพจากผลงานวิจัยเพื่อการควบคุม ป้องกัน พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี สภาวิจัยแห่งชาติ 5 มิถุนายน 2558 โรงแรม พูลแมน ขอนแก่น

7. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “มะเร็งท่อน้ำดี: ผลกระทบด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม” ในการประชุมวิชาการประจำปีสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย “Genetics & Genomics : from Molecular Studies to Applications” 15 ก.ค. 58.

8. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “High glucose condition enhances aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma”, the annual meeting of 13th JHUPO/Japanese Proteomics Society 2015, 22-24 July, 2015, Kumamoto shintoshin plaza, Japan.

9. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “Cholangiocarcinoma: a silent killer of the northeast Thailand”. Scientific workshop to explore e-Asia research collaboration. 13-14 Aug, 2015, Yangon, Myanmar.

10. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง“การเขียน research proposal อย่างไรให้ได้ทุน” และ “บทบาทและความสำคัญของพี่เลี้ยงนักวิจัย (Mentor)” 15 มิ.ย.58 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยานเรศวร พิษณุโลก

11. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็นวิทยากร ในการประชุม Thailand-Japan Student Science Fair 2015 “Seeding Innovations through Fostering Thailand-Japn Youth Friendship” วันที่ 22-24 ธันวาคม 2558 ณ Princess Chulabhorn Science High School จ.เพชรบุรี

12. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็น keynote speaker ในการประชุม The 6th International translational Cancer Research Conference—Prevention and treatment of cancer: Hypes and hopes. Feb 4-7, 2016, Hyatt Regency, Ahmedabad, Gujarat, India.

13. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ วิทยากรรับเชิญ บรรยายเรื่อง “การทำวิจัยอย่างไรให้ประสบความสำเร็จ” ในโครงการฝ่ายวิชาการ สกว. สัญจร ครั้งที่ 1 วันที่ 6 มิถุนายน 2559 วิทยาลัยการปกครองท้องถิ่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น

14. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ วิทยากรรับเชิญ บรรยายเรื่อง “คปก. ดีอย่างไร” ใน คปก. สัญจร ครั้งที่ 3 และ RGJ Seminar Series ครั้งที่ 116 วันที่ 9-10 สิงหาคม 2559 วิทยาลัยการปกครองท้องถิ่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น

15. ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ ได้รับเชิญเป็นวิทยากรรับเชิญ บรรยายเรื่อง “Targeted treatment in cholangiocarcinoma” ในการประชุมวิชาการ The 6th Medical Microbiology Conference 2016 วันที่ 12

พฤษภาคม 2559 ณ ห้องประชุม 1 ชั้น 4 อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

16. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็น Invited speaker เรื่อง Contribution of liver fluke infection and diabetes mellitus on cholangiocarcinoma in northeastern Thailand และ Multidisciplinary approaches for discovery cholangiocarcinoma biomarkers การประชุม 19th International conference on Emerging infectious Disease (EID) in the Pacific Rim. Seoul, Korea. 7-9 February, 2017.
17. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “Membranous High Mannose N-glycans Associate with Metastasis of Cholangiocarcinoma Cells” ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559
18. ผศ.ดร. อุบล ชาอ่อน ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “Upregulation of Lactate Dehydrogenase A is Correlated with Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma” ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559
19. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิรวิานชย์ ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “Expression of N-acetyl Galactosamine-associated Glycans Indicates Pathological Changes of Biliary Epithelia and Cholangiocarcinoma ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559
20. ดร. ฉัตรชัย ภู่มาก ได้รับเชิญเป็น invited speaker ในการประชุม The 8th Asian Community for Glycosciences and Glycotechnology เรื่อง “High Glucose Enhances Aggressiveness of Cholangiocarcinoma Cells” ณ Jiangnan University, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน 13-16 ตุลาคม 2559
21. ผศ.กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ เป็นวิทยากรในกิจกรรมสร้างแรงบันดาลใจให้แก่นักเรียน ชั้นมัธยมปลาย ในฐานะ STEM Ambassador ซึ่งจัดโดยบริติชเคาซิลและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ณ โรงเรียนชัยภูมิภักดีชุมพล จ.ชัยภูมิ
22. ผศ.กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “Protocol exchange” Derivation of cholangiocarcinoma cell lines via xenograft model” ในการประชุม “Minicourse on Next-generation models for precision oncology” ระหว่างวันที่ 20-22 กันยายน 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
23. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับเชิญเป็นวิทยากร (invited speaker) บรรยายเรื่อง Combination of advanced technologies in vitro and in vivo for toxicity testing ในการประชุมพิษวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 “Toxicology Development in ASEAN” ระหว่างวันที่ 10-11 กันยายน 2558 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กทม.
24. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับเชิญพูดสัมมนาเรื่อง High glucose levels potentiates the metastatic potential of highly metastatic cholangiocarcinoma cell via O-GlcNAcylation ในวันที่ 2 มิถุยายน 2560 ที่ Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University ประเทศญี่ปุ่น
25. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับเชิญเป็นวิทยากร (invited speaker) บรรยายเรื่อง Mouse model for cancer drug target validation ในการประชุม The 11th TALAS International Symposium

ระหว่างวันที่ 21-23 มิถุนายน 2560 ณ โรงแรมปทุมวันปริ๊นเซส กทม.

26. ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย ได้รับเชิญเป็นวิทยากร เรื่อง “ทำวิจัยอย่างไรจึงจะประสบความสำเร็จและวางแผนงานวิจัยอย่างไรจึงจะได้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ” งานปฐมนิเทศนักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2559 วันที่ 13 กรกฎาคม 2558 ณ ห้องประชุมคณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
27. ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยาย เรื่อง “Systems approach for biomedicine research III: current applications and prospective research work” การประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์สามสถาบัน พ.ศ.2558: จุฬาฯ-รามาฯ-ศิริราช (Joint Conference in Medical Sciences 2015) “Health Equity through Innovation and Collaboration” ระหว่างวันที่ 4 - 6 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
28. ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยาย เรื่อง “The impact of type 2 diabetes mellitus on progression of cholangiocarcinoma” โครงการบรรยายพิเศษ “System biology week” วันที่ 20 พฤศจิกายน 2558 ณ ห้องประชุมชั้น 4 ห้องสมุดคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

3. **การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ**

ได้มีการเสนอผลงานของอาจารย์และนักศึกษา เป็นการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติรวม 80 เรื่อง โดยเป็นการนำเสนอแบบ oral presentation จำนวน 25 เรื่อง และ poster presentation จำนวน 55 เรื่อง ดังนี้

Oral presentation

6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology. 9-12 December, 2014. School of Life Science and School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad, India.

1. Ubon Cha’on, *et. al*. Lactate dehydrogenase as a therapeutic target of cholangiocarcinoma
2. Sumalee Obchoei, *et. al*. Novel synthetic mono-triazole glycosides inhibit growth of cholangiocarcinoma cell lines through G1 cell cycle arrest
3. Chatchai Phoomak, *et. al*. Roles of O-GlcNacylation on the progression of cholangiocarcinoma
4. Diwagar Guragain, *et. al*. Repurposing anti-parasitic drugs as anti-metastatic agents for treatment of cholangiocarcinoma
5. Paweena Dana, *et. al*. Suppression of CD147 expression reduced metastatic activity of cholangiocarcinoma *in vitro* and *in vivo*
6. Somsiri Indramanee, *et. al*. Association of Lewis Y expression in progression of cholangiocarcinoma

การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 30 ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ณ ห้องบรรยาย 1-4

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 7-9 ตุลาคม 2557

7. Sumalee Obchoei, *et. al*. Secreted cyclophilin A mediates G1/S phase transition of cholangiocarcinoma cells via CD147/ERK1/2 pathway
8. Charupong Saengboonmee, *et. al*. Diabetogenic glucose enhance aggressive activities of cholangiocarcinoma cell lines. *(ได้รับรางวัลอันดับที่ 2 oral presentation)*

การประชุม Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for cancer research

9. Chatchai Phoomak, *et al*. Induction of O-GlcNAcylation by glucose is associated with metastasis of cholangiocarcinoma.
10. Wunchana Seubwai, *et al*. Identification of therapeutic targets for cholangiocarcinoma using DNA microarray database.
11. Charupong Saengboonmee, *et al*. Effect of high glucose condition and metformin—an anti-diabetic drug on aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma cells.
12. Kulthida Vaeteewoottacharn, *et al*. Roles of tumor releasing factors in CCA-microenvironment interaction and cancer progression.
13. Suchada Phimsen, *et al*. Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of cholangiocarcinoma

The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association "From collaboration to integration: Cancer researches for patients' benefit" 8-10 October 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

14. Unchalee Thonsri, *et al*. Pyruvate kinase M2: a potential therapeutic target of cholangiocarcinoma *(ได้รับ Travel award)*

The 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

15. Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Sawako Fujikawa, Sopit Wongkham, Seiji Okada, Inhibition of CD47; "don't eat me", signaling attenuates cholangiocarcinoma growth and metastasis. *(ได้รับรางวัล Good oral presentation)*

Frontier for Cancer Research II "Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications" ในวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

16. Kanlayanee Sawanyawisuth, *et al*. Fucosyltransferase-1 promotes cholangiocarcinoma progression
17. Wunchana Seubwai, *et al*. Transcriptome analysis for identification of genes related to cholangiocarcinoma progression under hyperglycemic condition
18. Suchada Phimsen, *et al.* Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of

cholangiocarcinoma

19. Chatchai Phoomak, *et. al*. High mannose type N-glycan associates with O-GlcNAcylation and progression of cholangiocarcinoma cells
20. Paweena Dana, *et. al*. Cholangiocarcinoma products-treated fibroblast potentiates tumor growth; a promising target for CCA treatment

The 12th Mahasarakham University Research Conference (MRC#XII) ระหว่างวันที่ 8-9 กันยายน 2559 ณ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

21. Ubonrat Thamrongwarnaggoon, *et al*. Anti-cancer activity of glucose transporter 1, phloretin in cholangiocarcinoma cells *(ได้รับรางวัลการนำเสนอภาคบรรยายดีเด่น สายวิทยาศาสตร์สุขภาพ)*
22. Unchalee Thonsri, *et al*. Upregulation of pyruvate kinase M2 in cholangiocarcinoma. (*ได้รับรางวัลการนำเสนอภาคบรรยายดีเด่น สายวิทยาศาสตร์สุขภาพ)*

การประชุมวิชาการ โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (RGJ - Ph.D. Congress) ครั้งที่ 18 ระหว่างวันที่ 8-10 มิถุนายน 2560 ณ โรงแรมริชมอนด์ สไตลิช คอนเวนชั่น จังหวัดนนทบุรี

23. Marutpong Detarya, *et. al*. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 regulates GalNAc-associated glycans expression and facilitates growth and metastasis of cholangiocarcinoma. (*ได้รับรางวัล outstanding oral presentation*)

Frontier for Cancer Research III "Translational Research: From Bench to Patients" ในวันที่ 31 กรกฎาคม 2560 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

24. Kulthida Vaeteewoottacharn, *et. al*. Roles of CCA-cancer microenvironment interaction on cancer progression and metastasis
25. Kanlayanee Sawanyawisuth, *et al*. Targeting the glycosylation in Cholangiocarcinoma

Poster presentation

Pre-congress symposium: clinical research based on CASCAP tools ณ ห้องบรรยาย 3-4 อาคารเตรียมวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในวันที่ 6 ต.ค. 2557

1. Kulthida Vaeteewoottacharn, *et. al.* Inhibition of carbonic anhydrase enhances anti-VEGF, bevacizumab, therapy in CCA in vivo
2. Ubonrat Thamronwaranggoon, *et. al*. Increasing of glucose transporter-1 (GLUT1) related with early carcinogenesis and poor survival outcome of cholangiocarcinoma patients. (*ได้รับรางวัลอันดับผู้นำเสนอผลงานวิจัยดีเด่นแบบโปสเตอร์)*
3. Waraporn Saentaweesuk, *et. al.* Anoikis resistance-associated proteins in a high metastatic cholangiocarcinoma cell line demonstrated by label-free proteomic analysis
4. Ubonrat Thamronwaranggoon, *et. al*. Increasing of glucose transporter-1 (GLUT1) related with early carcinogenesis and poor survival outcome of cholangiocarcinoma patients.

5. Waraporn Saentaweesuk, *et. al.* Anoikis resistance-associated proteins in a high metastatic cholangiocarcinoma cell line demonstrated by label-free proteomic analysis
6. Unchalee Thonsri, *et. al.* Overexpression of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase in human cholangiocarcinoma tissues

การประชุมสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วทท) ครั้งที่ 40 “Science and Technology towards ASEAN Development” ระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมโซฟิเทลราชาออกคิด จ. ขอนแก่น

7. Charupong Saengboonmee, *et. al*. High glucose promotes aggression of cholangiocarcinoma cell lines and the possibility of using metformin, an antidiabetic drug for treatment.
8. Paweena Dana, *et. al*. Silencing of CD147 by RNA interference suppressed tumor cell invasion and metastatic potential of cholangiocarcinoma, in vitro and in vivo.
9. Chatchai Phoomak, *et. al*. Elevation of global o-GlcNAcylated proteins associated with cholangiocarcinoma metastasis

การประชุมวิชาการ International conference on Research and Social Devotion in commemoration of 50th anniversary of Khon Kaen University, Thailand (มหาวิทยาลัยขอนแก่นครบรอบ 50 ปี) ระหว่างวันที่ 22-23 มกราคม 2558 ณ อาคารพจน์ สารสิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

10. Paweena Dana, *et. al*. CD147 promotes tumor cell invasion and metastasis of cholangiocarcinoma
11. Chatchai Phoomak, *et. al*. Up-regulation of O-GlcNAcylation modulated cholangiocarcinoma metastasis
12. Waraporn Saentaweesuk, *et. al.* Establishment and characterization and proteomic analysis of a highly metastasis

The 13th Annual Meeting of The Japanese Proteomics Society (JHUPO2015), 23-24 July 2015, Kumamoto Shintoshin Plaza, Kumamoto, JAPAN. จำนวน 4 เรื่อง

13. Charupong Saengboonmee, *et al.* High glucose condition enhances aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma.
14. Waraporn Saentaweesuk, *et al.* Differential proteomic profile of a high metastatic cholangiocarcinoma cell line; KKU-M214L5 and its parental; KKU-M214 revealed by a label-free proteomic analysis.
15. Diwakar Guragain, *et al.* Functional analysis of chloroquine toxicity.
16. Atit Silsirivanit, *et al.* Cancer stem cells up-regulate O-GlcNAcylation systems to maintain their stemness.

The 40th ANNUAL CONFERENCE OF THE MALAYSIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 10 -11 June 2015, Putrajaya Marriott Hotel, Malaysia.

17. Somsiri Indramanee, *et al*. High expression of fucosylated glycoconjugates in tumor tissues related to poor prognosis of cholangiocarcinoma patients.

The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association "From collaboration to integration: Cancer researches for patients' benefit" 8-10 October 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

18. Kulthida Vaeteewoottacharn, *et al*. High glucose enhances O-GlcNAcylation and metastatic potentials in the high metastatic CCA cell lines. *(ได้รับ Travel award)*
19. Waraporn Saentaweesuk, *et al*. Altered expressions of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in KKU-214L5; a lung metastatic cholangiocarcinoma cell line.
20. Ubonrat Thamronwaranggoon, *et al*. The overexpression of glucose transporter 1 (GLUT1) in cholangiocarcinoma patients related with early carcinogenesis and poor prognosis. *(ได้รับ Travel award)*
21. Kanlayanee Sawanyawisuth, *et al*. Annexin A1 promotes cholangiocarcinoma aggression. *(ได้รับ Travel award)*
22. Sirinapa Sribenja, *et al*. 5-fluorouracil treatment induced Tβ10 and ABC transporters expression in cholangiocarcinoma cells.
23. Paweena Dana, *et al*. Cimetidine inhibits growth of cholangiocarcinoma cells by induction of G0/G1 arrest and apoptosis
24. Wunchana Seubwai, *et al*. High glucose level promotes progression in human cholangiocarcinoma via the induction of STAT3 pathway. *(ได้รับ Travel award)*
25. Ubon Cha'on, *et al*. Lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma.

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี วันที่ 6-8 มกราคม 2559

26. Wunchana Seubwai, *et al*. Aberrant expression of tumor specific glycolytic enzymes in cholangiocarcinoma: a potential novel therapeutic target.

Keystone Symposia-Cytokine JAK-STAT Signaling in Immunity and Diseases, Sheraton Steamboat Resort, Steamboat Springs, CO, USA. 10-14 January 2016

27. Charupong Saengboonmee, , *et al*. STAT3 is a promising therapeutic target for cholangiocarcinoma with hyperglycemia.

The 5th International Biochemistry and Molecular Biology conference ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช โฮเทล แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดสงขลา

28. Chatchai Phoomak, *et al*. High glucose boosts the metastatic ability of high metastasis cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation. *(ได้รับรางวัล Outstanding poster presentation)*
29. Piyanard Boonnate, *et al*. Berberine treatment inhibits phenotype progression in Cholangiocarcinoma cells. *(ได้รับรางวัล Good poster presentation)*
30. Marutpong Detarya, *et al*. Expression of GalNAc-containing glycoconjuates and GalNAc-transferases in cholangiocarcinoma. (*ได้รับรางวัล Good poster presentation)*
31. Ubonrat Thamrongwarnaggoon, *et al*. Inhibition of glucose trasporter 1 suppresses growth, metastasis and induces apoptosis of cholangiocarcinoma cell lines. *(ได้รับรางวัล Good poster presentation)*
32. Paweena Dana, *et al*. Inhibition of CD147 Expression Suppressed the Metastatic Activity of Cholangiocarcinoma.
33. Unchalee Thonsri, *et al*. Overexpression of pyruvate kinase M2 and lactate dehydrogenase A: a potential therapeutic target of cholangiocarcinoma.
34. Thirayut Sombun, *et al*. Role of Anterior gradient 2 (AGR2) in metastatic cholangiocarcinoma. Role of Anterior gradient 2 (AGR2) in metastatic cholangiocarcinoma

The Cholangiocarcinoma Foundation 2017 Annual Conference ในวันที่ 1-3 กุมภาพันธ์ 2560 ณ Salt Lake City, Utah, ประเทศสหรัฐอเมริกา

35. Paweena Dana, *et al*. EMMPRIN expression associated with metastatic activity of cholangiocarcinoma.
36. Paweena Dana, *et al*. Cimetidine inhibited growth of cholangiocarcinoma cells by induction of apoptosis.
37. Chatchai Phoomak, *et al*. High glucose augments the metastatic ability of highly metastasis cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation.
38. Charupong Saengboonmee, *et al*. Anti-metastatic potential of metformin on cholangiocarcinoma cells

The 5th Asia Pacific Protein Association Conference and the 12th International Symposium of the Protein Society of Thailand ระหว่างวันที่ 11-14 กรกฎาคม 2560 ณ The Tide Resort บางแสน จ.ชลบุรี

39. Waraporn Saentaweesuk, *et. al.* Glioma pathogenesis-related protein 1 might associated with metastasis in cholangiocarcinoma cells
40. Teerayut Sombun, *et. al*. Anterior gradient 2 (AGR2) expression promotes metastasis of cholangiocarcinoma
41. Jeeranun Jantra J, *et. al*. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) promotes the

progression of human cholangiocarcinoma

การประชุมวิชาการ 25 ปี “ชีวเคมีทางการแพทย์” สู่“ชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล” วันที่ 1 สิงหาคม 2560 ณ ห้องบรรยาย 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

42. Somsiri Indramanee, *et. al*. Alpha-1, 2-fucosylated glycan promotes progression of cholangiocarcinoma via activation of Akt and Erk.
43. Marutpong Detarya, *et. al*. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 regulates GalNAc-associated glycans expression and promotes metastasis of cholangiocarcinoma via activation of pAKT and pERK signaling pathway. (*ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยระดับดีเด่น แบบโปสเตอร์ ระดับปริญญาเอก*)
44. Waraporn Saentaweesuk, *et. al*. Metastasis-associated SJA-GalNAcylated glycan and protein profile in cholangiocarcinoma.

The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ระหว่างวันที่ 28-30 กันยายน 2560 ณ เมืองโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น

45. Kulthida Vaeteewoottacharn, *et. al.* Blocking of CD47 promotes MDM-mediated phagocytosis and suppresses the growth and metastasis of cholangiocarcinoma *(ได้รับ travel fellowship)*
46. Paweena Dana, *et. al.* Deletion of CD147 gene inhibited ability of cholangiocarcinoma cells by regulating monocarboxylate transporter *(ได้รับ travel fellowship)*
47. Waraporn Saentaweesuk, *et. al*. Heterogeneity of E-cadherin and vimentin expressing cells is essential for highly metastatic cholangiocarcinoma cells. (*ได้รับทุนสนับสนุนการเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์ สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น*)
48. Phattarin Pothipan, *et. al*. High CD47 expression correlates with a shorter survival and lymph node metastasis of cholangiocarcinoma subgroup (*ได้รับทุนสนับสนุนการเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์ สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น*)
49. Kanlayanee Sawanyawisuth, *et. al*. GalNAcylated glycans specific to Sophora japonica agglutinin: Values for diagnosis and prognosis of cholangiocarcinoma. *(ได้รับ travel fellowship)*
50. Chatchai Phoomak, *et. al*. O-GlcNAcylation promotes metastasis of cholangiocarcinoma cells via suppression of FOXO3 expression. *(ได้รับ travel fellowship)*
51. Somsiri Indramanee, *et. al*. Alpha-1, 2-fucosylated glycan promotes progression of cholangiocarcinoma via activation of Akt and Erk. *(ได้รับ travel fellowship)*
52. Marutpong Detarya, *et. al*. Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 regulates growth and metastasis of cholangiocarcinoma. *(ได้รับ travel fellowship)*

5th International Conferences on Advances on Haematology and Oncology, Coeur d`Alene, Idaho, USA (12-13 August, 2017)

53. Diwagar Guragain, *et. al.* Anti-malarial drugs artesunate and chloroquine induce cell death by different mechanisms in bile duct cancer cell lines.

24th International Symposium on Glycoconjugates ระหว่างวันที่ 27 สิงหาคม -1 กันยายน 2560 ณ ICC Jeju, Jeju Island, ประเทศเกาหลีใต้

54. Silsirivanit A, Saentaweesuk W, Wongkham C, Wongkham S., Serum GalNAc-associated glycan as a biomarker for diagnosis and prognosis of cholangiocarcinoma.
55. Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit, Dayoung Park, Kanlayanee Sawanyawisuth, Kulthida Vaeteewoottacharn, Chaisiri Wongkham, Carlito B. Lebrilla, Sopit Wongkham. Elevation of O-GlcNAcylation enhances progression of cholangiocarcinoma cells (*ได้รับรางวัล Poster award จาก International Glycoconjugate Organization, IGO*)

4. การได้รับรางวัล (ไม่นับรวมรางวัลการเสนอผลงาน) จำนวน 12 รางวัล

1. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับรางวัลอาจารย์ดีเด่นแห่งชาติ ประจำปี 2557 สาขาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี จากที่ประชุมสภาอาจารย์มหาวิทยาลัยแห่งประเทศไทย
2. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้คัดเลือกเป็นศิษย์เก่าที่ประสบความสำเร็จในชีวิต ในโอกาสครบรอบ 115 ปี โรงเรียนสตรีวิทยา
3. ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ได้รับโล่เชิดชูเกียรตินักวิจัยระดับเพชร ประจำปี 2557 จากหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. รศ. ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ ได้รับโล่เชิดชูเกียรตินักวิจัยระดับเพชร ประจำปี 2557 จาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5. ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ ได้รับโล่นักวิจัยที่มีผลงานด้านการวิจัย ระดับดีเยี่ยม สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ประจำปี พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. ดร. วันชนะ สืบไวย ได้รับรางวัลนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีผลงานวิจัยระดับดีเยี่ยม ประจำปี 2557 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
7. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับรางวัลไบโอลาสโก้ ประเทศไทย สำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ดีเด่นที่ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2557 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
8. ผศ.ดร. อุบล ชาอ่อน ได้รับรางวัลชมเชยนักวิจัยที่ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ รางวัล สพสท. ประจำปี 2559 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
9. นายจารุพงศ์ แสงบุญมี นักศึกษาระดับปริญญาเอก ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ “ดีเด่น” ระดับปริญญาเอก กลุ่มวิทยาศาตร์สุขภาพ ประจำปีการศึกษา 2559 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศ. โสพิศ วงศ์คำ และ ผศ. วันชนะ สืบไวย เป็นประธานที่ปรึกษาและที่ปรึกษาวิทยาร่วม
10. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับพระราชทานทุนส่งเสริมบัณฑิต จากมูลนิธิอานันทมหิดล ระหว่างตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2562 รวมระยะเวลา 3 ปี
11. ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับรางวัลอาจารย์ที่เป็นแบบอย่างชั้นปรีคลินิก จากกองทุนครูตัวอย่าง คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อวันที่ 31 สิงหาคม 2560

12. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้รับรางวัล ผลงานวิจัยดีเด่น ประเภท Biomedical Research กลุ่มอายุไม่เกิน 40 ปี เรื่อง Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kappa B. Scientific Reports 2016; 6: 27853.

5. ความก้าวหน้าและพัฒนาการของอาจารย์ในโครงการ

1. ดร. อุบล ชาอ่อน ได้เลื่อนตำแหน่งทางวิชาการเป็น ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2558
2. ดร. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้เลื่อนตำแหน่งทางวิชาการเป็น ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เมื่อ 18 พฤศจิกายน 2558
3. ดร. วันชนะ สืบไวย ได้เลื่อนตำแหน่งทางวิชาการเป็น ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เมื่อ 31 สิงหาคม 2558
4. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้ยื่นขอกำหนดตำแหน่งวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม 2559 รอผลพิจารณา
5. ดร. สุชาดา พิมเสน อยู่ในระหว่างรวบรวมผลงานเพื่อขอกำหนดตำแหน่งวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
6. ผศ.ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้ฝึกอบรมการจัดทำ CRISP/CAS 9 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะ ณ Kumamoto University เมือง Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 14-18 กรกฎาคม 2559
7. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้รับความเห็นชอบให้เป็นหัวหน้ากลุ่มในการจัดตั้งกลุ่มวิจัยเฉพาะทางด้าน Glycobiology and Glycotechnology in Medicine คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
8. ผศ. ดร. อุบล ชาอ่อน ได้รับการแต่งตั้งเป็นเลขาธิการกลุ่มวิจัยโรคไต (CKD Net)มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อดำเนินการโครงการลดความเหลื่อมล้ำทางสังคม มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระยะเวลา 3 ปี
9. ผศ.ดร. วันชนะ สืบไวย ได้รับการแต่งตั้งเชิญเป็นรองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพลุ่มน้ำโขง มหาวิทยาลัยขอนแก่น
10. ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้เป็นตัวแทนนักวิจัยไทยใน Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology แทน ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ
11. ผศ. ดร. อุบล ชาอ่อน ได้รับคัดเลือกให้เข้าฝึกอบรม the Newton Fund Professional Development Programme for Mid-Career Researchers สกว. 2560
12. ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ ได้รับคัดเลือกเพื่อเข้าฝึกอบรม the Newton Fund Professional Development Programme for Mid-Career Researchers ระหว่างวันที่ 16-18 มีนาคม 2558 (ในประเทศไทย) และระหว่างวันที่ 23-27 มีนาคม 2558 (ณ ประเทศอังกฤษ) โดยได้รับทุนจากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย ประเทศไทย และ The British Council ประเทศอังกฤษ
13. ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย และ ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้เจรจางานวิจัยและประสานความร่วมมือกับนักวิจัย AIST, Tsukuba และนักวิจัย Kumamoto University ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 19-21 มีนาคม 2560

6. บัณฑิตศึกษา

โครงการนี้มีส่วนร่วมในการผลิตบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโทและเอก ดังนี้

ระดับปริญญาโท จำนวน 7 คน ได้แก่

- นางสาวอัญชลี ต้นศรี สาขาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบัน ศึกษาต่อปริญญาเอกในสาขาเดียวกัน
- นางสาวอุบลรัตน์ ธำรงวรางกูร สาขาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบัน ศึกษาต่อปริญญาเอกในสาขาเดียวกัน
- นางสาวภัทรินทร์ โพธิพันธุ์ นักศึกษาปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภายใต้การดูแลของ ผศ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์)
- นางสาวภัคสิรี สรณารักษ์ นักศึกษาปริญญาโท ชั้นปีที่ 2 หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภายใต้การดูแลของ ผศ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์)
- นางสาวจีรนันท์ จันทรา นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 หลักสูตรชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภายใต้การดูแลของ อ.ดร.สุชาดา พิมเสน)
- นายธีระยุทธ สมบุญ นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 หลักสูตรชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภายใต้การดูแลของ อ.ดร.สุชาดา พิมเสน)
- นายสัจจพจน์ มั่นประสงค์ นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 2 หลักสูตรชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภายใต้การดูแลของ อ.ดร.สุชาดา พิมเสน)

ระดับปริญญาเอก จำนวน 8 คน ได้แก่

- ดร. จารุพงษ์ แสงบุญมี บัณฑิตจากโครงการปริญญาพัฒนานักวิทยาศาสตร์ สวทช. ปัจจุบันศึกษา ต่อคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ดร. ปวีณา ดานะ บัณฑิตจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเศก (คปก.) สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เมื่อ 5 มิถุนายน 2559 และได้รับอนุมัติจบจากสภามหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อ 28 มีนาคม 2560 ปัจจุบันทำงานในตำแหน่ง Postdoc ในห้องปฏิบัติการของ ศ. โสพิศ วงศ์คำ
- ดร. ฉัตรชัย ภู่มาก บัณฑิตจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเศก (คปก.) สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เมื่อ 16 พฤษภาคม 2559 และได้รับอนุมัติจบจากสภามหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อ 27 มิถุนายน 2560 ปัจจุบันทำงานในตำแหน่ง Postdoc ในห้องปฏิบัติการของ ศ. โสพิศ วงศ์คำ ทุนส่งเสริมนักวิจัยหลังปริญญาเอก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Mr. Diwagar Guragain สอบป้องกันวิทยานิพนธ์แล้ว เมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์เพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของบัณฑิตวิทยาลัย

- นางสาววรพร แสนทวีสุข ซึ่งได้สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ไปแล้ว เมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์อีกฉบับเพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเศก (คปก.)
- นางสาวสมศิริ อินทรมณี สอบป้องกันวิทยานิพนธ์แล้ว เมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม 2560 และอยู่ระหว่างการเตรียมผลงานตีพิมพ์เพื่อให้ครบตามข้อกำหนดของบัณฑิตวิทยาลัย
- นางสาวปิยะนาฏ บุญเนตร นักศึกษาปริญญาเอก ชั้นปีที่ 2 หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

7. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ได้จัดประชุมวิชาการประจำปีตามภารกิจทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. Frontier for Cancer Research 3 ครั้ง ซึ่งนอกจากนำเสนอผลงานความก้าวหน้าของโครงการแล้ว ในแต่ละครั้งได้เชิญผู้เชี่ยวชาญในแต่ละเรื่องมาร่วมบรรยายและจัด workshop เพื่อถ่ายทอดประสพการณ์และความชำนาญให้กับผู้เข้าร่วมประชุม

- Frontier for Cancer Research Research I: Systems Biology for cancer research ในวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Frontier for Cancer Research II. Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications ในวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Frontier for Cancer Research III. Translational Research: From Bench to Patients” วันจันทร์ที่ 31 กรกฎาคม 2560 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

8. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆทั้งในและต่างประเทศ

<u>การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นในประเทศ</u>

- กลุ่มผู้วิจัยได้เชิญ ดร. สมพลนาท สัมปัตตะวนิช จากภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อหารือเรื่องความร่วมมือและแลกเปลี่ยนความก้าวหน้าเรื่อง System Biology ในวันที่ 26 พฤศจิกายน 2557 ณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้ให้สัมมนาแก่ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี เรื่อง "Siriraj Initiative in Systems Pharmacology - Integrated solutions for therapeutic discovery" ในเวลา 11.30-14.00 น. ณ ห้องประชุม 5314 ชั้น 3 อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นด้วย
- การประชุมความร่วมมือด้านการวิจัยระหว่างกลุ่มวิจัย เมธีวิจัยอาวุโส สกว. กับ ดร.สิวนนท์ จิรวัฒโนทัย และ ดร. สมพลนาท สัมปัตตะวนิช กลุ่มวิจัยศูนย์เภสัชวิทยาเชิงระบบศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราช กทม. ในวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2560
- ความร่วมมือด้านการวิจัยกับ ผศ. ดร. ภัทรวดี ศรีคูน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เรื่องผลของสารสกัดสมุนไพรและผึ้งชันรงค์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี
- ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้ประสานความร่วมมือกับนักวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล โดย ดร. ศิวนนท์ จิรวัฒโนทัยและคณะ เพื่อศึกษาเรื่อง

“การศึกษากลไกการควบคุมเซลล์มะเร็งเพื่อระบุชนิดโปรตีนสู่การพยากรณ์การตอบสนองของมะเร็งท่อน้ำดีต่อยาต้านมะเร็งชนิดมุ่งเป้า” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภท ทุนวิจัยแข่งขัน ประจำปีงบประมาณ 2558 จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

— ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ และ ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย ได้ให้ร่วมมือเป็นผู้ร่วมวิจัยกับ ศ. ดร. ศราวุฒิ จิตรภักดี ในโครงการ "การศึกษาการใช้เอ็นไซม์กลุ่มไบโอตินคาร์บอกซิเลซเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคมะเร็ง (Biotin-dependent carboxylases and holocarboxylase synthetase as anti-cancer target)" ในเครือข่ายวิจัยเมตาบอลิซึมโรคมะเร็งและการหาเป้าหมายในการบำบัด (Cancer metabolism and drug discovery) งบประมาณ 10 ล้านบาท

<u>การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นในต่างประเทศ</u>

1. ความร่วมมือด้านการวิจัยภายใต้โครงการ Development of an innovative diagnostic system against liver fluke infection in Southeast Asian countries (ทุน e-Asia) โดยมี Prof. Hisashi Narimatsu, Glycoscience and Glycotechnology Research Group, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายญี่ปุ่นและ ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายไทย ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

— ภายใต้ความร่วมมือนี้ทำให้คณะผู้วิจัยมีโอกาสศึกษาเปรียบเทียบ tumor marker ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชาวญี่ปุ่น ไทยและลาว โดยบริษัท Sysmex ประเทศญี่ปุ่น ได้เอื้อเฟื้อเครื่องตรวจวิเคราะห์ พร้อมน้ำยาให้กับโครงการโดยไม่มีค่าใช้จ่าย

— ภายใต้ความร่วมมือนี้ทำให้ นส. พัชราภรณ์ บุตตะนันท์ ได้รับทุน Monbukagakusho: MEXT 2017 เพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ Tsukuba University โดยมี Prof. Hisashi Narimatsu และ Assoc. Prof. Kiyohiko Angata เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

— ภายใต้ความร่วมมือนี้ ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ พร้อมด้วย ผศ. ดร. วันชนะ สืบไวย และ ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้รับการฝึกอบรมการทำ Immunoglobulin class switching ที่ AIST, Tsukuba, Japan เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ระหว่างวันที่ 11-25 มีนาคม 2560)

2. ความร่วมมือระหว่างโครงการกับ Prof. Seiji Okada, Kumamoto University, Japan

— ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้รับเชิญจาก Prof. Seiji Okada, Kumamoto University, Japan เพื่อไปขยายเครือข่ายการวิจัยระหว่าง 2 สถาบันในระหว่างวันที่ 1-12 มกราคม 2558 ณ. Center for AIDS research, Kumamoto University, Japan

— ศ. โสพิศ วงศ์คำ ได้เชิญ Prof. Seiji Okada, Kumamoto University, Japan มาเยี่ยมคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 20-23 พฤษภาคม 2558 เพื่อปรึกษาเรื่องการขยายเครือข่ายการวิจัยระหว่าง 2 สถาบันและเตรียมความพร้อมเพื่อขอทุน NRCT-JSPS จากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ นอกจากนี้ยังได้เจรจาขยายกรอบความร่วมมือกับ Kumamoto University ในด้านบัณฑิตศึกษาด้วย ผลการเจรจาทำให้เกิดความร่วมมือกันในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาเอก 2 ปริญญา (Double Degree Program) ระหว่างสาขาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและ Medical Science Program, Kumamoto University ซึ่งเริ่มรับนักศึกษาในปีการศึกษา 2560

— ดร. สุชาดา พิมเสน ได้รับเชิญจาก Prof. Seiji Okada, Center for AIDS Research, Kumamoto University เมือง Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น ในการทำวิจัยระยะสั้น ตำแหน่ง Guest Scholar Visiting Research Fellow เป็นระยะเวลา 4 เดือน ตั้งแต่ 1 สิงหาคม 2558 ถึง 30 พฤศจิกายน 2558

— ผศ.ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ได้ฝึกอบรมเรื่อง The generation of specific gene knockout CCA cells using CRISPR/Cas9 technology ที่ Kumamoto University CRISP/CAS 9 ณ Kumamoto University เมือง Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น โดยมี Prof. Seiji Okada เป็นที่ปรึกษา ระหว่างวันที่ 14-18 กรกฎาคม 2559 และ 3-7 มกราคม 2560

3. ความร่วมมือระหว่างโครงการกับนักวิจัยต่างชาติอื่น

— กลุ่มผู้วิจัยได้เชิญ Prof. Eric Lam จาก Department of Surgery and Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK เพื่อร่วมหารือและเตรียมความพร้อมเพื่อขอทุนสนับสนุนจาก TRF-Newton Fund ในระหว่างวันที่ 30 พฤศจิกายน – 1 ธันวาคม 2557

— คณะผู้วิจัยในโครงการได้ร่วมมือกับ Prof. Eric Lam, Imperial College London โดยมี รศ. นพ. ชวลิต ไพโรจน์กุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายไทย ในการเสนอโครงการวิจัยเรื่อง Targeting the FOXM1 signature for early diagnosis and treatment in cholangiocarcinoma ทุน Newton-TRF

— กลุ่มผู้วิจัยได้ติดต่อและเชิญ Marie-Claude Gingras Human Genome Sequencing Center, Department of Molecular and Human Genetics Baylor College of Medicine, Texas, USA เป็น collaborator ด้าน RNAseq และการวิเคราะห์ โดยได้เชิญเป็นวิทยากรในการประชุมวิชาการที่จัดในเดือนพฤษภาคม 2558

9. การได้รับทุนอื่น ๆ จากทั้งในและต่างประเทศ

— ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2557 เรื่อง บทบาทของระดับกลูโคสต่อ O-GlcNAcylation ของโปรตีนและการดำเนินของโรคมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ จำนวน 335,000 บาท

— ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2557 เรื่อง บทบาทของ glycosylated CD147 ต่อการดำเนินโรคของมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ จำนวน 335,000 บาท

— ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2557 เรื่อง บทบาทของ antiphagocytic signal; CD47 ในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ จำนวน 120,000 บาท

— ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปี 2557 เรื่อง บทบาทของ Tumor specific glycolytic enzymes ต่อการลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ ดร. วันชนะ สืบไวย จำนวน 240,000 บาท

— ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2558 เรื่อง แบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับความสามารถในการลุกลาม หัวหน้าโครงการ ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ จำนวน 330,000 บาท

— ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2558 เรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่าง thymosin beta-10 และการดื้อยาของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ จำนวน 320,000 บาท

— ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2558 เรื่องบทบาทของ Annexin A1 ในการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ จำนวน 320,000 บาท

— ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2558 เรื่องบทบาทของ CD147 ในสารคัดหลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีต่อปฏิสัมพันธ์ของเซลล์มะเร็งและเซลล์แวดล้อมมะเร็งและการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดี หัวหน้าโครงการ ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ จำนวน 320,000 บาท

— ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2559-2561 ระยะเวลา 3 ปี เรื่อง บทบาทของมะเร็งท่อน้ำดีในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันต่อการดำเนินโรคเพื่อเป็นเป้าหมายในการรักษา จำนวน 750,000 บาท หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ได้รับ

— ทุน Sagawa Scientific Research Grant จาก the Japan Science Society ระหว่าง 2558-2559 เรื่อง Functional analysis of tumor associated macrophage using human monocyte transplanted mice and therapeutic application หัวหน้าโครงการ Dr. Ryusho Kariya และ Professor Seiji Okada ผศ. ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ เป็นผู้ร่วมวิจัย จำนวนประมาณ 300,000 บาท

— ดร. สุชาดา พิมเสน ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ในการทำวิจัยระยะสั้น ณ Center for AIDS Research, Kumamoto University เมือง Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 246,630 บาท

— ดร. สุชาดา พิมเสน ได้รับทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558 ระยะเวลา 2 ปี (TRG5880055) จำนวน 600,000 บาท เรื่องบทบาทของ Anterior gradient-2 (AGR2) ต่อการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี

— ดร. สุชาดา พิมเสน ได้รับทุนสนับสนุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2560 ระยะเวลา 1 ปี (R2560C040) จำนวน 220,000 บาท เรื่อง บทบาทของ secretory leukocyte protease inhibitor ต่อกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี

— ดร. สุชาดา พิมเสน ได้รับทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2558 จากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จำนวน 600,000 บาท งานวิจัยชื่อเรื่อง "บทบาทของ Anterior gradient-2 (AGR2) ต่อการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี”

— ดร. สุชาดา พิมเสน ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 246,630 บาท ในการทำวิจัยระยะสั้น ณ Center for AIDS Research, Kumamoto University เมือง Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น

— คณะผู้วิจัยในโครงการได้ร่วมมือกับ Prof. Eric Lam, Imperial College London โดยมี รศ. นพ. ชวลิต ไพโรจน์กุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นหัวหน้าโครงการฝ่ายไทย ในการเสนอโครงการวิจัยเรื่อง Targeting the FOXM1 signature for early diagnosis and treatment in cholangiocarcinoma ทุน Newton-TRF ระยะโครงการ 3 ปี

— ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ได้รับทุนสนับสนุนกลุ่มวิจัย Research Group for Glycosciences and Glycotechnology (R3G) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2560-2562 จำนวน 900,000 บาท ระยะโครงการ 3 ปี (ปีละ 300,000 บาท)

10. **ผลผลิต (output)**

ผลงาน	แผน	ผล
1. จำนวนนักวิจัยที่สร้างจากโครงการ 1.1 สถาบันเดียวกัน	5	5 คน
1.2 ต่างสถาบัน	1	1 คน
1.3 จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาเอก	5	7 คน
1.4 จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาโท	3	8 คน
2. จำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	15	22 เรื่อง
3. การเลื่อนตำแหน่งวิชาการ	-	4 คน
4. รางวัลวิจัยที่ได้รับ (ไม่รวมรางวัลเสนอผลงาน)	-	12 รางวัล
5. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ	-	28 ครั้ง
6. การประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติรวม	-	80 เรื่อง

Cancer Epidemiology 39 (2015) 274–278

Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Epidemiology

The International Journal of Cancer Epidemiology, Detection, and Prevention

journal homepage: www.cancerepidemiology.net

Diabetes mellitus: Possible risk and promoting factors of cholangiocarcinoma
Association of diabetes mellitus and cholangiocarcinoma

Charupong Saengboonmee [a,c], Wunchana Seubwai [b,c], Chaisiri Wongkham [a,c], Sopit Wongkham [a,c,*]

[a] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[b] Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[c] Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 January 2015
Received in revised form 26 March 2015
Accepted 5 April 2015
Available online 22 April 2015

Keywords:
Diabetes mellitus
Hyperglycemia
Cholangiocarcinoma
Opisthorchis viverrini
Cancer risk

ABSTRACT

The highest incidence of Cholangiocarcinoma (CCA), a malignancy of bile duct epithelia, is in the Northeast of Thailand. The liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, is the known risk factor for CCA development in this region. Approximately 1% of *O. viverrini* infected individuals develop CCA. There could be other factors that influence the cholangiocarcinogenesis particularly in the *O. viverrini* infected individuals. The global epidemiological studies of risk factors for CCA in non-*O. viverrini* related patients indicated diabetes mellitus (DM) as a risk factor of CCA. The molecular studies in many cancers indicated that high levels of glucose, insulin and an obese condition directly and indirectly enhanced growth of cancers. For *O. viverrini* associated CCA, there is limited information related to DM and CCA development. High mortality rates of CCA and DM, however, were reported in the same geographical areas of northeastern Thailand. Whether DM is a factor that enhances CCA development in *O. viverrini* infected individuals or promotes CCA progression are discussed in a perspective of epidemiological and molecular studies.
© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM), a disease characterized by hyperglycemia, is highly prevalent in both industrialized and developing countries. In 2011, an estimated 347 million people worldwide suffered from DM [1] and more than 80% of diabetic deaths are in low and medium income countries [2]. The World Health Organization (WHO) has projected DM to be the 7th global leading cause of death in 2030. DM is also an important health problem in Southeast Asia with an age-standardized death rate of DM at 25.96 per 100,000. The diabetic patients usually suffer from mild to serious complications, e.g., retinopathy, neuropathy and nephropathy which can cause high morbidity and mortality rates. The other complication from the indirect effects of diabetic conditions is low immunity leading to a high susceptibility to infections. DM does not only cause the commonly mentioned complications, but is also the risk factor for other non-communicable diseases including cardiovascular disease and cancer [3–5].

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy that arises from bile duct epithelia and is anatomically classified as extra- or intrahepatic. CCA is a rare disease in the western countries but there is concern that its incidence is increasing globally. Several factors, including primary sclerosing cholangitis, hepatitis B virus infection and parasitic infections are highly associated with CCA development [6,7]. Compared with the incidence in western countries, the incidence of CCA in Southeast Asia is very high and especially the highest in the Northeast of Thailand [8,9]. Infection with the liver fluke, *O. viverrini*, is a major causative factor of CCA in Thailand and countries in the Greater Mekong sub-region such as Laos and Cambodia, whereas *Clonochis sinensis* which is endemic in East Asia is found to be a cancer promoter for CCA in China and Korea. It is hypothesized that chronic infections of parasites probably initiate the carcinogenesis by parasite factors such as the mitogenic substances of excretory–secretory antigens together with the immunological response of the host which promotes prolonged inflammation, causing DNA damage and finally CCA development [10,11].

* Corresponding author at: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel.: +66 43 348 386; fax: +66 43 348 386.
E-mail address: sopit@kku.ac.th (S. Wongkham).

http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2015.04.002
1877-7821/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The association of *O. viverrini* infection and CCA has been strongly proven in the experimental animal model. Hamsters infected with *O. viverrini* and supplemented with sub-carcinogenic doses of dimethylnitrosamine developed CCA whereas those infected with *O. viverrini* alone or supplemented with the carcinogen doses alone did not [12]. The infection of *O. viverrini* per se may not produce CCA, but other carcinogens or risk factors may also be required to induce CCA development. In a hospital based prospective, case–controlled study of 227 hepatobiliary disease patients with *O. viverrini* infection, 8 patients (3.5%) developed CCA within 2 years of the follow up period [13]. Recently, in the community study, based on ultrasound screening of 4154 subjects resident in the northeast Thailand, only 0.5% were suspected to be CCA [14].

The national prevalence of *O. viverrini* in Thailand was reported to be 14% in 1981 [15] and decreased to 9.4% in 2001 [16]. Approximately 6 million people in Thailand remain infected with *O. viverrini*. It should be noted here that the prevalence of *O. viverrini* infection has a regional variation. A high prevalence of *O. viverrini* infection of 22.7% was reported in the upper Northeast of Thailand, with the highest record of 40.9% in Nakhon Phanom province [17]. Even though *O. viverrini* infection is strongly associated with cholangiocarcinogenesis of people in the endemic areas, in fact, fewer than 1% of *O. viverrini* infected people develop CCA [14]. This indicates that other not yet identified factors may influence the minor group of infected persons who develop CCA. Recently there are several studies that reported that common factors, such as smoking, alcoholic consumption, obesity and DM as risks of CCA in non-*O. viverrini* related CCA [18]. DM has been reported as a risk factor of cancer development in various cancers review in [5]. Herein, is a review of the epidemiological studies that have reported that DM is a risk of CCA. The molecular mechanisms by which DM may enhance cancer development as well as the possibility of DM to be a factor which promotes CCA development in *O. viverrini* infected persons are elaborated.

2. Epidemiological studies revealed DM as a risk factor of CCA

The association of DM and cancer has been reported in various cancers. DM can increase the risk of cancer in many organs such as pancreas, liver, breast, thyroid, urinary bladder and endometrium (review in [5]). DM, however, was shown to reduce risk of prostate cancer [4,5,19–21]. For CCA, many epidemiological studies indicated DM as a risk of CCA (Table 1). The meta-analysis of 10 case–control and 5 cohort studies showed that DM increased the risk of CCA with an overall relative risk (RR) of 1.60 (95% CI: 1.38–1.87) [22]. DM increased the risk of extrahepatic CCA with a RR of 1.63 (95% CI: 1.29–2.05) and the risk became greater for intrahepatic CCA with a RR of 1.97 (95% CI: 1.57–2.46). In addition, Palmer and Patel [18] reported the meta-analysis of 11 case–control studies in areas with both a high and low prevalence of intrahepatic CCA. Some common factors, e.g., smoking, alcoholic use, obesity and type 2 DM (T2DM) increased risk of CCA to different degrees. Among these, alcohol consumption gave the highest risk with an odds ratio (OR) 2.81 (95% CI: 1.52–5.21) while DM ranked second with an OR 1.89 (95% CI: 1.74–2.07).

A recent case–control study carried on in the United States on 612 CCA patients and 594 controls revealed that DM increased risk of CCA with an adjusted odds ratio (AOR) 3.60 (95% CI: 2.30–5.50) [23]. The benefit of using metformin, an anti-diabetic drug, was also demonstrated in this study. DM patients who used metformin as DM treatment had a significantly decreased risk of CCA development with an OR 0.40 (95% CI: 0.20–0.90) [23]. The benefit of using metformin for chemoprevention of CCA was suggested. Metformin has been used as an anti-cancer drug and is now in a clinical trial in patients of several cancers [24].

For extrahepatic CCA, a meta-analysis on DM and biliary tract cancer was performed by Ren et al. [25]. In this study, DM increased the risk of extrahepatic CCA and gall bladder cancer with a summary RR 1.43 (95% CI: 1.18–1.72), however, the association of DM and cancer of the ampulla of Vater was not found. That DM increased the risk of extrahepatic CCA was supported by a meta-analysis of four case–control and five cohort studies [26]. In this meta-analysis, DM increased the risk of extrahepatic CCA with a RR 1.61 (95% CI: 1.14–2.29). The data from several epidemiological studies strongly indicate that DM is a risk factor of both intrahepatic and extrahepatic CCA.

Many epidemiological studies emphasized DM as a considerable common risk factor for various cancers including CCA. Even though the positive association of DM and CCA was unveiled, there are many factors that should be considered before making a conclusion. First, the limitation of each epidemiological study may provide a biased result, such as in the case–control studies, they were unable to define whether DM or CCA occurred first. Secondly, DM patients have more frequent health checkups in the clinic than healthy people who hardly ever see a doctor. This may increase the chance of cancer detection in DM patients compared to non-DM persons. Thus the hospital based studies are likely to be biased by reviewing the medical records. To strongly support DM increasing the risk of CCA, the molecular mechanism linking DM to CCA is ultimately needed.

3. A possible molecular linkage of DM and CCA

The molecular mechanisms by which DM increases risk of cancer have been studied in many cancers, however, studies are limited for CCA. Since DM increases the risk of cancer in several

Table 1
Meta-analysis indicates an increased risk of CCA in DM patients.

Type of biliary tract malignancy	Increased risk	Number of recruited studies	References
CCA	1.60 (1.38–1.87)[a]	10 case–control 5 cohort	Jing et al. [22]
Intrahepatic CCA	1.97 (1.57–2.46)[a]	10 case–control 5 cohort	Jing et al. [22]
	1.89 (1.74–2.07)[b]	11 case–control	Palmer and Patel [18]
Extrahepatic CCA	1.63 (1.29–2.05)[a]	10 case–control 5 cohort	Jing et al. [22]
	1.61 (1.14–2.29)[a]	4 case–control 5 cohort	Zhang and Zhao [26]
Extrahepatic CCA and CA gall bladder	1.43 (1.18–1.72)[a]	8 case–control 13 cohort	Ren et al. [25]

[a] Relative risk.
[b] Odds ratio.

organs including in CCA [4,5], therefore, the molecular studies of DM increasing the risk in other cancers might be applied to CCA.

One important candidate molecule bridging DM and cancer is insulin. There are several studies that indicated the association of high levels of blood insulin or blood c-peptide (a peptide fragment released when insulin is structurally modified to a mature hormone) and the increased risk of cancer [27]. In brief, insulin resistant patients (T2DM) who usually have a compensatory hyperinsulinemia following hyperglycemia are at high risk of cancer because of the mitogenic effect of insulin. In general, insulin acts on its target via the insulin receptor (IR). Upon binding, the signal from receptor is passed through the secondary signaling molecules to target effectors such as phosphoinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase (PI3K) for enhancing glucose uptake in the insulin dependent cells. Besides this metabolic effect which involves glucose transportation, the insulin receptor can also pass the signal through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway which finally stimulates cell proliferation. This mitogenic effect of insulin shows promise for the mechanism of increasing cancer risk. This assumption can be supported by the fact that the insulin resistant patients usually have hyperproliferative and hyperpigmented skin called acanthosis nigricans. The similar mechanism by which insulin promotes cell proliferation as shown in acanthosis nigricans is believed to be a stimulating factor of cancer development in many organs [27–29]. Besides the direct effect of insulin on its receptor, insulin can also act via the insulin-like growth factor (IGF) for its mitogenic effect. The elevated level of insulin stimulates the degradation of IGF binding protein and releases free IGF which promptly acts on its receptor for cell proliferation. Moreover, high insulin in compensatory hyperinsulinemic conditions can directly bind to the IGF receptor (IGFR) which normally has a low affinity for insulin [27,30]. The overall effects make the DM patients with hyperinsulinemia prone to develop cancer (Fig. 1).

In addition to insulin, high blood glucose is recently proposed to be a new link between DM and cancer and it may explain how DM increases the risk of CCA [31,32]. A supra-physiological range of glucose can enhance the Wnt/β-catenin signaling pathway which activates transcription of molecules involved in the cell cycle and cell proliferation in both malignant and non-malignant cell lines (Fig. 1) [33]. It is interesting that the level of glucose, but not ATP, was related to cell signaling [33]. This suggests the other role of glucose rather than an energy source. Recently, the direct effect of high glucose in increasing the risk of cancer was demonstrated [34]. It was shown that chronic hyperglycemia, indicated by elevated an glycohemoglobin or hemoglobin test (A1C), was associated with increased risk of several cancers independently of the DM status.

The other factor that was commonly found together with DM and was proposed to be a risk of CCA is obesity [35,36]. Even this suggestion is still controversial but several supportive links of evidence in other cancers are available [37,38]. The obese people normally have a higher risk to develop DM by the effect of adipokines such as leptin synthesized from adipose tissue. These adipokines are proposed to be another linkage of obesity and CCA [39]. The possible mechanism of obesity in promoting CCA development was summarized by Parsi [35]. Leptin can promote cell growth via its receptors which were found in both normal and cancerous cholangiocytes [39]. Other pro-inflammatory cytokines from adipose tissue such as interleukin-6 (IL6) can also stimulate several intracellular pathways that support the survival and

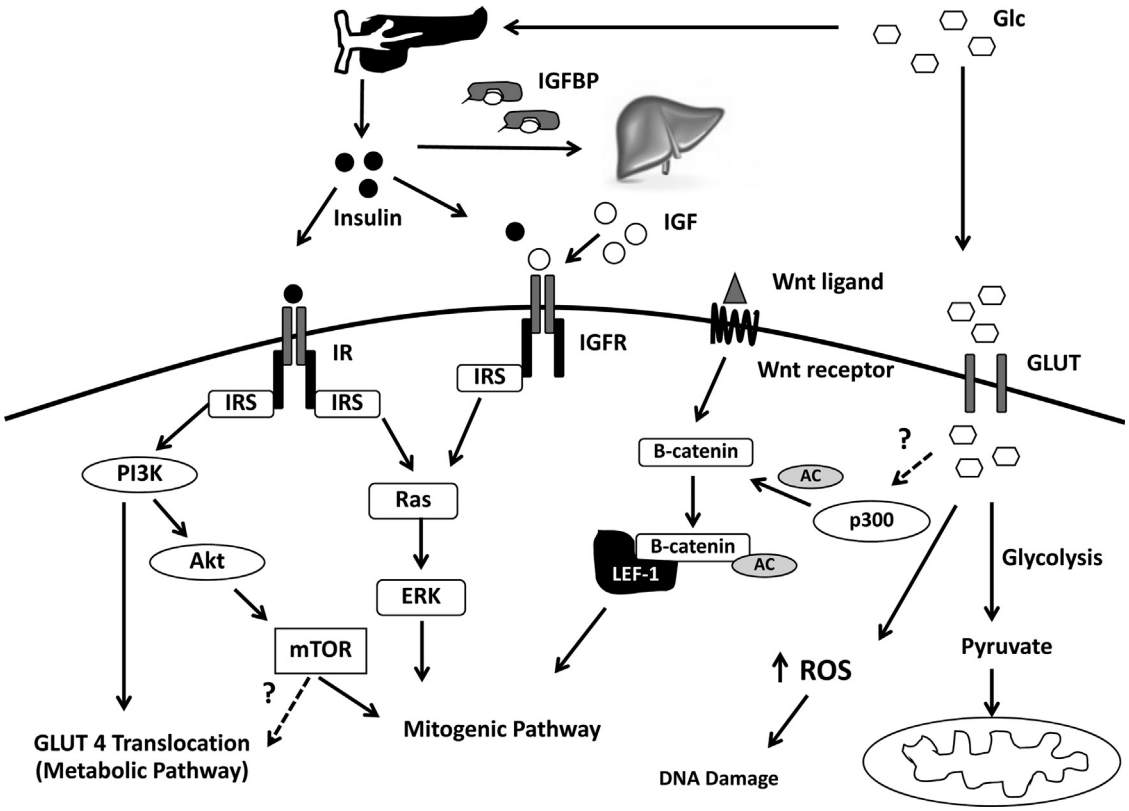


Fig. 1. The mechanism of DM involving carcinogenesis and cancer progression. Growth factors and signal pathways related to hyperglycemia/hyperinsulinemia and cell proliferation are illustrated. Solid lines indicate well documented mechanisms; dashed lines indicate experimental evidence but for which the precise mechanism remains unclear. AC, acetyl group; ERK, extracellcular signal-regulated kinase; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IGF, insulin-like growth factor; IGFR, insulin-like growth factor receptor; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; Glc, glucose; GLUT, glucose transporter; LEF-1, lymphoid enhancing factor-1; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase.

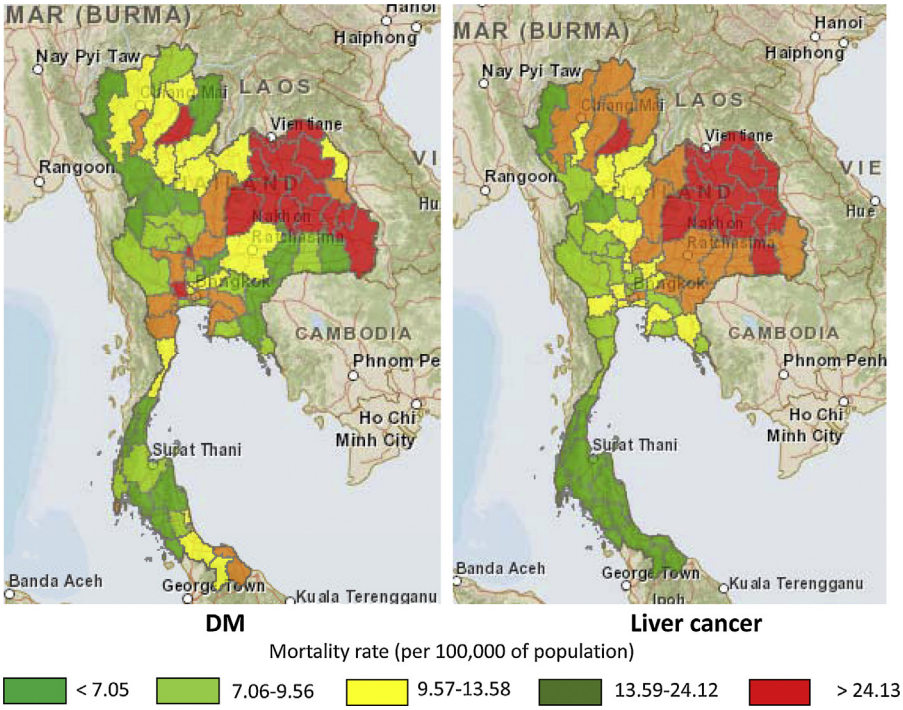


Fig. 2. Mortality rates of DM and CCA in each province of Thailand (1998–2008). Adapted from the Health Information System Development Office (HISO), Ministry of Public Health of Thailand (http://www.hiso.or.th/hiso/record/record.php).

growth of cancerous cholangiocytes. Elevated levels of serum IL6 were reported in *O. viverrini* associated CCA [40].

4. Does DM promote progression of CCA?

The studies of DM promoting cancer progression are well established in many cancers but they are limited for CCA. There was only an epidemiological study that showed the unclear association ($P = 0.07$) between CCA patients with DM and shorter survival times [41]. Evidence which may support the role of DM in promoting tumor progression of CCA was that IGFR responsible for cell growth and proliferation was overexpressed in CCA tissues compared with normal cholangiocytes [42]. IGFR can be stimulated by both IGF and high levels of insulin. One can speculate that CCA patients with T2DM or with T1DM who received insulin therapy may exhibit hyperinsulinemia and consequently high IGFR expression and cell proliferation. No correlation of IGFR expression and prognosis, however, was shown in this study.

That DM increased the risk of CCA is clearly demonstrated in many studies, however, the association of DM and the prognosis of CCA is not well understood. The epidemiological studies investigating the molecular linkage of DM promoting CCA should be clarified. To date, whether DM promotes CCA progression is still questionable and is waiting for discovery.

5. Is there any association of DM and CCA in Thailand?

Up to the present, there is no epidemiological study of the association of DM and *O. viverrini* associated CCA. The association of DM and CCA in Thailand can be drawn from the indirect evidence. First, the distribution of mortality rates of primary liver cancer, including hepatocellular carcinoma and CCA, and DM were highlighted in the Northeast of Thailand [43]. Second, the data collected during 1998–2008 from the Health Information System Development Office (HISO), Ministry of Public Health of Thailand, showed that almost all provinces with a high mortality rate of DM also had a high mortality rate of liver and biliary tract cancer (Fig. 2). This observation is broadly inclusive and perhaps, molecular studies are ultimately needed for clarification. Nevertheless, the predominant factors which promote CCA development in *O. viverrini*-infected people should be intensively investigated for the effective prevention of CCA.

6. Conclusion

Global epidemiological studies have clearly indicated that DM increased risk of CCA development. The molecular studies from other cancers may support the linkage of DM and CCA. High levels of glucose, insulin and obesity are risk factors that enhance CCA development. For the *O. viverrini*-associated CCA, the incidence is highest in the northeastern Thailand where the high co-prevalence of DM is observed. Up to the present, however, there is no study that has demonstrated the association of this observation. Therefore, it is of interest to investigate whether DM is the missing factor that enhances CCA development in a minority of *O. viverrini* infected individuals. The clarification of the observation may lead to the effective prevention of CCA in the endemic area of liver flukes in the future.

Conflict of Interest

All authors have no conflict of interest.

Authorship contribution statement

C. Saengboonmee, W. Seubwai and C. Wongkham reviewed and wrote the manuscript. S. Wongkham outlined and edited the manuscript.

Acknowledgements

This project was supported by the TRF Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University

to S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University. C. Saengboonmee is a scholar of Junior Science Talent Project (JSTP) (JSTP-06-56-01E), National Science and Technology Development Agency and Ph.D.-M.D. Program of Faculty of Medicine, Khon Kaen University. We would like to acknowledge Prof. James A Will, University of Wisconsin, for editing the manuscript via the Faculty of Medicine Publication Clinic, Khon Kaen University, Thailand.

References

[1] Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. Lancet 2011;378:31–40. http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60679-x.

[2] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 2006;3:e442. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442.

[3] Di Angelantonio E, Gao P, Khan H, Butterworth AS, Wormser D, Kaptoge S, et al. Glycated hemoglobin measurement and prediction of cardiovascular disease. JAMA 2014;311:1225–33. http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.1873.

[4] Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. Diab Care 2010;33:1674–85. http://dx.doi.org/10.2337/dc10-0666.

[5] Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. Endocr Relat Cancer 2009;16:1103–23. http://dx.doi.org/10.1677/erc-09-0087.

[6] Ben-Menachem T. Risk factors for cholangiocarcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol 2007;19:615–7. http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e328224b935.

[7] Li M, Li J, Li P, Li H, Su T, Zhu R, et al. Hepatitis B virus infection increases the risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis and systematic review. J Gastroenterol Hepatol 2012;27:1561–8. http://dx.doi.org/10.1111/j. 1440-1746.2012.07207.x.

[8] Sithithaworn P, Andrews RH, Nguyen VD, Wongsaroj T, Sinuon M, Odermatt P, et al. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. Parasitol Int 2012;61:10–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.08.014.

[9] Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. Acta Trop 2011;120(Suppl 1):S158–68. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.07.006.

[10] Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J, Laha T, Smout MJ, Mairiang E, et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* – multiple pathways to cancer. Trends Parasitol 2012;28:395–407. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.006.

[11] Yongvanit P, Pinlaor S, Bartsch H. Oxidative and nitrative DNA damage: key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis. Parasitol Int 2012;61:130–5. http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.011.

[12] Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. Cancer Res 1978;38:4634–9.

[13] Kurathong S, Lerdverasirikul P, Wongpaitoon V, Pramoolsinsap C, Kanjanapitak A, Varavithya W, et al. *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma: a prospective, case–controlled study. Gastroenterology 1985;89:151–6.

[14] Mairiang E, Chaiyakum J, Chamadol N, Laopaiboon V, Srinakarin J, Kunpitaya J, et al. Ultrasound screening for *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinomas: experience in an endemic area. Asian Pac J Cancer Prev 2006;7:431–3.

[15] Harinasuta C, Harinasuta T. *Opisthorchis viverrini*: life cycle, intermediate hosts, transmission to man and geographical distribution in Thailand. Arzneimittelforschung 1984;34:1164–7.

[16] Jongsuksuntigul P, Imsomboon T. Opisthorchiasis control in Thailand. Acta Tropica 2003;88:229–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.01.002.

[17] Thaewnongiew K, Singthong S, Kutchamart S, Tangsawad S, Promthet S, Sailugkum S, et al. Prevalence and risk factors for *Opisthorchis viverrini* infections in upper Northeast Thailand. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:6609–12.

[18] Palmer WC, Patel T. Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatol 2012;57:69–76. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.022.

[19] Zhang F, Yang Y, Skrip L, Hu D, Wang Y, Wong C, et al. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis based on 12 case–control and 25 cohort studies. Acta Diabetol 2012;49(Suppl 1):S235–46. http://dx.doi.org/10.1007/s00592-012-0439-5.

[20] Xu H, Mao SH, Ding GX, Ding Q, Jiang HW. Diabetes mellitus reduces prostate cancer risk – no function of age at diagnosis or duration of disease. Asian Pac J Cancer Prev 2013;14:441–7.

[21] Yang XQ, Xu C, Sun Y, Han RF. Diabetes mellitus increases the risk of bladder cancer: an updated meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev 2013;14:2583–9.

[22] Jing W, Jin G, Zhou X, Zhou Y, Zhang Y, Shao C, et al. Diabetes mellitus and increased risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis. Eur J Cancer Prev 2012;21:24–31. http://dx.doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283481d89.

[23] Chaiteerakij R, Yang JD, Harmsen WS, Slettedahl SW, Mettler TA, Fredericksen ZS, et al. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma: association between metformin use and reduced cancer risk. Hepatology 2013;57:648–55. http://dx.doi.org/10.1002/hep.26092.

[24] Pernicova I, Korbonits M. Metformin – mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol 2014;10:143–56. http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.256.

[25] Ren HB, Yu T, Liu C, Li YQ. Diabetes mellitus and increased risk of biliary tract cancer: systematic review and meta-analysis. Cancer Causes Control 2011;22:837–47. http://dx.doi.org/10.1007/s10552-011-9754-3.

[26] Zhang LF, Zhao HX. Diabetes mellitus and increased risk of extrahepatic cholangiocarcinoma: a meta-analysis. Hepatogastroenterology 2013;60:684–7. http://dx.doi.org/10.5754/hge12966.

[27] Belfiore A, Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. Endocr Relat Cancer 2011;18:R125–47. http://dx.doi.org/10.1530/ERC-11-0074.

[28] Barbato MT, Criado PR, Silva AK, Averbeck E, Guerine MB, Sa NB. Association of acanthosis nigricans and skin tags with insulin resistance. An Bras Dermatol 2012;87:97–104.

[29] Saraiya A, Al-Shoha A, Brodell RT. Hyperinsulinemia associated with acanthosis nigricans, finger pebbles, acrochordons, and the sign of Leser-Trelat. Endocr Pract 2013;19:522–5. http://dx.doi.org/10.4158/ep12192.ra.

[30] Djiogue S, Nwabo Kamdje AH, Vecchio L, Kipanyula MJ, Farahna M, Aldebasi Y, et al. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. Endocr Relat Cancer 2013;20:R1–7. http://dx.doi.org/10.1530/erc-12-0324.

[31] Garcia-Jimenez C, Garcia-Martinez JM, Chocarro-Calvo A, De la Vieja A. A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/beta-catenin signaling by high glucose. J Mol Endocrinol 2014;52:R51–66. http://dx.doi.org/10.1530/jme-13-0152.

[32] Fedirko V, Lukanova A, Bamia C, Trichopolou A, Trepo E, Nothlings U, et al. Glycemic index, glycemic load, dietary carbohydrate, and dietary fiber intake and risk of liver and biliary tract cancers in Western Europeans. Ann Oncol 2013;24:543–53. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds434.

[33] Chocarro-Calvo A, Garcia-Martinez JM, Ardila-Gonzalez S, De la Vieja A, Garcia-Jimenez C. Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. Mol Cell 2013;49:474–86. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.022.

[34] de Beer JC, Liebenberg L. Does cancer risk increase with HbA, independent of diabetes? Br J Cancer 2014. http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.150.

[35] Parsi MA. Obesity and cholangiocarcinoma. World J Gastroenterol 2013;19:457–62. http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i4.457.

[36] Wu Q, He XD, Yu L, Liu W, Tao LY. The metabolic syndrome and risk factors for biliary tract cancer: a case–control study in China. Asian Pac J Cancer Prev 2012;13:1963–9.

[37] Lu K, Song XL, Han SL, Wang CH, Zhong N, Qi LF. Potential study perspectives on mechanisms and correlations between adiposity and malignancy. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:1057–60.

[38] Chou SH, Tseleni-Balafouta S, Moon HS, Chamberland JP, Liu X, Kavantzas N, et al. Adiponectin receptor expression in human malignant tissues. Horm Cancer 2010;1:136–45. http://dx.doi.org/10.1007/s12672-010-0017-7.

[39] Fava G, Alpini G, Rychlicki C, Saccomanno S, DeMorrow S, Trozzi L, et al. Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth. Cancer Res 2008;68:6752–61. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6682.

[40] Sripa B, Thinkhamrop B, Mairiang E, Laha T, Kaewkes S, Sithithaworn P, et al. Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. PLoS Negl Trop Dis 2012;6:e1654. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001654.

[41] Liu RQ, Shen SJ, Hu XF, Liu J, Chen LJ, Li XY. Prognosis of the intrahepatic cholangiocarcinoma after resection: hepatitis B virus infection and adjuvant chemotherapy are favorable prognosis factors. Cancer Cell Int 2013;13:99. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2867-13-99.

[42] Alvaro D, Barbaro B, Franchitto A, Onori P, Glaser SS, Alpini G, et al. Estrogens and insulin-like growth factor 1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma. Am J Pathol 2006;169:877–88. http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.050464.

[43] Faramnuayphol P, Chongsuvivatwong V, Pannarunothai S. Geographical variation of mortality in Thailand. J Med Assoc Thai 2008;91:1455–60.

Clinical Biochemistry xxx (2015) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem

Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach

Sirorat Pattanapairoj [a,b,1], Atit Silsirivanit [c,e,1], Kanha Muisuk [d,e], Wunchana Seubwai [d,e], Ubon Cha'on [c,e], Kulthida Vaeteewoottacharn [c,e], Kanlayanee Sawanyawisuth [c,e], Danaipong Chetchotsak [a,b,*], Sopit Wongkham [c,e,**]

[a] Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[b] System Modeling for Industry Research Group, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[c] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[d] Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[e] Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2015
Received in revised form 26 March 2015
Accepted 30 March 2015
Available online xxxx

Keywords:
Tumor markers
Combined analysis
C4.5 decision tree
Single neural network
Hepatobiliary
ALP
Mucin

ABSTRACT

Objective: Cholangiocarcinoma (CCA) is usually fatal because of the absence of tests for early detection and lack of effective therapy. Tumor markers with adequate diagnostic values are of clinical significance. This study is aimed to improve the diagnostic power of serum markers using the computational data mining technique to develop a combined diagnostic model that yielded the best diagnostic values for CCA.

Design and methods: Eight CCA-associated markers—carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9, alkaline phosphatase (ALP), and gamma glutamyl transferase, biliary-ALP, mucin5AC, CCA-associated carbohydrate antigen (CCA-CA) and CA-S27—were used as the inputs for the C4.5 decision tree classification model and the selected model was confirmed by ANN analyses. Eight serum markers for CCA were determined in the training set of 85 histologically proven-CCA patients and 82 control subjects. The chosen set of combined markers that gave the best diagnostic values for CCA was then validated in the testing set of 22 CCA patients and 60 controls.

Results: A decision tree diagram built by the C4.5 algorithm suggested the serial analysis of CCA-CA and ALP for distinguishing CCA patients from non-CCA subjects with all diagnostic parameters ≥95%. The combined tests showed a precise diagnosis in the testing set.

Conclusions: The C4.5 model indicates the combined markers of CCA-CA and ALP that produced the more precise diagnosis for CCA.

© 2015 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA), a malignancy of bile duct epithelium, is a relatively rare cancer worldwide; however, its incidence is extremely high in Southeast Asia, especially in the northeastern part of Thailand [1]. CCA is normally difficult to diagnose until the disease develops to the advanced or disseminated stage, which makes CCA a tumor with an extremely poor prognosis. As a result, approximately 35/100,000 or 14,400 CCA patients die per year in Thailand [2]. Therefore, it is an urgent need to search for tumor markers that are sensitive and specific enough to diagnose individuals with CCA.

At present, serum alkaline phosphatase (ALP), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), carcinoembryonic antigen (CEA) and gamma-glutamyl transferase (GGT) are the most routine markers for diagnosis of CCA in general clinical practices. A number of new CCA-associated markers have also been reported, such as biliary-alkaline phosphatase (BALP) [3], mucin5AC (MUC5AC) [4], CCA-associated carbohydrate antigen (CCA-CA) [5], CA-S27 [6], cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) [7,8], receptor-binding cancer antigen expressed in SiSo cells IRCAS1 [9], and M2-pyruvate kinase [10]. However, none of these markers alone has impressive clinical diagnostic value [11].

Improvement in the diagnosis of cancer using combined measurements of multiple tumor markers has been demonstrated in many studies [11–13]. This approach provides a better sensitivity, specificity, and accuracy for detection of cancers. Computer-based diagnostic and referral systems, such as artificial neural network and decision tree

* Correspondence to: D. Chetchotsak, Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, 40002, Thailand. Fax: +66 43 362 145.
** Correspondence to: S. Wongkham, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Fax: +66 43 348 386.
E-mail addresses: cdanai@kku.ac.th (D. Chetchotsak), sopit@kku.ac.th (S. Wongkham).
[1] Co-first author.

http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022
0009-9120/© 2015 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Pattanapairoj S, et al, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin Biochem (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022

classifications, have been applied to simulate the combined-diagnostic models or equations from the measured tumor markers [12–14].

The computational data mining C4.5 model, and its most recent version C5.0, have been used extensively as a classification model in many different areas such as dental therapy [15], mammogram analysis [16], land-use planning [17], construction accidents [18], and individual credit evaluation [19]. In this study, we aimed to use the computational data mining C4.5 model to develop a combined diagnostic model that yielded the best diagnostic values for CCA from four routinely used serum markers for CCA—CEA, CA19-9, ALP, and GGT, and four recently reported markers—BALP, MUC5AC, CCA-CA and CA-S27. The C4.5 created several combined marker models and the model that had the highest discrimination power was then compared with those of the reference technique, single-hidden-layer feed-forward neural network, commonly known as artificial neural network (ANN). Finally, the discrimination power of the combined tests was validated in the second cohort subjects. The combination test may serve as a tool to provide more precise diagnosis of CCA.

Materials and methods

Patients and serum samples

All serum samples were obtained from the specimen bank of The Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. Informed consent was obtained from all subjects, and the study protocol was approved by The Khon Kaen University Ethics Committee in Human Research. Serum from 85 histologically proven-CCA patients (Table 1) and from 82 age and sex matched control subjects, including 11 healthy persons (HE), 30 opisthorchiasis subjects (OV), 14 benign hepatobiliary disease patients (BHD), and 27 gastrointestinal cancer patients (GICA) were used in the first cohort as a training set. A second cohort used as a validation set was composed of 22 CCA patients and 60 controls (HE = 22, OV = 7, BHD = 16, GICA = 15). Cancer and BHD patients were diagnosed using histology. Opisthorchiasis in the OV group was confirmed by a positive fecal result for *Opisthorchis viverrini* eggs, and healthy controls were persons whose medical check-up, liver function tests and complete blood count were normal.

Determination of serum markers

ALP (U/L) and GGT (U/L) were determined using enzymatic assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). CEA (ng/mL) and CA19-9 (U/mL) were analyzed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA, Roche Diagnostics GmbH) according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Serum BALP (U/L), MUC5AC (Absorbance Unit, AU), CCA-CA (AU) and CA-S27 (AU) were determined using lectin capture ELISA as described previously [3–6].

Table 1
Demographical data of CCA patients of the training set.

Characteristics		Number of patients	
Age (years)	≤56	46	54.1%
	>56	39	45.9%
Sex	Male	56	65.8%
	Female	29	34.2%
Histological types	Papillary	17	20.0%
	Non-papillary	68	80.0%
Staging	I–III	12	14.1%
	IVA	25	29.4%
	IVB	48	56.5%
Jaundice[a]	Jaundice	49	57.6%
	Non-jaundice	36	42.4%

[a] Jaundice = total bilirubin >2 mg/dL.

Construction of C4.5 classification model

In this study, C4.5 decision tree algorithm was used as a classification model while an artificial neural network was used for benchmarking purposes. C4.5 is an algorithm used to construct a decision tree classification model in a logical form [20]. The model creates a decision tree based on the information gain concept [21], where information gain reflects the ability to classify the data using a particular marker. Starting at the top node of the tree, C4.5 selects the marker with the highest information gain to classify the data in a "top-down recursive divide-and-conquer manner" [22]. At the branch node, C4.5 selects another marker from the remaining set in the same manner. These procedures take place until no more markers are left. More details of C4.5 are provided in [20].

An artificial neural network known as (ANN) [23] is an information processing and computational system which is modeled after a biological nervous system. Like a human brain, ANN can process, learn, and remember information. The simplest and most common form of ANN is a single-hidden layer feedforward neural network trained using the backpropagation algorithm and was used in this study. ANN can map the relationship between the inputs and outputs through adjusting the connection weights and hence it has been used successfully in both regression and classification tasks.

To construct a classification model using both C4.5 and ANN, all combined markers were used as inputs and the diagnostic result as "CCA" or "nonCCA" was the output. For C4.5, we conducted an experiment to build a model with the best combination of markers. In this step, binary splits of at least five instances per leaf and a confidence threshold for pruning of 0.75 were used as settings. To construct ANN, the following settings were used: 20 hidden units, sigmoid function, and 50,000 learning cycles. The results obtained were compared to those from the C4.5 model. Both C4.5 and ANN were built using an open source machine learning software, WEKA [24] and were validated using the five-fold cross validation method.

Performance evaluation and experimental trials

For consistency, the CCA samples were referred to as "positive" while the non-CCA samples were labeled as "negative". The confusion matrix and defined performance measures for a binary class problem, used to measure performance of the classification models were: sensitivity (SEN), specificity (SPEC), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (ACC). These measures were defined as follows: the terms TP and TN denoted correct classification for positive and negative samples while FP and FN defined incorrect classification for positive and negative samples, respectively. The diagnostic values were determined as SEN = TP / (TP + FN); SPEC = TN / (TN + FP); PPV = TP / (TP + FP); NPV = TN / (TN + FN); and ACC = (TP + TN) / (TP + FN + FP + TN).

To make sure that the training data was chosen randomly to avoid bias, C4.5 model construction in this study was replicated ten times. This was done by training and validating the classification model according to the five-fold cross validation method. Performance of each model was then evaluated. These procedures were subsequently repeated ten times. A 95% confidence interval for all performances was then constructed and used for comparison and evaluation purposes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 14.0 for Windows Evaluation software (SPSS Inc., Chicago, USA). Mann–Whitney U test was used to compare the serum level of marker of the CCA and the control groups. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

Please cite this article as: Pattanapairoj S, et al, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin Biochem (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022

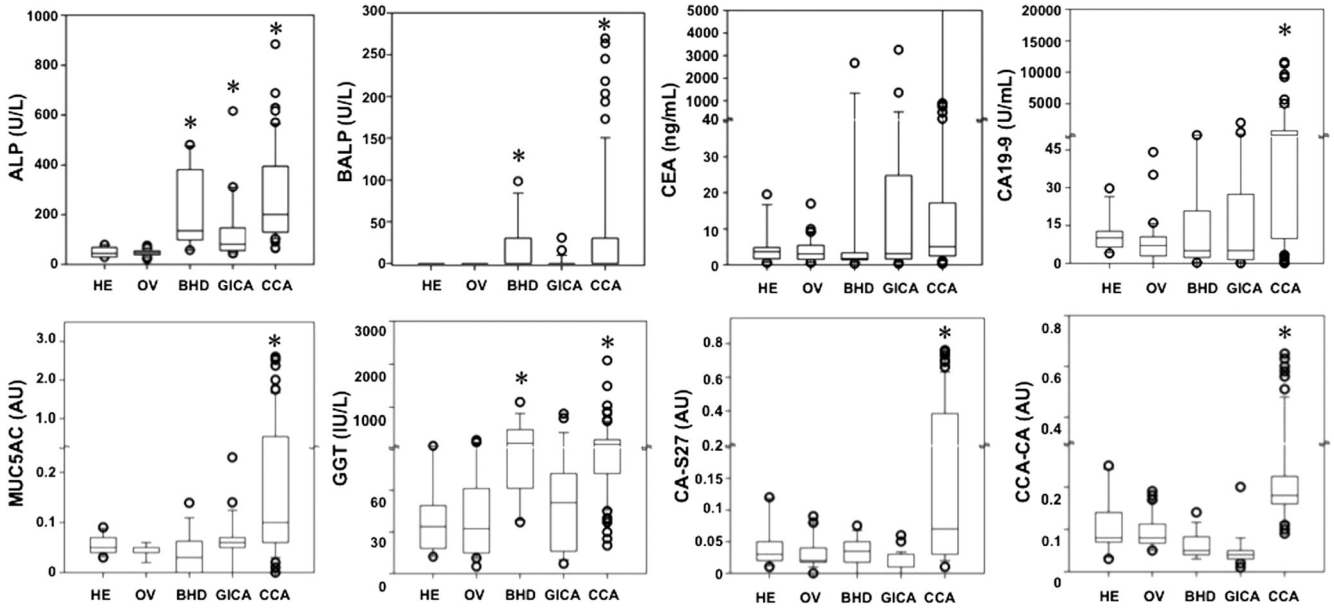


Fig. 1. Levels of individual serum markers in CCA patients and control groups. The levels of ALP, BALP, CEA, CA19-9, MUC5AC, GGT, CA-S27 and CCA-CA from individual subjects were determined and compared between the CCA group and controls. * = significantly different from the healthy group ($P < 0.05$). AU = Absorbance Unit; HE = healthy persons; OV = opisthorchiasis subjects; BHD = patients with benign hepatobiliary diseases; GICA = patients with gastrointestinal cancers excluding CCA.

Results

Single serum marker diagnoses CCA with different discrimination power

Eight serum markers for diagnosis of CCA (ALP, BALP, CA 19-9, CEA, GGT, MUC5AC, CA-S27, and CCA-CA) were determined in 85 cases of histologically proven CCA patients and 82 non-CCA control subjects. Of all serum markers tested except CEA, the average levels of each marker from the CCA group were significantly higher than those of the healthy subjects ($P < 0.05$, Fig. 1). The serum levels of CA19-9, MUC5AC, CA-S27 and CCA-CA from the CCA group were considerably higher than those from each subgroup of the controls ($P < 0.01$), while levels of CEA among the subgroups were not statistically different.

The diagnostic powers of each marker were compared using the cut-off value reported for each marker to discriminate CCA from all control subjects. As shown in Table 2, each marker provided different diagnostic powers. In the cohort studied, serum BALP, CA19-9 and MUC5AC gave low sensitivity with high specificity, whereas CEA, GGT and CA-S27 yielded high sensitivity but low specificity. Compared to other serum markers, ALP exhibited moderate diagnostic powers of 77% for all parameters. Among eight serum markers, CCA-CA yielded the highest SEN and NPV of 90% and ACC of 87%. However, none of the single markers tested gave sensitivity and specificity over 90% and reached accuracy >80%.

C4.5 decision tree classification and ANN suggest multiple combination markers with improved diagnostic powers

Different combinations of eight CCA-associated markers were used as the inputs for the C4.5 decision tree classification models and the selected model was confirmed by ANN analyses. In this case when all eight markers were presented to the C4.5 algorithm, only two serum markers (ALP and CCA-CA) were selected as model inputs for combined analysis. The model with the use of ALP and CCA-CA as markers was labeled as model 1. Other different combinations of markers were also presented to the C4.5 algorithm, but only five more models (models 2, 3, 4, 5, and 6) were analyzed by C4.5. Performance of all models in terms of a 95% confidence interval for all defined measures was tabulated in Table 3. In general, most of the models performed well in terms of SEN and NPV but were worse in terms of SPEC and PPV. This is because the term FN dominates SEN and NPV while FP affects SPEC and PPV. In this case, models 2, 3, 4, 5, and 6 had small FN but large FP and as a result had high SEN and NPV but low SPEC and PPV. However, model 1 performed well with performance above 95% in all measures with small variation. This model provided smaller FN and FP but with high ACC as compared to those of other models. Accordingly, this model was considered to be the optimal model for diagnosis of CCA.

The diagnostic parameters of the combined test (ALP/CCA-CA) were compared with those of the reference technique, ANN. Table 4 shows

Table 2
Diagnostic values of the single marker for diagnosis of CCA.

Marker	Cut-off values[a]	Diagnostic performance				
		SEN	SPEC	PPV	NPV	ACC
ALP	121 U/L	77.65 ± 0.00	76.85 ± 0.08	77.98 ± 0.16	77.56 ± 0.38	77.25 ± 0.03
BALP	0 U/L	47.06 ± 0.00	86.58 ± 0.05	78.19 ± 0.68	61.54 ± 0.20	66.46 ± 0.02
CEA	2.5 ng/mL	74.12 ± 0.00	46.26 ± 0.10	59.01 ± 0.31	63.77 ± 0.77	60.46 ± 0.04
CA19-9	37 U/mL	65.88 ± 0.00	88.00 ± 0.05	86.67 ± 0.51	71.78 ± 0.14	77.25 ± 0.02
MUC5AC	0.074 AU	67.06 ± 0.00	91.46 ± 0.05	89.67 ± 0.41	73.33 ± 0.35	79.04 ± 0.02
GGT	50 IU/L	85.88 ± 0.00	53.72 ± 0.14	66.30 ± 0.27	79.26 ± 1.00	70.08 ± 0.04
CA-S27	0.026 AU	87.06 ± 0.00	57.29 ± 0.09	68.11 ± 0.16	81.70 ± 0.46	72.45 ± 0.03
CCA-CA	0.11 AU	90.59 ± 0.00	84.16 ± 0.04	85.78 ± 0.13	89.88 ± 0.12	87.43 ± 0.01

[a] Over the cut-off value indicates CCA. AU = absorbance unit, SEN = sensitivity; SPEC = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ACC = accuracy; AU = absorbance unit.

Please cite this article as: Pattanapairoj S, et al, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin Biochem (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022

Table 3
Diagnostic values of combined-multiple markers suggested from C4.5 model.

Models	Input variables	Classification performance of the C4.5				
		SEN	SPEC	PPV	NPV	ACC
1	ALP, CCA-CA	95.76 ± 1.20	94.63 ± 0.55	95.21 ± 0.37	95.88 ± 1.01	95.20 ± 0.56
2	ALP, GGT	97.65 ± 0.00	72.01 ± 0.10	78.74 ± 1.13	96.89 ± 0.10	85.04 ± 0.03
3	ALP, CA-S27	90.94 ± 1.46	80.24 ± 2.19	83.20 ± 1.27	90.52 ± 1.35	85.69 ± 0.89
4	GGT, CA-S27	82.24 ± 2.69	66.50 ± 1.55	72.66 ± 1.22	80.34 ± 2.34	74.50 ± 1.18
5	GGT, CCA-CA	93.18 ± 1.53	82.54 ± 1.54	85.00 ± 1.18	92.75 ± 1.61	87.96 ± 1.18
6	CA-S27, CCA-CA	91.88 ± 1.21	75.83 ± 1.53	80.66 ± 0.80	91.66 ± 1.16	84.00 ± 0.61

SEN = sensitivity; SPEC = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ACC = accuracy.

the experimental results using ANN with the use of ALP and CCA-CA as markers. As expected, ANN outperformed C4.5 in all performance measures.

Serial analysis of CCA-CA and ALP distinguishes CCA patients from non-CCA persons with high diagnostic power

A decision tree diagram built by the C4.5 algorithm suggested the serial analysis of CCA-CA and ALP for distinguishing CCA patients from non-CCA subjects (Fig. 2). In the first step, all CCA cases (node 2) were discriminated from the control subjects (node 1) using serum CCA-CA of value >0.8 AU. However, 23 cases (28%) of the non-CCA cases were classified as belonging to the CCA group, which were then excluded in the second step using serum ALP. Using ALP >87 U/L as a cutoff, two CCA and 20 non-CCA cases were excluded as non-CCA while 83 CCA and 3 non-CCA were distinguished as CCA.

Validation of the CCA-CA/ALP combined markers for diagnosis of CCA

To verify the diagnostic power of the combined markers, CCA-CA/ALP, in discriminating CCA subjects from the non-CCA control groups, sera were prospectively collected from 22 CCA cases and 60 non-CCA subjects and the CCA-CA and ALP levels in sera were measured. Using the tree diagram created by the C4.5 model as indicated in Fig. 2, 19 of 22 CCA patients were diagnosed as CCA and 55 of 60 subjects in the control group were classified as non-CCA. In this cohort, the combined markers CCA-CA/ALP provided diagnostic powers of 86.36% SEN, 91.67% SPEC, 79.16% PPV, 94.82% NPV and 90.24% ACC.

Discussion

Diagnosis is still a major problem in CCA management. A number of blood tests, e.g., ALP, CEA, CA19-9, and GGT, are considered as diagnostic markers for CCA in hospitals. However, none of these markers is specific to CCA, as these markers are also elevated in sera of patients with several types of cancer, such as pancreatic and colon cancers, and also in non-cancer patients, including those suffering from pancreatitis. There have been many attempts to discover new serum markers for CCA in the past decade. The discrimination powers of these single markers, however, are still not impressive. In this study, a data-mining approach was used for the first time to identify the smallest combined set of markers which could improve the discrimination power of the test for distinguishing CCA patients from several non-CCA controls. A C4.5 model that included CCA-CA and ALP was selected as producing the best result. The two markers provided a high discrimination power for CCA, with all diagnostic parameters reaching 95%.

Eight CCA-associated serum markers, namely CEA, CA19-9, ALP, BALP, GGT, MUC5AC, CA-S27 and CCA-CA were determined in the pre-operative serum from the first cohort of 85 CCA patients and 82 controls used as a training set. The diagnostic power is dependent not only on the proven cases for positive subjects but also on the heterogeneity of the control (negative subjects). Therefore in this study, apart from healthy subjects, we included as controls a broad range of subjects with conditions that may be related to or misdiagnosed as CCA. These included persons with liver fluke infection (opisthorchiasis), patients with hepatobiliary diseases and gastrointestinal tract cancers (gastric cancer, pancreatic cancer, colon cancer and hepatoma). This cohort reflects the actual diagnostic power of the test more accurately than using diseased subjects (CCA) vs. healthy controls alone. As a result, the diagnostic values obtained from our study are possibly valid in the broader groups of subjects.

CCA is a heterogeneous cancer. It can arise in the intrahepatic, hilar and extrahepatic bile ducts and has several different subtypes i.e., mass forming, intraductal and periductal CCA with various histological types. The diagnostic power of a single blood test may not be high enough to cover all subtypes of CCA. This anticipation was supported from the present study which showed that CEA, CA19-9, GGT, and ALP that are generally used for CCA diagnosis were elevated not only in CCA patients but also in the non-CCA subjects. As a result, these markers provide only 60–77% ACC and may not be sufficient for diagnosis of CCA. In contrast, the markers related to mucin, i.e., MUC5AC, CCA-CA and CA-S27, showed higher specificity and sensitivity with accuracy of 72–87%. However, none of these individual markers yielded diagnostic parameters greater than 90%.

The C4.5 decision tree algorithm was used as a classifier in this study because it provides a rule set that explains the relationship between the inputs (serum markers) and the output (diagnostic result; CCA or non-CCA) in a logical manner. The chart or diagram constructed by the C4.5 model provides a simple and convenient protocol for physicians to diagnose CCA patients without relying on any additional computers or devices. In this study, C4.5 was still preferred to ANN because its performance reached the defined target of 95% and C4.5 can provide a rule set in a logical fashion that is convenient for clinical practice.

For the training set, the C4.5 algorithm provided 6 models composed of two different markers with 75–95% accuracy, which was higher than accuracy attained using any single marker. Of these, the two markers of ALP/CCA-CA provided diagnostic power better than those of other multiple markers and much better than any single marker. The diagnostic power of the two marker set was validated in the testing set.

In this study CCA-CA and ALP is indicated as the signature of CCA. This signature originated from general serum biomarkers and is particularly suitable for clinical use. Its rationale is based on the following

Table 4
Classification performance of ANN.

Input markers	Classification performance of ANN				
	SEN	SPEC	PPV	NPV	ACC
CCA-CA, ALP	98.71 ± 0.54	96.94 ± 0.92	97.27 ± 0.77	98.73 ± 0.54	97.84 ± 0.53

SEN = sensitivity; SPEC = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ACC = accuracy.

Please cite this article as: Pattanapairoj S, et al, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin Biochem (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022

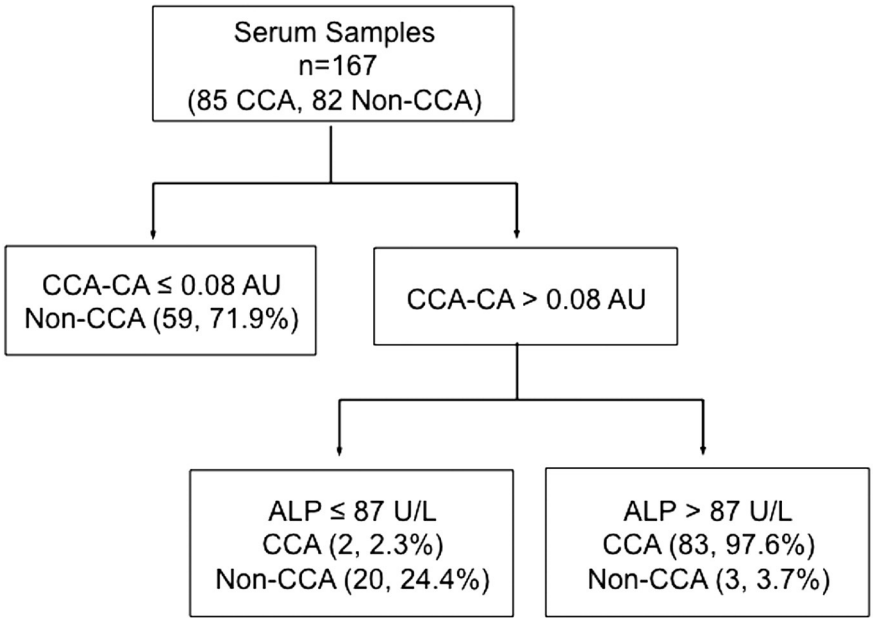


Fig. 2. Tree diagram suggesting the combined measurement of CCA-CA and ALP for CCA diagnosis. Subjects were classified as CCA or non-CCA using tree diagram based on a C4.5 model. CCA-CA was first used to discriminate non-CCA subjects. Subjects with CCA-CA level lower than 0.08 AU were classified as non-CCA. Subjects with CCA-CA level >0.08 AU were classified as CCA if serum ALP >87 U/L and as non-CCA if serum ALP ≤87 U/L.

evidence. Firstly, CCA-CA is viewed as the most effective serum biomarker in CCA [5]. It greatly reflects tumor burden more than other markers tested in this study. The value of CCA-CA (formerly reported as S121-reactive antigen) is emphasized by our finding that it could be detected in CCA patient sera with high sensitivity and specificity. Secondly, it was proved to originate from CCA tissues, and thirdly, the level in serum was decreased after tumor removal. For ALP, although its biological role has not been identified, it is generally used as an indicator of hepatobiliary disease. An elevated level of serum ALP has been shown in choledocholithiasis [25], bile duct strictures [26], and malignancy of intrahepatic bile ducts [27]. In the present study, among eight markers tested, CCA-CA provided the highest sensitivity and accuracy, whereas ALP provided moderate results for all diagnostic parameters.

The present study shows that combined analysis of the existing single markers seems to be an effective strategy for enhancing the values of these markers for CCA diagnosis. Mathematic algorithms have been widely used for mining the data obtained from common-tumor marker measurements and creating the combined diagnostic models or equations for diagnosis of the diseases [12–14]. The use of combined serum CA19-9/CEA to improve the diagnosis of CCA has previously been reported [28–30]. A combinatorial CA19-9/CEA index has raised the sensitivity to 66% and specificity to 100% of CCA diagnosis compared with individual analysis (60% SEN and 91% SPEC for CEA; 53% SEN and 86% SPEC for CA19-9) [30]. Another report by Qin et al. 2004 showed that SPEC of CCA diagnosis was raised up to 86.9% when the combination of CA19-9 (>37 U/mL) and CEA (>2.5 ng/mL) was used, compared with single marker analysis [28].

Based on our data, using the combination between CCA-CA and ALP through C4.5 is the most powerful model for discriminating CCA patients from controls with 95.76% SEN and 94.63% SPEC. The impact of CCA-CA/ALP combination in CCA diagnosis was emphasized by the analysis using ANN, which gives 98.7% SEN and 96.9% SPEC. On the other hand, we are also aware of the possible limitation of our study, as the vast majority of CCA cases in this study are secondary to parasitic (*O. viverrini*) infection and may not fully reflect the variable risk factors inducing the cholangiocyte neoplastic transformation in other area. In addition, one would apply this tree diagram with caution as it needs a larger set of tested subjects to ensure the power of analysis before using in the clinical practice. Decision tree algorithms also are clinically useful in prognostic perspectives. As they construct groups based on simple combinations of clinical characteristics, thus it has been applied for separating patients with different prognoses for survival into subgroups in many cancers [31–34].

When the sample size is small, the decision tree model may not be trained to gain maximum performance as desired and simultaneously the performance on the validation set may not reflect performance on the "unseen data". To overcome this occurrence, cross validation and bootstrap methods have been shown to be the effective tools to estimate the prediction performance under sparse data conditions [35]. It is well known that the cross validation method provides reasonable accuracy in estimating the classification performance with a compromised computation effort. In the current study, the k-fold cross validation was selected as the validation method. By setting $k = 5$, one application and five validation models were built. The application model was constructed using all the available data to diagnose the CCA patients, and the model was trained to have maximum performance as desired. To construct the validation models, the data set was randomly partitioned into five sets. The four sets were used to train one of the validation models and the remaining set was used to test that model. This process was repeated until five test sets were selected and performance of the five validation models was evaluated. Finally, classification performance (confusion matrix) based on the five-fold cross validation was computed using the average performance of the five validation models. As the consequent, the best model or the combination of biomarkers created in the present study is reliable and reasonably accurate.

In conclusion, our study shows the potency of using combined-marker analysis for CCA diagnosis. The C4.5 decision tree algorithm suggested several models of marker combinations with greater discriminatory power than those currently used in clinical practice. The set of two markers, CCA-CA and ALP, effectively discriminates CCA patients from non-CCA subjects with more than 95% of SEN and SPEC. The resulting data suggest that the combined measure of CCA-CA and ALP is useful for diagnosis of CCA.

Declaration of interest

None.

Please cite this article as: Pattanapairoj S, et al, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin Biochem (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022

ARTICLE IN PRESS

Acknowledgments

This work was supported by the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham (RTA5780012) and the Higher Education Research Promotion, NRU Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the SHeP-GMS, Khon Kaen University. We would like to thank Justin Reese and Paul Ellams for editing the English in this manuscript via the Faculty of Medicine Publication Clinic, Khon Kaen University, Thailand.

References

[1] Shin HR, Oh JK, Masuyer E, Curado MP, Bouvard V, Fang Y, et al. Comparison of incidence of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma—focus on east and south-eastern Asia. Asian Pac J Cancer Prev 2010;11:1159–66.
[2] The Bureau of Policy and Strategy MoPh, Thailand. Public health statistic 2010; 2010.
[3] Bhudhisawasdi V, Muisuk K, Areejitranusorn P, Kularbkaew C, Khampitak T, Saeseow OT, et al. Clinical value of biliary alkaline phosphatase in non-jaundiced cholangiocarcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2004;130:87–92.
[4] Bamrungphon W, Prempracha N, Bunchu N, Rangdaeng S, Sandhu T, Srisukho S, et al. A new mucin antibody/enzyme-linked lectin-sandwich assay of serum MUC5AC mucin for the diagnosis of cholangiocarcinoma. Cancer Lett 2007;247:301–8.
[5] Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu Y, Kuwahara K, et al. A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. Cancer 2011;117:3393–403.
[6] Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, et al. Ca-s27: a novel lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. Cancer Sci 2013;104:1278–84.
[7] Uenishi T, Yamazaki O, Tanaka H, Takemura S, Yamamoto T, Tanaka S, et al. Serum cytokeratin 19 fragment (cyfra21-1) as a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. Ann Surg Oncol 2008;15:583–9.
[8] Uenishi T, Kubo S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Yamamoto T, et al. Cytokeratin-19 fragments in serum (cyfra 21-1) as a marker in primary liver cancer. Br J Cancer 2003;88:1894–9.
[9] Watanabe H, Enjoji M, Nakashima M, Noguchi K, Kinukawa N, Sugimoto R, et al. Clinical significance of serum RCAS1 levels detected by monoclonal antibody 22-1-1 in patients with cholangiocellular carcinoma. J Hepatol 2003;39:559–63.
[10] Li YG, Zhang N. Clinical significance of serum tumour m2-pk and ca19-9 detection in the diagnosis of cholangiocarcinoma. Dig Liver Dis 2009;41:605–8.
[11] Wongkham S, Silsirivanit A. State of serum markers for detection of cholangiocarcinoma. Asian Pac J Cancer Prev 2012;13(Suppl.):17–27.
[12] Wang J, Li M, Hu YT, Zhu Y. Comparison of hospital charge prediction models for gastric cancer patients: neural network vs. decision tree models. BMC Health Serv Res 2009;9:161.
[13] Malehi AS. Diagnostic classification scheme in Iranian breast cancer patients using a decision tree. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:5593–6.
[14] Yang Y, Chen H, Wang D, Luo W, Zhu B, Zhang Z. Diagnosis of pancreatic carcinoma based on combined measurement of multiple serum tumor markers using artificial neural network analysis. Chin Med J (Engl) 2014;127:1891–6.
[15] Chiang H-J, Tseng C-C, Torng C-C. A retrospective analysis of prognostic indicators in dental implant therapy using the C5.0 decision tree algorithm. J Dent Sci Res 2013;8:248–55.
[16] Vadivel A, Surendiran B. A fuzzy rule-based approach for characterization of mammogram masses into bi-rads shape categories. Comput Biol Med 2013;43:259–67.
[17] Esch T, Metz A, Marconcini M, Keil M. Combined use of multi-seasonal high and medium resolution satellite imagery for parcel-related mapping of cropland and grassland. Int J Environ Health Res 2014;28:230–7.
[18] Mistikoglu G, Gerek IH, Erdis E, Mumtaz Usmen PE, Cakan H, Kazan EE. Decision tree analysis of construction fall accidents involving roofers. Expert Syst Appl 2015;42:2256–63.
[19] Pang S-l, Gong J-z. C5.0 classification algorithm and application on individual credit evaluation of banks. Syst Eng Theory Pract 2009;29:94–104.
[20] Quinlan JR. C4.5: programs for machine learning. Morgan Kaufmann Publishers Inc.; 1993
[21] Duda R, Hart P, Stork D. Pattern classification. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 2001.
[22] Smith DR. Top-down synthesis of divide-and-conquer algorithms. Artif Intell 1985;27:43–96.
[23] Rumelhart DE, Hinton GE, Williams RJ. Learning representations by back-propagating errors. Nature 1986;323:533–6.
[24] Mark H, Eibe F, Geoffrey H, Bernhard P, Peter R, Ian HW. The WEKA data mining software: an update. ACM 2009:10–8.
[25] Pereira-Lima JC, Jakobs R, Busnello JV, Benz C, Blaya C, Riemann JF. The role of serum liver enzymes in the diagnosis of choledocholithiasis. Hepatogastroenterology 2000;47:1522–5.
[26] Bain VG, Abraham N, Jhangri GS, Alexander TW, Henning RC, Hoskinson ME, et al. Prospective study of biliary strictures to determine the predictors of malignancy. Canadian journal of gastroenterology. Can J Gastroenterol 2000;14:397–402.
[27] Alvaro D, Benedetti A, Marucci L, Delle Monache M, Monterubbianesi R, Di Cosimo E, et al. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. Hepatology (Baltimore Md) 2000;32:174–84.
[28] Qin XL, Wang ZR, Shi JS, Lu M, Wang L, He QR. Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. World J Gastroenterol 2004;10:427–32.
[29] Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. Eur J Surg Oncol 2005;31:164–9.
[30] Ramage JK, Donaghy A, Farrant JM, Iorns R, Williams R. Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. Gastroenterology 1995;108:865–9.
[31] Kenneth RH, Abbruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL. Classification and regression tree analysis of 1000 consecutive patients with unknown primary carcinoma. Clin Cancer Res 1999;5:3403–10.
[32] Allgayer H, Boyd DD, Heiss MM, Abdalla EK, Curley SA, Gallick GE. Activation of Src kinase in the primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. Cancer 2002;94:344–51.
[33] Ture M, Tokatli F, Kurt Omurlu I. The comparisons of prognostic indexes using data mining techniques and Cox regression analysis in the breast cancer data. Expert Syst Appl 2009;36:8247–54.
[34] Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. Neuro Oncol 2004;6:227–35.
[35] Twomey JM, Smith AE. Bias and variance of validation methods for function approximation neural networks under conditions of sparse data. IEEE Trans Syst Man Cybern Part C Appl Rev 1998;28:417–30.

Please cite this article as: Pattanapairoj S, et al, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin Biochem (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.022

RESEARCH ARTICLE

Novel Mutations in Cholangiocarcinoma with Low Frequencies Revealed by Whole Mitochondrial Genome Sequencing

Kanha Muisuk[1,2,3], Atit Silsirivanit[1,3], Kanokwan Imtawil[1], Suphawadee Bunthot[1], Ake Pukhem[3,4], Chawalit Pairojkul[3,5], Sopit Wongkham[1,3], Chaisiri Wongkham[1,3]*

Abstract

Background: Mitochondrial DNA (mtDNA) mutations have been shown to be associated with cancer. This study explored whether mtDNA mutations enhance cholangiocarcinoma (CCA) development in individuals. Materials and Methods: The whole mitochondrial genome sequences of 25 CCA patient tissues were determined and compared to those of white blood cells from the corresponding individuals and 12 healthy controls. The mitochondrial genome was amplified using primers from Mitoseq and compared with the Cambridge Reference Sequence. Results: A total of 161 mutations were identified in CCA tissues and the corresponding white blood cells, indicating germline origins. Sixty-five (40%) were new. Nine mutations, representing those most frequently observed in CCA were tested on the larger cohort of 60 CCA patients and 55 controls. Similar occurrence frequencies were observed in both groups. Conclusions: While the correspondence between the cancer and mitochondrial genome mutation was low, it is of interest to explore the functions of the missense mutations in a larger cohort, given the possibility of targeting mitochondria for cancer markers and therapy in the future.

Keywords: Biliary cancer - bile duct cancer - mitochondrial mutation - mitochondrial genome

Asian Pac J Cancer Prev, **16 (5)**, 1737-1742

Introduction

Mitochondria are the organelles that play many important roles including the generation of ATP, production of reactive oxygen species (ROS), and initiation and execution of apoptosis (Kim et al., 2006, Fogg et al., 2011). The human mitochondrial DNA (mtDNA) contains 37 genes that express 13 messenger RNA (mRNA), two ribosomal RNAs (rRNA) and 22 transfer RNAs (tRNA) (Anderson et al., 1981). The 13 polypeptides products make up the subunits of several enzyme complexes necessary for respiratory and oxidative phosphorylation (DiMauro and Schon, 2003). Although the number is small, these polypeptides are essential for the proper assembly and activity of a large host of other enzyme complexes (Holt et al., 1990; Bai and Attardi, 1998; Radpour et al., 2009).

Cancer is considered to be a heterogeneous set of diverging molecular and cellular features. There has been an accumulation of evidences suggesting that the mitochondria plays a key role in cancer (reviewed in Chatterjee et al., 2006; Gaude and Frezza, 2014). Mutations to mitochondrial DNA may lead to mitochondrial dysfunction and the metabolic reprogramming of cancer cells leading to the modulation in cellular processes involved in the initiation and progression of cancer. Several somatic and germline mtDNA mutations have been identified in the coding and non-coding regions in various types of human cancers (reviewed in Chatterjee et al., 2006, Brandon et al., 2006). Recently, whole genome analysis of mtDNA also revealed mutations in various cancers including breast cancer, colorectal cancer, gastric cancer and hepatocellular carcinoma (Ma et al., 2010; Hung et al., 2010; Yin et al., 2010).

Cholangiocarcinoma (CCA) is rare worldwide but the incidence is high in the Northeast Thailand. Chronic inflammation of biliary tract is known to be the underlined the pathogenesis of CCA. A meta-analysis of population based studies showed that patients with inflammatory bowel diseases e.g., Crohn's disease and ulcerative colitis, had an increased risk of CCA (Huai et al., 2014). The etiological and epidemiological studies of CCA in Thailand link CCA to parasitic infections of the liver flukes *Opisthorchis viverrini* (OV) [reviewed in (Sripa and Pairojkul, 2008)]. However, only 0.5-1% of OV-infected individuals develop CCA (Mairiang et al., 2006). The results suggest other factors that promote patho- and tumorigenesis in OV-infected individuals. Recently, the polymorphisms of IL-6 receptor (Prayong et al., 2014) and the NRF2 rs6726395 (Khunluck et al.,

*[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Forensic Medicine, [3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, [4]Department of Surgery, [5]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand *For correspondence: chaisiri@kku.ac.th*

2014) were shown to be related to OV-associated CCA. However, the mitochondrial mutation in CCA has, to our best knowledge, not been studied.

In the present study, we determined the association between mtDNA mutations and carcinogenesis and pathogenesis of CCA. Whole mitochondrial genome of CCA patient tissues and corresponding white blood cells were sequenced and compared to the white blood cells from healthy controls. Several new mtDNA mutations found only in CCA patients were addressed.

Materials and Methods

Tissues and white blood cells

Formalin fixed paraffin embedding (FFPE) tissues (n=25) and white blood cells (WBC) of CCA patients (n=60) were obtained from the biobank of Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. All CCA tissues were histologically verified. Blood were collected from healthy subjects (n=55) who were Northeastern Thai residences with written informed consent. The ethic committee for human research of Khon Kaen University approved the protocol of study.

DNA extraction

CCA cells from the FFPE tissue slides were located and micro-dissected. At least 1,000 cells were collected for DNA extraction. Dissected CCA cells, (with RNAase-treated) by the QIAampFFPE tissue DNA Micro kit (QIAGEN, Germany) according to the instruction of the manufacturer. The extracted DNA were kept in acetate-EDTA buffer at -20°C until analysis.

Amplification reaction and amplicon cleaned-up

The complete human mitochondrial genomes were amplified (singleplex reactions, mitoSEQr™) with 46 pairs of primers which generated 46 overlapping fragments covering the whole mitochondrial genome. Amplification reactions were carried out on a GeneAmp 9700 Thermal cycler (ABI) according to the standard protocol. All amplicons gaving positive results were cleaned-up to remove excess primers and dNTPs with 2 μl of ExoSAP-IT (USB Corporation) at 37°C for 30 min and heat inactivation at 80°C for 15 min, and kept on ice immediately.

The sequencing reaction and automate sequencing run

Both forward and reverse sequencing were carried out using BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing reaction kit (Applied Biosystems, USA) according to the standard protocol. Sequencing reaction products were purified from residual dye terminator using EDTA/ethanol precipitation. The final residue was resuspended with 12 μl Hi-Di formamide for electrophoresis. Electrophoresis was performed on the Genetic Analyzer ABI 3130 (Applied Biosystems, USA) using POP6 and a 36 cm array. The run module conditions were as follows: oven temperature: 60°C, injection polymer 20 μl/cap, electrophoresis (EP) voltage: 15 kV, EP current: 34 μA, and Laser power: 15 mW.

Data analysis of mtDNA mutations

All mtDNA sequencing data were assembled using SeqScape® software v2.6 (Applied Biosystem, USA), and mtDNA mutations were identified using Cambridge Reference Sequence (MITOMAP). Sequencing reactions were repeated for any reaction with unassembled sequencing data.

Statistical analysis

Statistical calculation was performed using SPSS 16.0 Windows Evaluation software (SPSS Inc. Chicago, IL). The Chi square (x^2)-test was used for comparison between two groups. Statistical significance was established at $p<0.05$.

Results

There were 60 CCA patients (38 males and 22 females, age ranged 44-76 years) and 55 healthy controls (30 males and 25 females, age ranged 19-73 years) included in this study. Whole mtDNA sequencings were performed on a pilot set of 25 CCA patient tissues and paired white blood cells. Similar sequencing was also performed in white blood cells of 12 controls.

All mtDNA mutations identified in CCA patient tissues were substitution of single point mutations and germline origins

A total of 161 mutations were found in CCA tissues ranging from 6-25 mutations per individual (Figure 1A). All mutations were substitutions of single points corresponding to 7 transversions (4.3%) and 154 transitions (95.6%). Of 161 mutations, 103 were silent (64%) and 58 were missense (36%) (Table 1). The most frequent mutation found in the 13 mitochondria encoded genes was on ND5 of complex I, and the least frequent mutation was on ATP8.

To investigate whether the mtDNA mutation found in CCA was of somatic or germline origins, the whole mitochondrial genomes of the matched white blood cells were determined and analyzed in a similar manner. O f 25 CCA cases, the mutation patterns observed in individual tumor tissue and white blood cells were identical (data not shown). This result confirms the germline origin of the mutations in the CCA tissues.

Numerous new mutations were determined in mtDNA from CCA patients

The association of the mtDNA mutations found in CCA patients with the disease was further explored. To this end, whole mitochondrial genome of white blood cells from 12 healthy persons were analyzed. There were 101 mutations with between 8 and 23 mutations per individual (Figure 1B). Of the total 74 were silent (73%) and 27 were missense (27%). The mutations detected in CCA patients and healthy subjects were compared (Figure 2). Of the total 262 mutations, 61 mutations were commonly found in both groups, 100 mutations were found only in CCA patients and 40 mutations were found only in healthy persons (Figure 2A). Of the 161 mutations found in CCA patients, 96 (60%) mutations were previously reported,

Table 1. Number of Total, Silent and Missense Mutations found in Mitochondrial Genes

mt DNA gene	CCA patients (n = 25)			Healthy subjects (n=12)		
	Total	silent	missense	Total	silent	missense
Complex I						
ND1	18	10	8	10	7	3
ND2	11	8	3	10	7	3
ND3	9	6	3	8	7	1
ND4	6	5	1	7	5	2
ND4L	4	2	2	0	0	0
ND5	25	13	12	18	9	9
ND6	8	0	8	4	1	3
Complex III						
Cyt b	19	13	6	9	8	1
Complex IV						
CO I	17	16	1	13	13	0
CO II	15	12	3	9	8	1
CO III	10	9	1	7	6	1
Complex V						
ATP6	16	7	9	6	3	3
ATP8	3	2	1	0	0	0
Total	161	103	58	101	74	27
%	100	64	36	100	73.3	26.7

Table 2. mtDNA Mutations Found Only in CCA Patients

mt gene	NT position	AA change	CCA	
			n=25	%
Previously reported				
ND4L	T10609C	I → T	2	8
Cyt b	G15346A	silent	4	16
ND2	A5351G	silent	3	12
ND2	T5465C	silent	2	8
ND3	T10238C	silent	2	8
ND5	G12630A	silent	2	8
CO III	T9716C	silent	2	8
ATP6	G9123A	silent	2	8
New mutation				
ND6	A14209G	N → D	3	12
ND5	A12361G	T → A	2	8
ND5	T14088C	silent	3	12
CO II	C8215T	silent	3	12
Cyt b	C15508T	silent	2	8
CO I	C6482T	silent	2	8
CO III	C9968T	silent	2	8

NT=nucleotide; AA, amino acid

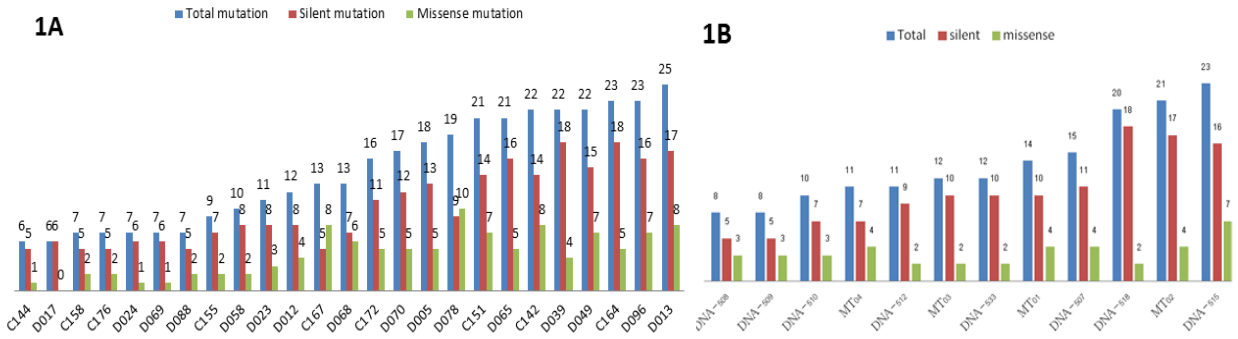


Figure 1. Number and Type of mtDNA Mutations Identified in Individual Subjects. A) Whole mtDNA sequence was determined in tumor tissues from 25 CCA patients. Similar mutations were found in tumor tissues and white blood cells from individual CCA patient. B) Whole mtDNA sequence was determined in white blood cells from 12 healthy subjects

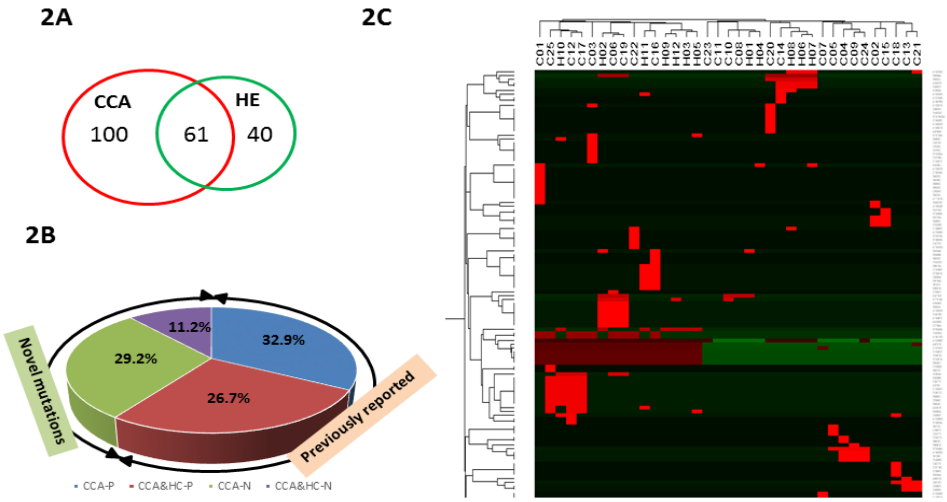


Figure 2. Cluster Analysis of mtDNA Mutations Found in CCA Patients and Healthy Persons. A) Mutations found both in CCA patients and healthy subjects (HE). B) Novel mutations were found in CCA patients. C) Total mtDNA mutations found analyzed using cluster analysis. Red square indicates the common mutations found in CCA patients and healthy subjects. red=mutation; green=normal

of which 43 (27%) mutations were also found in healthy controls (Figure 2B). The mutations that were not matched to those reported in MITOMAP database were classified as new mutations. Based on this definition, there were 65 (40%) determined, of which 47 (29%) only in CCA patients (Table 2) and 18 (11%) in healthy subjects.

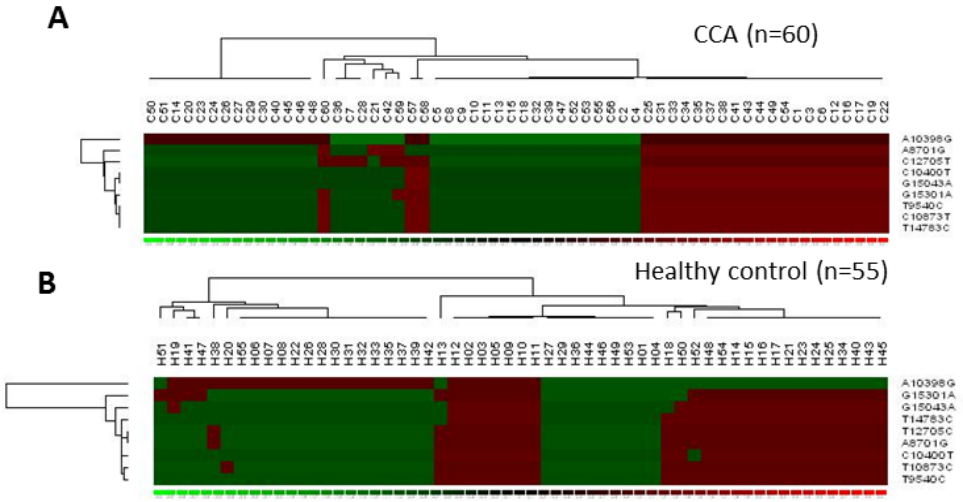


Figure 3. The Unsupervised Cluster Analysis for Association of mtDNA Mutations and CCA. The mtDNA mutations with high frequencies were analyzed in 60 CCA and 55 healthy controls

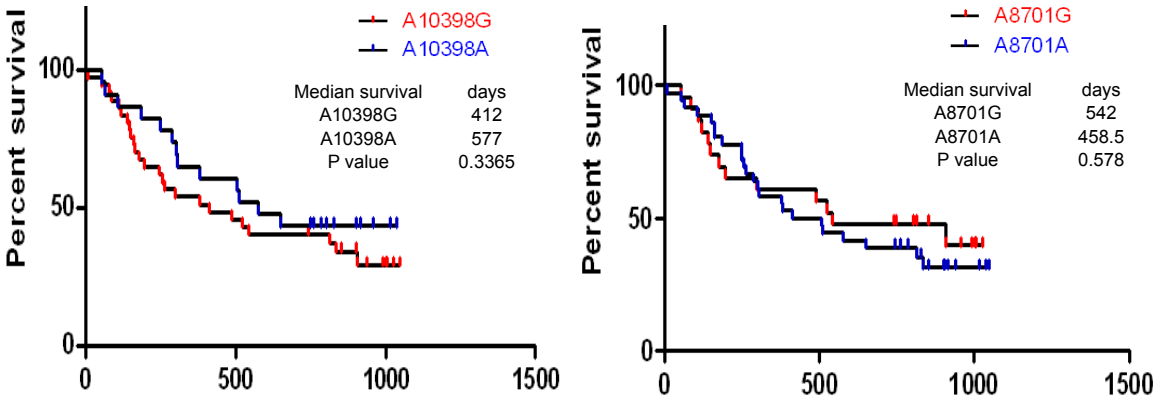


Figure 4. Survival Curves with Reference to mt DNA Mutations

High frequent mutations found in CCA patients were commonly found in healthy persons

Unsupervised cluster analysis of mtDNA mutations of 25 CCA patients and 12 healthy persons is shown in Figure 2C. There was no unique mutation pattern which differentiated CCA patients from healthy persons. However, there were 9 mutations with high frequency observed in CCA subjects-A8701G (A→T), T9540C, A10398G (T→A), C10400T; T10873C, C12705T, T14783C, G15043A and G15301A, respectively. To determine the association of these mtDNA mutations with CCA, these mutations were examined in white blood cells from a larger size (additional to the pilot set) to yield a total of 60 CCA cases and 55 healthy subjects. The unsupervised cluster analysis revealed these mutations in CCA were 36-46% and in healthy subjects were 43-49% (Figure 3).

mtDNA mutations and clinical presentations of CCA

To explore the association between mtDNA mutations and the clinical presentations of CCA patients, the number and position of mtDNA mutations found in individual CCA subjects were analyzed according to age, sex, histological type and metastasis status of the patients. Univariate analysis was determined using median of total mutation (≤15 *vs* >15) and median of missense mutation (≤4 *vs* >4) as cutting points. There were no significant correlations found between mtDNA mutations and clinical findings of CCA patients.

To examine whether the missense mutations (A10938G and A8701G) associated with the clinicopathology of disease and affected the patient survival, the survival analysis between patients who carried these mutations were analyzed versus those who had no those mutations. As shown in Figure 4, patients with mutation of A10938G exhibited trend of having shorter survival than those without mutation, however, this observation was not statistically significant.

Discussion

The observations of Otto Warburg on aerobic glycolysis or the "Warburg effect" has initiated and challenged the study of mitochondria in cancer etiology and carcinogenesis. In the present study, the whole mitochondrial genome from tumor tissues and corresponding white blood cells from a pilot set of 25 CCA patients revealed numerous mtDNA mutations in CCA patients, all of which were substitution of single point mutations and germline origins. The whole mitochondrial genomes from white blood cells of 12 healthy persons were compared to reveal any pathogenic mtDNA mutations associated with CCA. A subset of nine mutations, representing the most frequently observed in

CCA group, were tested on the larger cohort involving 60 CCA patients and 55 controls. These mutations were observed in both groups with similar frequencies.

Cancer mtDNA mutations could either arise in the female germ line and predispose to cancer called-oncogenic germline mutation or arise in the mtDNA of the tissues and participate in the tumor progression process called-tumor-specific somatic mutations. Both germline and somatic mutations of mtDNA were reported for many cancers (reviewed in Chatterjee et al., 2006, Brandon et al., 2006). Many of those resulted in changing of amino acid (missense mutation) in the complex enzymes with predicted defect in their functions. In the current study, the whole mtDNA genome analysis revealed numerous new mtDNA mutations in tumor tissues from CCA patients, however, they were all germline mutations as they were also detected in the corresponding white blood cells.

There are three germline mtDNA mutation associated with cancer risks reported so far. The variant occurring in the ND3 gene (A10398G) was linked to increase risk for invasive breast cancer (Canter et al., 2005), while that on the D-Loop (T16189C) was associated with endometrial cancer (Liu et al., 2001), and the mtDNA COI gene variants were associated with prostate cancer (Tan et al., 2002; Herrmann et al., 2003; Krieg et al., 2004; Petros et al., 2005). To determine the significance of mtDNA mutations found in CCA patients, the whole mitochondrial genome sequences from CCA patients and those of white blood cells from the healthy controls were compared. Approximately one-third of mtDNA mutations found in CCA patients were also detected in the controls. Similar frequencies of the missense mutations were detected in both groups (36% in CCA *vs*. 26.7% in the controls; p=0.097). The nine most frequently observed mutations in the CCA group (32-44%)-A8701G (A→T), T9540C, A10398G (T→A), C10400T, T10873C, C12705T, T14783C, G15043A and G15301A-were determined in a larger joined cohort of total 60 CCA cases and 55 controls to determine the association of these mutations with CCA. As these mutations were also found in the controls with similar frequency, these mutations are probably the polymorphism of the Northeast Thais and may not associate with the disease.

In contrast to the present study, various somatic mutations ranging from 25 to 60% have been reported in mitochondrial coding regions in many cancers (Liu et al., 2003; Abu-Amero et al., 2005; Yin et al., 2010). The variant A10398G in the ND3 gene was reported as somatic mtDNA mutation in cancers of breast, colorectal and prostate (Canter et al., 2005; Zhu et al., 2005; Allalunis-Turner et al., 2006), while the variant A8701G in the ATP6 gene was identified as somatic mtDNA mutation in the cancers of breast and thyroid (Tan et al., 2002; Abu-Amero et al., 2005). It should be noted here that these variants were also found in CCA patients but as germline mutation with 40% (24/60) frequency.

There were 65 new mutations revealed from the present study, of these 37% (24/65) were missense mutation and 63% (41/65) were silent mutations. The highest frequency of mtDNA mutations was found in Complex I. Complex I is the first site of the electron transport chain and active site of reactive oxygen species production. The contribution of Complex I mutations to cancer largely due to the corresponding bioenergetics dysfunction that they cause. Mutations in mitochondrial genes encoding for Complex I have been linked to the development of several cancers (reviewed in Chatterjee et al., 2006).

To determine the influence of the mtDNA mutations in CCA, univariate analysis was performed in 25 CCA cases with sex, age, histological type and metastasis status of the patients. There was no significant correlation between the number of total mutations or missense mutations and clinical findings of the patients. This negative finding may be due to the small sample size. Likewise, the analysis should be done in a particular mutation rather than combined mutations as a whole.

In conclusion, the whole mitochondrial genome sequencing of CCA patient tissues and white blood cells were analyzed in comparison to those of white blood cells from healthy persons. There were 161 mutations found in CCA patients with 65 are new mutations. All mtDNA mutations found in CCA were substitution of point mutation with germline origin. Although, there is no direct association between mtDNA mutations and CCA observed in this study, it is the first mtDNA analysis reported in CCA. As the associations of mitochondria and cancer are collectively reported, it is of interest to explore the functions of the missense mutations reported in this study in a larger cohort. This may lead to the possibility of targeting mitochondria for cancer marker and therapy in the future.

Acknowledgements

This study was supported by Research grants from Khon Kaen University and the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Health cluster (SHeP-GMS) and the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund (RTA5780012). We would like to thank Prof. Patcharee Lertrit, Faculty of Medicine, Siriraj hospital, Mahidol University, Thailand for her valuable criticism and Prof. Carlito B. Lebrilla, University of California Davis, USA for his comment and the English presentation of this manuscript.

References

Abu-Amero KK, Alzahrani AS, Zou M, Shi Y. (2005). High frequency of somatic mitochondrial DNA mutations in human thyroid carcinomas and complex I respiratory defect in thyroid cancer cell lines. *Oncogene*, **24**, 1455-60.

Allalunis-Turner J, Ma I, Hanson J, Pearcey RG. (2006). mtDNA mutations in invasive cervix tumors: a retrospective analysis. *Cancer lett*, **243**, 193-201.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-65.

Bai Y, Attardi G. (1998). The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *EMBO J*, **17**, 4848-58.

Brandon M, Baldi P, Wallace DC. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, **25**, 4647-62.
Canter JA, Kallianpur AR, Parl FF, Millikan RC. (2005). Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. *Cancer Res*, **65**, 8028-33.
Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, **25**, 4663-74.
DiMauro S, Schon EA. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Eng J Med, 348,2656-68.
Fogg VC, Lanning NJ, Mackeigan JP. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer*, **30**, 526-39.
Gaude E, Frezza C. (2014). Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Met*, **2**, 10.
Herrmann PC, Gillespie JW, Charboneau L, et al. (2003). Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics*, **3**, 1801-10.
Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Gen*, **46**, 428-33.
Huai JP, Ding J, Ye XH, Chen YP. (2014). Inflammatory bowel disease and risk of cholangiocarcinoma: evidence from a meta-analysis of population-based studies. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 3477-82.
Hung WY, Wu CW, Yin PH, et al. (2010). Somatic mutations in mitochondrial genome and their potential roles in the progression of human gastric cancer. *Biochi Biophys Acta*, **1800**, 264-70.
Khunluck T, Kukongviriyapan V, Puapairoj A, et al (2014). Association of NRF2 polymorphism with cholangiocarcinoma prognosis in Thai patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 299-304.
Kim R, Emi M, Tanabe K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemo Pharmacol*, **57**, 545-53.
Krieg RC, Knuechel R, Schiffmann E, et al. (2004). Mitochondrial proteome: cancer-altered metabolism associated with cytochrome c oxidase subunit level variation. *Proteomics*, **4**, 2789-95.
Liu VW, Shi HH, Cheung AN, et al. (2001). High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res*, **61**, 5998-6001.
Liu VW, Yang HJ, Wang Y, et al. (2003). High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Brit J Cancer*, **89**, 697-701.
Ma Y, Bai RK, Trieu R, Wong LJ. (2010). Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic β-Cell Mass in Adult Wistar Rats

Piyanard Boonnate[1], Sakda Waraasawapati[2], Wiphawi Hipkaeo[3], Supattra Pethlert[1], Amod Sharma[1], Carlo Selmi[4,5], Vitoon Prasongwattana[1], Ubon Cha'on[1]*

1 Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, **2** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, **3** Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, **4** Rheumatology and Clinical Immunology, Humanitas Clinical and Research Center, Milan, Italy, **5** Rheumatology, Allergy, and Clinical Immunology, University of California Davis, Davis, California, United States of America

* ubocha@kku.ac.th

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Boonnate P, Waraasawapati S, Hipkaeo W, Pethlert S, Sharma A, Selmi C, et al. (2015) Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic β-Cell Mass in Adult Wistar Rats. PLoS ONE 10(6): e0131595. doi:10.1371/journal.pone.0131595

Editor: Claudia Miele, Consiglio Nazionale delle Ricerche, ITALY

Received: June 23, 2014

Accepted: June 3, 2015

Published: June 29, 2015

Copyright: © 2015 Boonnate et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available within the paper.

Funding: This work was supported by The Research and Technology affairs division, Khon Kaen University, Incubation research project (UC), MIH-2554-M-11, NRU-KKU (UC, PB) and Invitation Research Fund from the Faculty of Medicine (I55227; UC, PB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

The amount of dietary monosodium glutamate (MSG) is increasing worldwide, in parallel with the epidemics of metabolic syndrome. Parenteral administration of MSG to rodents induces obesity, hyperglycemia, hyperlipidemia, insulin resistance, and type 2 diabetes. However, the impact of dietary MSG is still being debated. We investigated the morphological and functional effects of prolonged MSG consumption on rat glucose metabolism and on pancreatic islet histology.

Methods

Eighty adult male Wistar rats were randomly subdivided into 4 groups, and test rats in each group were supplemented with MSG for a different duration (1, 3, 6, or 9 months, n=20 for each group). All rats were fed *ad libitum* with a standard rat chow and water. Ten test rats in each group were provided MSG 2 mg/g body weight/day in drinking water and the 10 remaining rats in each group served as non-MSG treated controls. Oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed and serum insulin measured at 9 months. Animals were sacrificed at 1, 3, 6, or 9 months to examine the histopathology of pancreatic islets.

Results

MSG-treated rats had significantly lower pancreatic β-cell mass at 1, 6 and 9 months of study. Islet hemorrhages increased with age in all groups and fibrosis was significantly more frequent in MSG-treated rats at 1 and 3 months. Serum insulin levels and glucose tolerance in MSG-treated and untreated rats were similar at all time points we investigated.

Conclusion

Daily MSG dietary consumption was associated with reduced pancreatic β-cell mass and enhanced hemorrhages and fibrosis, but did not affect glucose homeostasis. We speculate

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

that high dietary MSG intake may exert a negative effect on the pancreas and such effect might become functionally significant in the presence or susceptibility to diabetes or NaCl; future experiments will take these crucial cofactors into account.

Introduction

Monosodium glutamate (MSG), a sodium salt of glutamic acid, is used as a flavor enhancer in food industry [1]. While the Food and Drug Administration (FDA) stated that MSG is safe as a flavor enhancer, its safety as a food additive remains debated. Epidemiological studies from our group and others reported the association of dietary MSG consumption with metabolic disorders such as obesity or above average weight [2, 3], arterial hypertension [4] and metabolic syndrome [5], while others reported the lack of such associations [6, 7]. Nonetheless, consistent metabolic effects of MSG have been demonstrated in animal studies. First, subcutaneous (SC) MSG injections (2mg/g body weight) given to newborn mice result in central obesity and moderate to severe microvesicular fatty changes throughout the liver parenchyma at 6 months [8]. Second, the same dose causes the elevation of fasting blood glucose levels and ultimately type 2 diabetes [9]. Third, higher doses of parenteral MSG (4 mg/g body weight) in mice cause insulin resistance as illustrated by the significant increase in plasma glucose following the oral glucose tolerance test (OGTT) and severe visceral fat accumulation [10]. Pathology in these models showed pancreatic islets hypertrophy [9], hyperplasia [11]and decreased α-, and somatostatin cells [12].

Despite these lines of evidence, the effects of dietary consumption of MSG are less clear, particularly the effect on pancreas histology in which numerous factors have been widely investigated and should be taken into account [13, 14]. We therefore investigated the effects of oral MSG supplementation on the rat pancreatic islets. We demonstrated significant changes in the pancreas as early as after one month of MSG supplementation. These changes increased with longer MSG supplementation, albeit without observable functional consequences on glucose metabolism.

Materials and Methods

Animals

Eighty male Wistar rats (weight 150–200g) were obtained at 5 weeks of age from the National Laboratory Animal Center, Salaya, Mahidol University, Thailand. Rats were housed in light and temperature controlled environment at the Northeast Laboratory Animal Center (NELAC) for 1 week before starting the experiment.

All procedures were performed in accordance with the guidelines of the Northeast Laboratory Animal Center (NELAC), Khon Kaen University, Thailand, and were approved (AEKKU 24/2554) by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University, Thailand.

Experimental design

Rats were maintained under controlled laboratory conditions at the temperature of 25±3°C with 60±15% humidity and 12 h dark/light cycle. All rats were fed *ad libitum* with a standard rat chow pellet (Perfect Companion Group, Bangkok, Thailand) and provided drinking water purified by reverse osmosis (RO), either with or without MSG.

Eighty rats were randomly arrayed into four groups to be observed for1, 3, 6, or 9 months, with 20 rats in each group. Each group included control (n = 10) and MSG-treated (n = 10) rats. MSG-treated rats were supplemented with a commercially available 99%-pure food-grade package of MSG added to daily drinking water at the final daily dose of 2 mg/g body weight. Food intake and body weight were recorded every one and two weeks, respectively, and rats from different groups were sacrificed at 1, 3, 6, or 9 months following a 12-hour fasting by intraperitoneal Nembutal injection. Blood and pancreatic tissue were collected for functional and morphological study.

Histology and immunohistochemistry

The pancreas tail was cut and fixed with a 10% neutral buffered formalin solution. Routinely processed paraffin-embedded tissue blocks were sliced at 4 μm thickness and sections were stained with Haematoxylin&Eosin (H&E) and observed under a light microscope (Primo Star, Zeiss). Prussian blue and Masson's trichrome staining were used to determine hemosiderin deposition and fibrosis of the islets, respectively.

Immunohistochemistry was used to identify islets β-cells and 4-hydroxynonenal (4-HNE), respectively, using immunoperoxidase staining. Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and endogenous peroxidase and non-specific binding were blocked by 0.3% H_2O_2 in methanol and 3% bovine serum albumin (BSA), respectively. Sections were then incubated overnight at room temperature with a mouse monoclonal anti-insulin (dilution 1:4000, Sigma-Aldrich, USA) and a rabbit polyclonal anti-4-HNE (dilution 1:2000, Abcam, USA). The sections were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and incubated 1 h at room temperature with a goat anti-mouse IgG peroxidase antibody (dilution 1:250, Sigma-Aldrich, USA)or anti-rabbit envision$^+$ HRP (horse reddish peroxidase, Sigma-Aldrich, USA), washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and then stained with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, USA) plus a substrate buffer solution and hydrogen peroxide.

Numbers of islets, islets sizes (μm^2) and total pancreas areas (μm^2) in each section were measured by Aperio Image Scope software (version 12.0.1.5027). Islets and pancreatic tissue boundaries were marked manually and all islets composed of ≥ 4 cells were marked. Sizes of islets in the control groups were pooled and 5th, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th and 95th percentiles were calculated. The density of pancreatic islets (the number of islets per unit area mm^2) was calculated by the total number of islets divided by total area of pancreas in each slide, according to the following formula.

$$\text{Islets density} = \frac{\text{Total number of islets}}{\text{Total area of pancreas } (\text{mm}^2)}$$

The β-cells and 4-HNE of selected islets were analyzed by Aperio Image Scope software using Positive Pixel Count Algorithm (Version 9.1). The positive immunoreactivity, which produced brown color by DAB, was digitally expressed as yellow, orange and reddish-brown color pixels in the software correlated to weak, moderate, and strongly positive, respectively, and the negative immunoreactivity was expressed as blue color pixels. The percentage of β-cells and 4-HNE were calculated as the equation below.

$$\beta - \text{cell mass } (\%) = \frac{\text{Positive pixel count}}{\text{Total pixel count}} \times 100$$

$$4 - \text{HNE } (\%\text{ positivity}) = \frac{\text{Positive pixel count}}{\text{Total pixel count}} \times 100$$

Hemorrhage and fibrosis in pancreatic islets were observed in H&E slides then confirmed with special staining. Erythrocytes leaked from capillaries, brown pigments deposition in/around the islets and presence of hemosiderin were scored from mild to severe levels. The brown pigments were confirmed by the positive staining with Prussian blue. Fibrosis was confirmed and scored by Masson's trichrome staining. The severity of the lesions was scored for each islet. The incidence of hemorrhage/hemosiderin deposition and fibrosis in islets were calculated in each slide (20–200 islets/slide). The percentage of rats with an islet lesion was calculated by the number of rats with an islet lesion divided by the total number of rats in each group.

To evaluate the severity of the lesions of pancreatic islets, hemorrhage/hemosiderin staining and fibrosis were scored using the modified methods of Imaoka *et al*[15]. The scoring were then categorized into positive and negative categories (score 0 = negative, score 1–3 = positive). Percent incidence of hemorrhage, hemosiderin and fibrosis was calculated as the equation below.

$$\%\ \text{incidence of lesions} = \frac{\text{Number of islets with lesions}}{\text{Total number of islets}} \times 100$$

Insulin levels and oral glucose tolerance test (OGTT)

Insulin levels were determined at 1, 3, 6, and 9 months prior to sacrifice using radio immunoassay (RIA) kit following the manufacturer's protocol (Millipore, USA). OGTT were performed at 9 months. After12-h overnight fasting, a glucose solution (4 g/kg body weight) was fed to the rats. Blood samples were collected from the tail vein and glucose levels were measured at 0, 30 and 120 minutes after administration of glucose.

Statistical analyses

For statistical analyses, IBM SPSS statistics software ver.19.0.2 for Windows (KKU network license) was used. All variables are presented as mean ± SD except for insulin levels (mean ± SEM). Data between control and MSG-treated groups were compared by Student's *t*-test. *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Body weight, food and water intake

Body weight and food consumption were similar in MSG-treated and untreated control rats at 1, 3, 6 and 9 months (Fig 1A and 1B), while water intake was significantly higher in the MSG-treated groups compared to controls throughout the study period($P < 0.05$) (Fig 1C).

Pancreas histopathology

Hemorrhages in the pancreatic islets were observed in both control and MSG-supplemented groups in 4/10 and 7/10 rats at 1 month, 8/10 and 9/10at 3 months, 10/10 in both groups at 6 and 9 months, respectively (Fig 2). However, differences were not significant between the groups throughout the study period. Pancreatic islet fibrosis also increased with age in both groups but was more prominent in the MSG-treated group at 1 and 3 months of the study($P < 0.0001$) (Fig 3). The β-cell areas in the pancreatic islets were significantly lower in the MSG-treated group compared with controls at 1, 6 and 9 months ($P < 0.05$) (Fig 4). Pancreatic islet size distribution in the MSG-treated group was significantly higher than that of the control

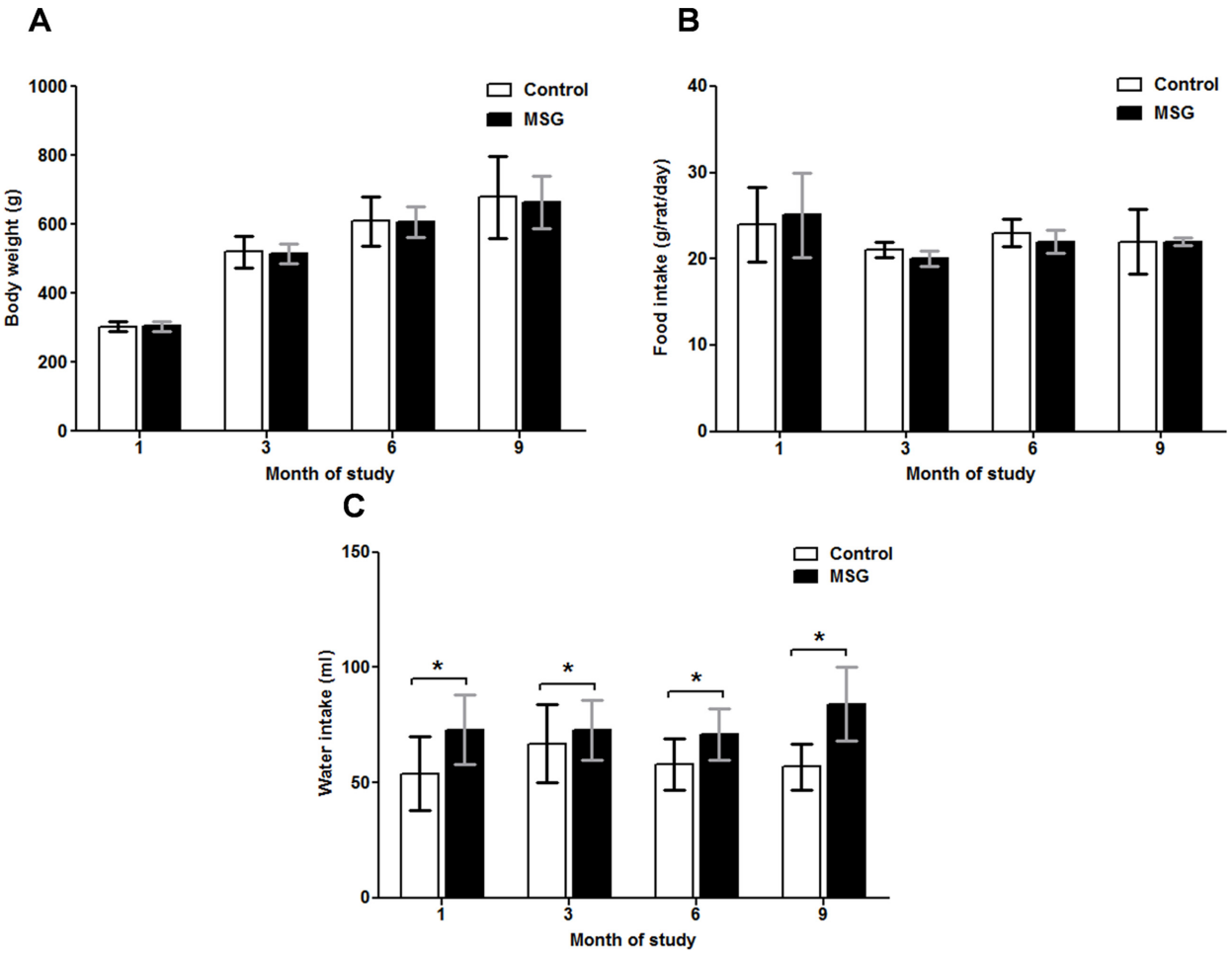


Fig 1. Body weight (panel A), food (panel B) and water (panel C) intake in the control and MSG-treated groups at 1, 3, 6, and 9 months of study.
* $P<0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g001

groups at 1 month (Fig 5) but was similar in both groups throughout the remaining period. The islet density of MSG-treated group was significantly higher compared to controls at 6 months (0.58 ± 0.12 vs. 0.42 ± 0.07; $P<0.05$), but such difference was not seen in any other time points (Fig 6). The intensity of immune-staining of 4-HNE, an oxidative stress marker, in the pancreatic islets of the MSG-treated group was slightly (but not significantly) higher at 1 month and was significantly higher at 6 months compared to the control group ($P = 0.001$) (Fig 7).

Pancreatic functional tests

There was no significant difference in serum insulin levels between control and MSG-treated groups at anytime point examined (Fig 8A). Similarly, OGTT performed at 9 months of study showed no difference in glucose levels between control and MSG-treated groups (Fig 8B).

Discussion

Whether MSG intake is a causative factor in epidemics of metabolic syndrome remains largely debated, particularly since there are epidemiological and experimental data both for and

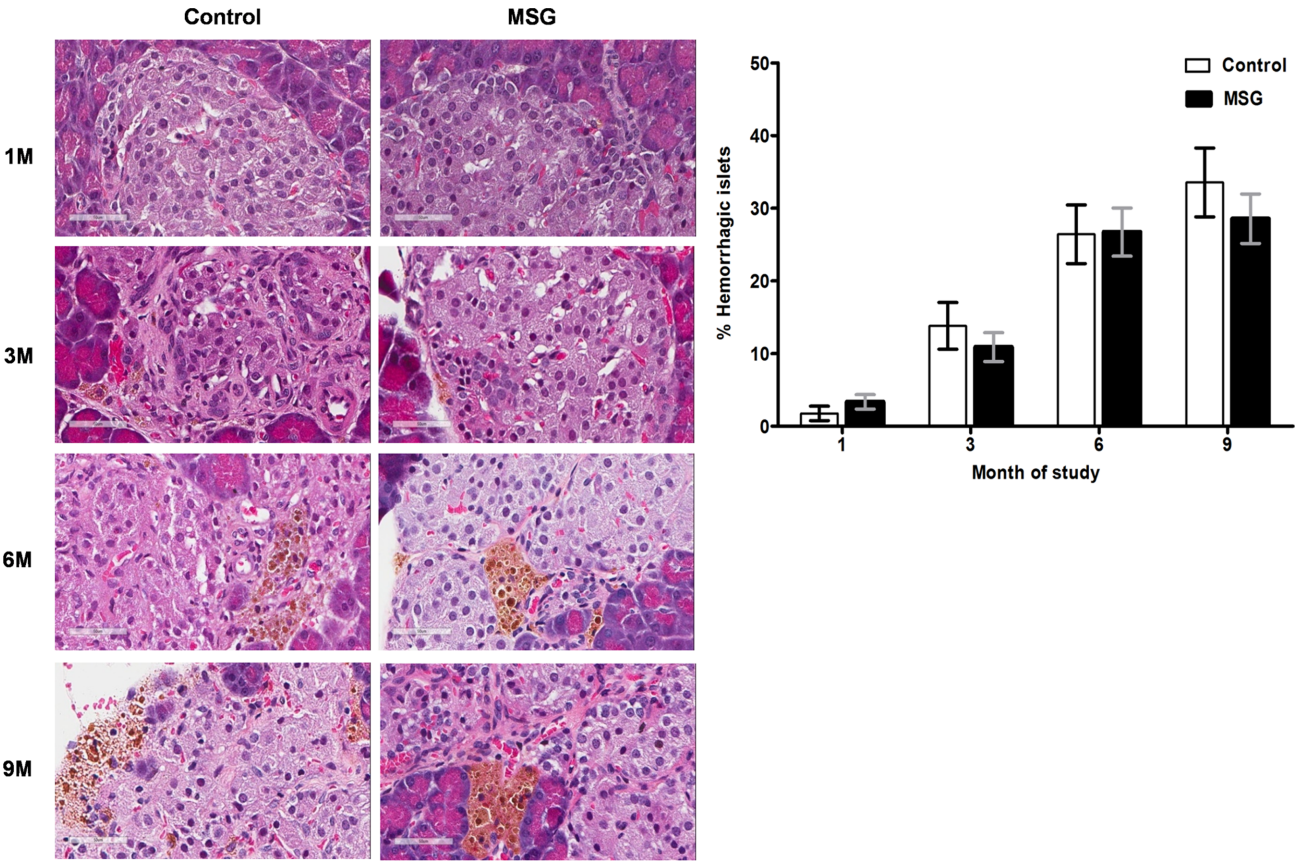


Fig 2. Representative histology (left) and prevalence (right) of islets hemorrhage/hemosiderin deposits in the control and MSG-treated group at 1, 3, 6, and 9 months (x400).

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g002

against this view. Indeed, metabolic syndrome involves insulin resistance, and pancreatic changes should be expected. Animal studies have demonstrated that parenteral MSG causes various changes in pancreatic islets such as hypertrophy [9], hyperplasia [11], decrease in acinar cells, α-cells and somatostatin cells [12] and increase in fibrosis [16]. However, these conditions do not represent the scenario of oral supplementation and for this reason we herein investigated the effects of oral MSG on the histomorphological and functional alterations of the rat pancreatic islets.

We report for the first time that daily consumption of dietary MSG decreases the pancreatic β-cell mass in adult rats, similar to what has been observed following MSG injection in newborn mice [12, 16]. However, the mechanism of the two might be different. The mechanism of MSG-induced β-cell loss in this study remains unclear, but the increased oxidative stress by MSG in β-cells is one possibility [17],which was supported by the increase of 4-HNE levels in the pancreatic islets in the MSG-treated group in this study. Alloxan [18], streptozotocin (STZ) [18], and ethanol [19]may induce β-cells loss through different mechanisms. First, in the presence of intracellular thiols, especially glutathione, alloxan generates reactive oxygen species (ROS) in a cyclic redox reaction with its reduction product, dialuric acid. Autoxidation of dialuric acid generates ROS, which is in turn responsible for the β-cells necrosis [18]. Second, STZ is separated into its glucose and methylnitroso-urea moietyinside β-cells and, due to its alkylating properties, the latter modifies biological macromolecules, fragments DNA and destroys the β-cells, causing a state of insulin-dependent diabetes [18]. Finally, chronic ethanol

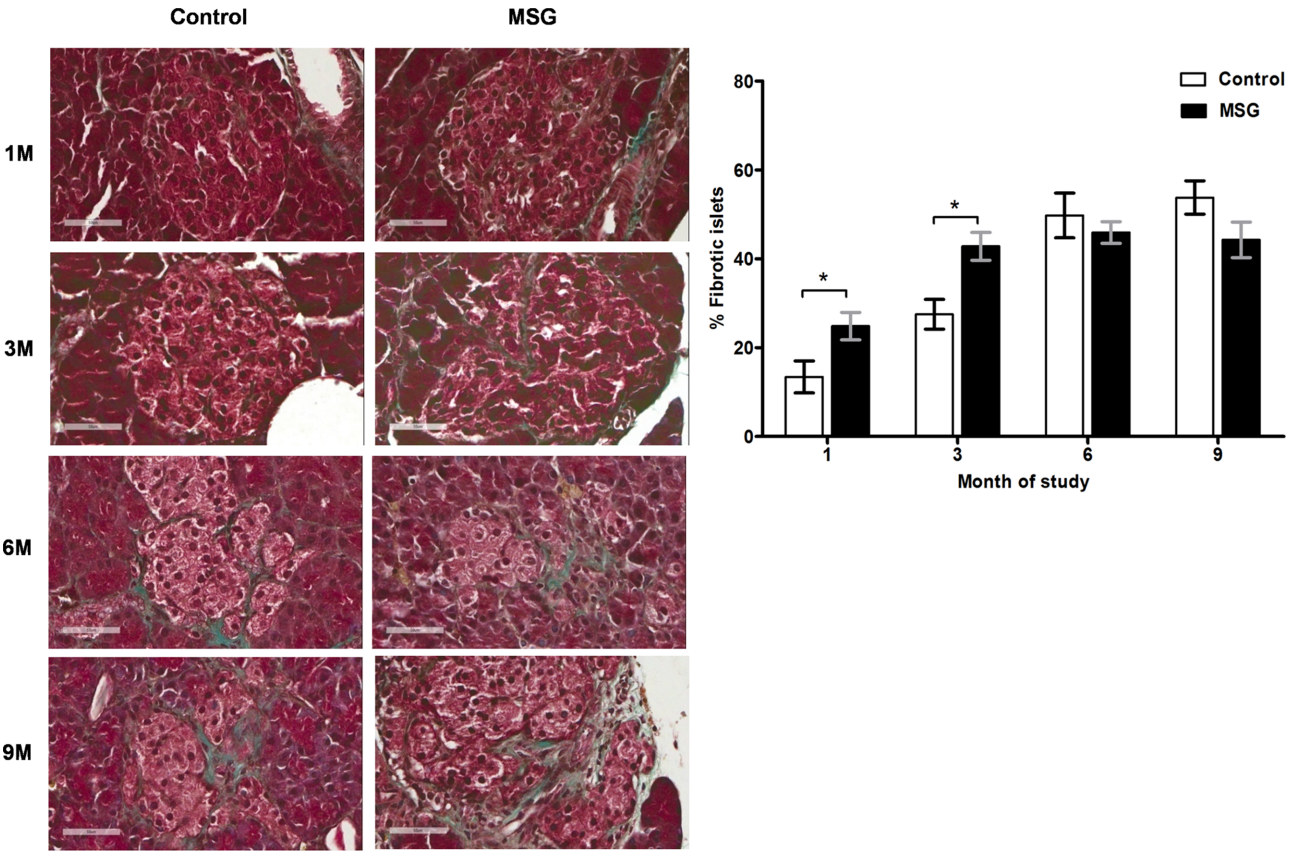


Fig 3. Representative histology (left) and prevalence (right) of islet fibrosis in control and MSG-treated group at 1, 3, 6, and 9 months (Masson's trichrome staining, x400).

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g003

consumption decreases the expression and inactivation of glucokinase, a key glycolytic enzyme,by tyrosine nitration, leading to pancreatic β-cell apoptosis [20].

We also observed islet hypertrophy in the MSG group at 1 month, similar to what reported in mice receiving MSG injections at birth [9, 10]. Pancreatic islet hypertrophy is generally observed in obesity and is secondary to high fat diets [21], chronic glucose infusion [22], and partial pancreatectomy [23] followed by β-cell regeneration [24]. We speculate that similar mechanisms may cause islet hypertrophy after oral MSG treatment. In agreement with this observation we spot a higher density of pancreatic islets in MSG-treated rats compared to control at 6 months and expect that such density may increase the β-cell mass during regeneration. This has been reported in mice following islet [25] and β-cell [26] injury and may represent a reactive phenomenon in our experimental setting.

Daily consumption of MSG had minimal effects on islet hemorrhage, which in our study increased with age regardless of MSG. This result is consistent with previous studies that showed spontaneous hemorrhage in older males [15]. Nonetheless, the frequency of hemorrhage was higher with MSG consumption at 1 and 3 months and later reached a plateau, eventually affecting 100% of animals. It is possible that the islet hemorrhage and hemosiderin deposition may be responsible for fibrosis that we and other groups have observed. In a previous study, male Wistar rats fed with Busulfan, an alkylating anticancer drug, developed islet hemorrhages and islet fibrosis [27]. Fibrosis is a physiological healing process that occurs after tissue damage/injury [28, 29]. In our study, fibrotic lesions were significantly more frequent in

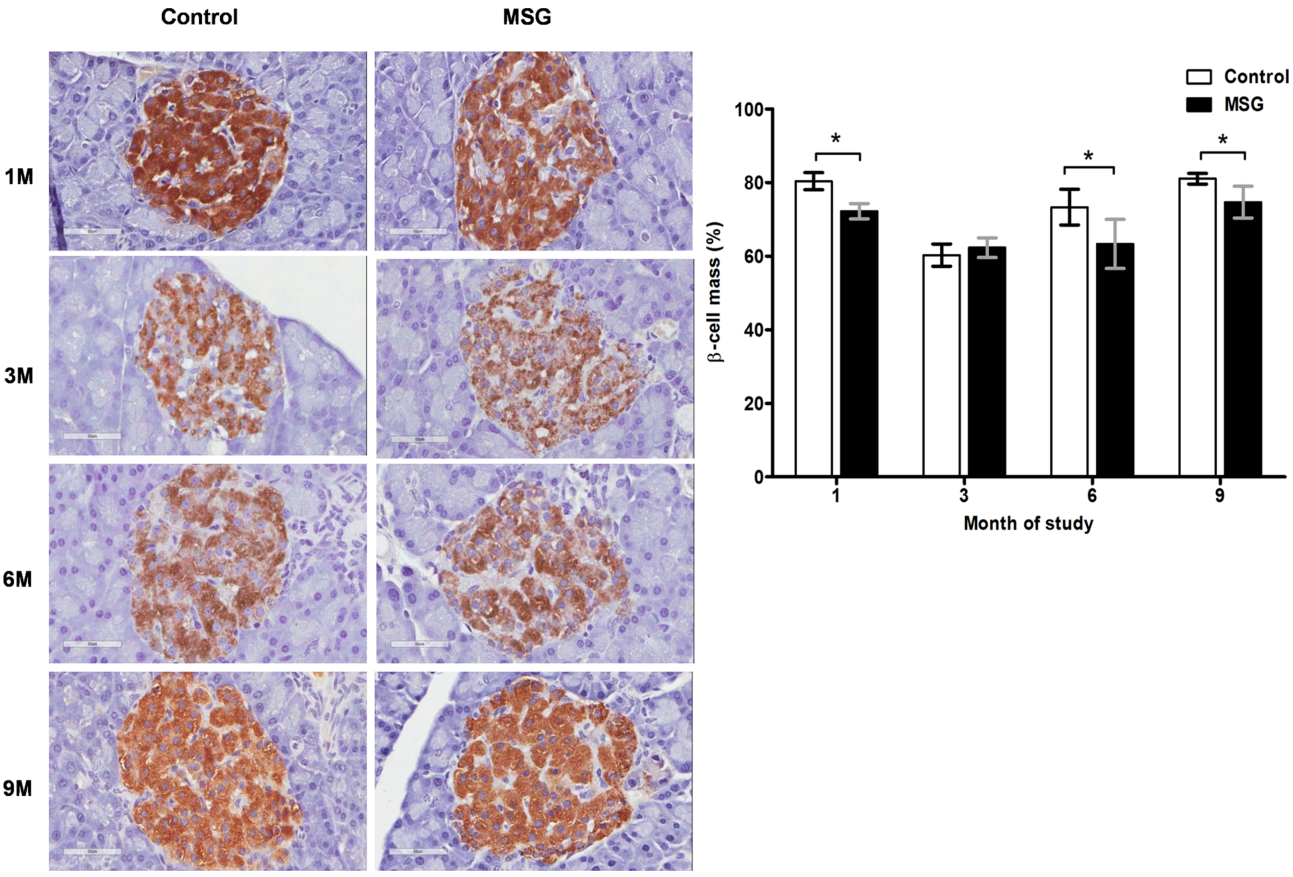


Fig 4. Representative immunohistochemistry (left) and prevalence (right) of insulin staining in control versus MSG-treated groups at 1, 3, 6, and 9 months (x400). * $P<0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g004

the MSG-treated rats at 1 and 3 months compared to that in the controls, resembling what was reported in rats receiving parenteral MSG at birth [16]. Similar to the hemorrhagic pattern, fibrotic islets increased with age and aging overcome the MSG effect at later time points.

Based on the observed pathology of the pancreas, we were surprised to observe no changes of insulin levels or glucose tolerance during MSG supplementation. We assume that the functional impairment may require a second hit or a separate factor for susceptibility. Our assumption based on the previous studies was that MSG was converted into 2 major products, glucose and lactate, within two hours after ingestion [30]. Therefore, MSG consumption during meals might increase postpandrial glucose levels and then stimulate insulin release. Indeed, MSG has been shown to have an effect on insulin release. In human studies, serum insulin levels tended to be higher in MSG-treated participants compared to controls and the level of serum insulin correlated well with that of glutamate [31]. This was supported by a molecular study that showed that glutamate transporters are expressed in pancreatic β-cells and play a role in the regulation of insulin secretion [32]. Moreover, glutamate itself induces pancreatic β-cell damage [17]. A high level of extracellular glutamate impaired the uptake of cysteine, a precursor of glutathione synthesis, by inhibiting Glu-Cys antiporter in pancreatic β-cells, leading to oxidative stress and cell death. We also observed the β-cell loss in this study. It is possible that the dose or length of time used in this study is insufficient to induce this effect, or that the observed effects may become significant only in the presence of a genetic susceptibility or a pre-existing chronic condition. The use of dietary induced obese rats or genetically obese and diabetic

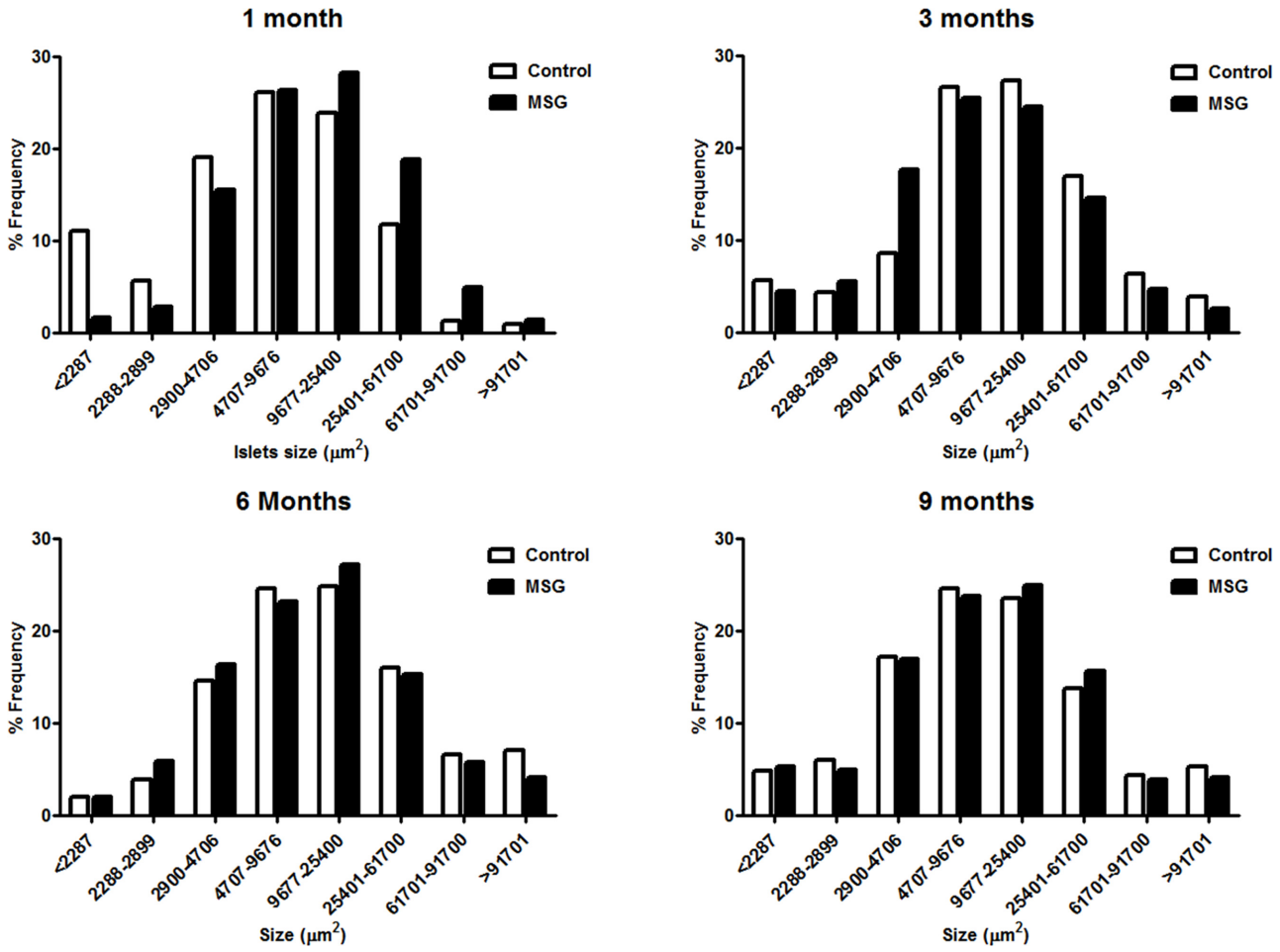


Fig 5. Islet size (um^2) distribution in control and MSG-treated groups at 1, 3, 6, and 9 months.

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g005

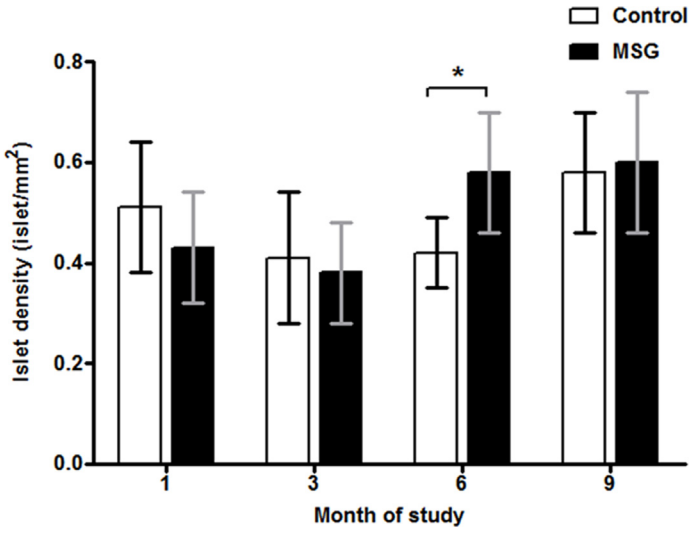


Fig 6. Islet density in control and MSG-treated groups at 1, 3, 6, and 9 months.

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g006

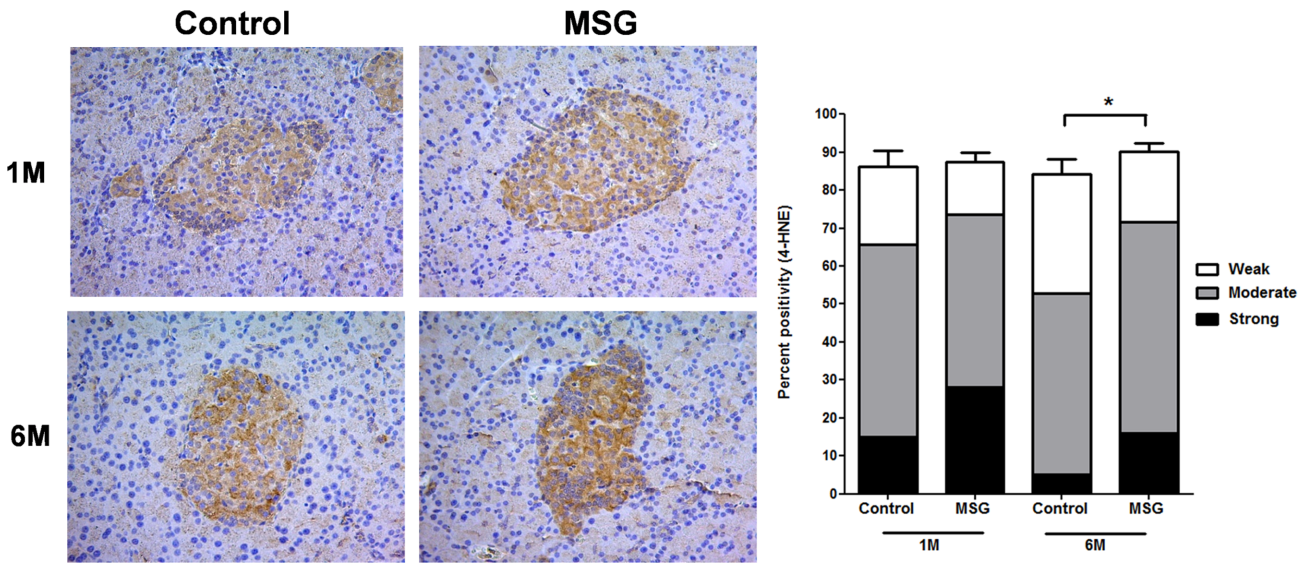


Fig 7. Representative immunohistochemistry (left) and prevalence (right) of 4-HNE staining which was divided into 3 categories (weak, moderate, and strong) based on its intensity in control versus MSG-treated groups at 1 and 6 months (x200). * $P = 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g007

Zucker rats will be useful to further evaluate the effect of MSG on glucose homeostasis, pancreatic function and histology [33]. Similarly, we are convinced that a deeper study of the functional features of islet β-cells [34, 35]induced by MSG would be a mechanistic development of our observation but this possibility was not included in the prior aims and scopes of this study.

Of note, the dose given to rats is 5–6 times higher than the current average estimate of MSG consumption in Asia (4 g/day)[36] and 2–3 times higher than what is considered as safe (150 mg/kg, 10 g/day for a 70 kg man)[37]. However, the dose given to rats in this study is closer to the daily amount recorded in a subgroup of subjects in our previous study in the Thai population (9–14 g/day)[5]

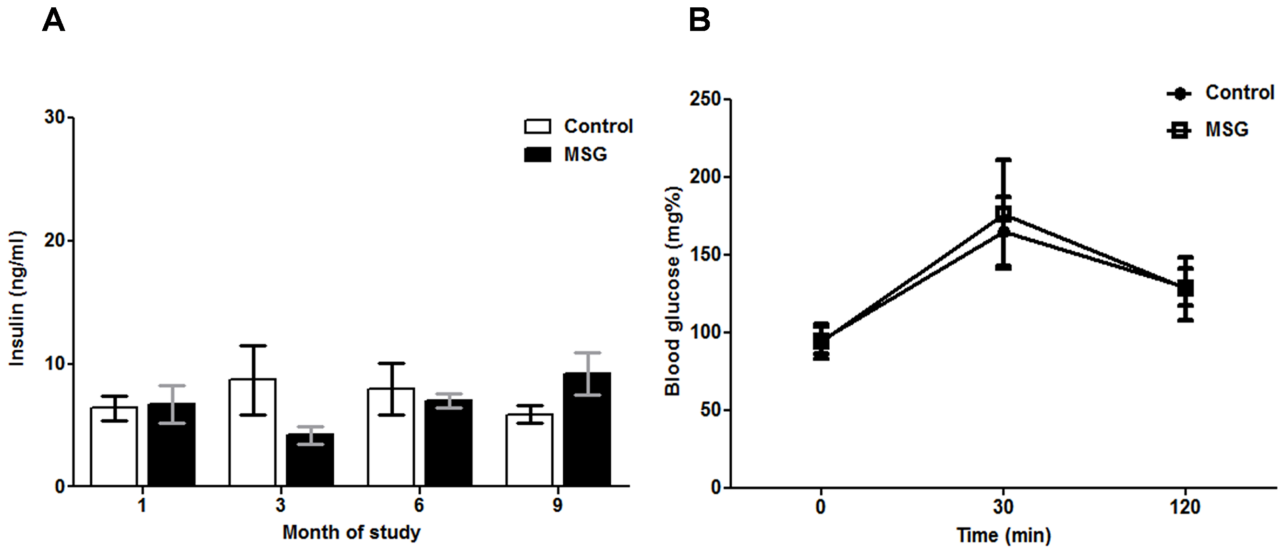


Fig 8. Pancreatic function in control and MSG-treated groups as measured by (A) insulin levels at 1, 3, 6, and 9 months (mean ± SEM) and (B) oral glucose tolerance test (OGTT) at 9 months(mean ± SD).

doi:10.1371/journal.pone.0131595.g008

The higher intake of water observed in the MSG-treated rats is probably not related to the function of pancreatic tissue, but rather to renal tissue. MSG-treated group excreted a greater volume of urine and sodium per day compared to controls [38]. The higher water intake is likely a response by the rats to balance the higher volume loss via urine excretion. It should be noted that in the rodent model, the effect of MSG on obesity and/or metabolic syndrome during adulthood is different from that in the perinatal period of development, a time when the blood-brain barrier is immature and most vulnerable to toxicity in rodents [39, 40]. At high concentration, MSG is neurotoxic and destroys cells in the arcuate hypothalamic nuclei, which is a large hypothalamic area responsible for controlling body weight and energy balance [39]. In contrast, the effects induced by MSG-consumption at adulthood are likely to occur by a different mechanism.

Finally, we are well aware that numerous additional factors may play a pivotal role in the development or protection of the phenotype observed. First, we recognize that the presence of NaCl should be addressed in the future by dedicated experiments with equimolar NaCl solutions in animal models [13, 41]. Second, the individual susceptibility to diabetes is necessarily a key factor and the use of strains prone to metabolic disturbances such as genetically determined [42]or diet induced [33]obese rat diabetes will prove a much needed proof of this hypothesis, despite the variable characteristics of these models [43]. Third, additional factors such as protein intake or drug treatments should also be accounted for in future experiments [14, 44]. Nonetheless, the experimental design to discriminate the effect of all these specific factors must be prospective and could not be completed in a retrospective fashion.

Conclusion

We demonstrated here that daily MSG consumption increases pancreatic β-cell loss, but this does not affect baseline insulin levels or glucose tolerance in normal adult rats. While these results support the argument that MSG is likely to be safe for use in the healthy population, these results also suggest that significant adverse effects may be seen in subjects with genetic susceptibility to diabetes or with a preexisting chronic pancreatitis. We also submit that additional factors not accounted in our experimental design include the individual genetic susceptibility and other nutritional factors which will be the objective of future studies, along with functional studies of islet cells exposed to MSG.

Acknowledgments

We would like to thank the Northeast Laboratory Animal Center at KKU for husbandry facilities. We also thank Professor Yukifumi Nawa and Dr. Justin Reese for editing the MS via the Publication Clinic KKU, Thailand. Our special thanks go to Professor Sopit Wongkham, the awardee of the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund (RTA5780012), for the financial support to PB during the period of manuscript revision.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: UC PB VP. Performed the experiments: PB SP AS WH UC. Analyzed the data: PB SW UC VP. Contributed reagents/materials/analysis tools: UC. Wrote the paper: PB AS CS UC.

References

1. Walker R, Lupien JR. The safety evaluation of monosodium glutamate. The Journal of nutrition. 2000; 130(4S Suppl):1049S–52S. PMID: 10736380.

2. He K, Zhao L, Daviglus ML, Dyer AR, Van Horn L, Garside D, et al. Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the INTERMAP Study. Obesity (Silver Spring). 2008; 16(8):1875–80. Epub 2008/05/24. oby2008274 [pii] doi: 10.1038/oby.2008.274 PMID: 18497735; PubMed Central PMCID: PMC2610632.
3. He K, Du S, Xun P, Sharma S, Wang H, Zhai F, et al. Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS). Am J Clin Nutr. 2011; 93(6):1328–36. Epub 2011/04/08. ajcn.110.008870 [pii] doi: 10.3945/ajcn.110.008870 PMID: 21471280; PubMed Central PMCID: PMC3095503.
4. Shi Z, Yuan B, Taylor AW, Dai Y, Pan X, Gill TK, et al. Monosodium glutamate is related to a higher increase in blood pressure over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults. Journal of hypertension. 2011; 29(5):846–53. doi: 10.1097/HJH.0b013e328344da8e PMID: 21372742.
5. Insawang T, Selmi C, Cha'on U, Pethlert S, Yongvanit P, Areejitranusorn P, et al. Monosodium glutamate (MSG) intake is associated with the prevalence of metabolic syndrome in a rural Thai population. Nutr Metab (Lond). 2012; 9(1):50. Epub 2012/06/12. 1743-7075-9-50 [pii] doi: 10.1186/1743-7075-9-50 PMID: 22681873.
6. Shi Z, Luscombe-Marsh ND, Wittert GA, Yuan B, Dai Y, Pan X, et al. Monosodium glutamate is not associated with obesity or a greater prevalence of weight gain over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults. The British journal of nutrition. 2010; 104(3):457–63. doi: 10.1017/S0007114510000760 PMID: 20370941.
7. Thu Hien VT, Thi Lam N, Cong Khan N, Wakita A, Yamamoto S. Monosodium glutamate is not associated with overweight in Vietnamese adults. Public health nutrition. 2013; 16(5):922–7. doi: 10.1017/S1368980012003552 PMID: 22894833.
8. Nakanishi Y, Tsuneyama K, Fujimoto M, Salunga TL, Nomoto K, An JL, et al. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. J Autoimmun. 2008; 30(1–2):42–50. Epub 2008/01/08. doi: 10.1016/j.jaut.2007.11.016 S0896-8411(07)00140-0 [pii]. PMID: 18178378.
9. Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, et al. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. Exp Anim. 2006; 55(2):109–15. Epub 2006/05/03. JST.JSTAGE/expanim/55.109 [pii]. PMID: 16651693.
10. Sasaki Y, Shimada T, Iizuka S, Suzuki W, Makihara H, Teraoka R, et al. Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome. Eur J Pharmacol. 2011; 662(1–3):1–8. Epub 2011/05/10. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.04.051 S0014-2999(11)00470-5 [pii]. PMID: 21549692.
11. Sasaki Y, Suzuki W, Shimada T, Iizuka S, Nakamura S, Nagata M, et al. Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. Life Sci. 2009; 85(13–14):490–8. Epub 2009/08/18. S0024-3205(09)00328-2 [pii] doi: 10.1016/j.lfs.2009.07.017 PMID: 19683013.
12. Nakayama D, Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, Furukawa M, Ohyashiki J, et al. Turnover of acinar and islet cells in the pancreas of monosodium glutamate-treated obese mice. Obes Res. 2003; 11(1):87–94. Epub 2003/01/17. doi: 10.1038/oby.2003.14 PMID: 12529490.
13. Katsuda Y, Kemmochi Y, Maki M, Sano R, Ishii Y, Miyajima K, et al. Physiological changes induced by salt intake in female Spontaneously Diabetic Torii-Lepr(fa) (SDT fatty) rat, a novel obese type 2 diabetic model. Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho. 2014; 85(5):588–94. doi: 10.1111/asj.12191 PMID: 24571912.
14. Malta A, de Oliveira JC, Ribeiro TA, Tofolo LP, Barella LF, Prates KV, et al. Low-protein diet in adult male rats has long-term effects on metabolism. The Journal of endocrinology. 2014; 221(2):285–95. doi: 10.1530/JOE-13-0473 PMID: 24599936.
15. Imaoka M, Satoh H, Furuhama K. Age- and sex-related differences in spontaneous hemorrhage and fibrosis of the pancreatic islets in Sprague-Dawley rats. Toxicologic pathology. 2007; 35(3):388–94. Epub 2007/04/25. doi: 10.1080/01926230701230304 PMID: 17455087.
16. Yin GS, Lin SD, Xu DC, Sun RQ, Lin K, Lin CJ. Handle Region Peptide Ameliorating Insulin Resistance but Not beta Cell Functions in Male Rats Neonatally Treated with Sodium L-Glutamate. International journal of endocrinology. 2013; 2013:493828. Epub 2014/01/05. doi: 10.1155/2013/493828 PMID: 24385982; PubMed Central PMCID: PMC3872408.
17. Di Cairano ES, Davalli AM, Perego L, Sala S, Sacchi VF, La Rosa S, et al. The glial glutamate transporter 1 (GLT1) is expressed by pancreatic beta-cells and prevents glutamate-induced beta-cell death. The Journal of biological chemistry. 2011; 286(16):14007–18. Epub 2011/02/22. doi: 10.1074/jbc.M110.183517 PMID: 21335552; PubMed Central PMCID: PMC3077601.
18. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008; 51(2):216–26. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7 PMID: 18087688.

19. Dembele K, Nguyen KH, Hernandez TA, Nyomba BL. Effects of ethanol on pancreatic beta-cell death: interaction with glucose and fatty acids. Cell biology and toxicology. 2009; 25(2):141–52. doi: 10.1007/s10565-008-9067-9 PMID: 18330713.

20. Kim JY, Song EH, Lee HJ, Oh YK, Park YS, Park JW, et al. Chronic ethanol consumption-induced pancreatic {beta}-cell dysfunction and apoptosis through glucokinase nitration and its down-regulation. J Biol Chem. 2010; 285(48):37251–62. Epub 2010/09/22. doi: 10.1074/jbc.M110.142315 PMID: 20855893; PubMed Central PMCID: PMC2988331.

21. Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. Diabetologia. 2005; 48(7):1350–8. doi: 10.1007/s00125-005-1772-9 PMID: 15937671.

22. Topp BG, McArthur MD, Finegood DT. Metabolic adaptations to chronic glucose infusion in rats. Diabetologia. 2004; 47(9):1602–10. Epub 2004/09/07. doi: 10.1007/s00125-004-1493-5 PMID: 15349726.

23. Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, et al. Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. J Biol Chem. 2003; 278(5):2997–3005. doi: 10.1074/jbc.M210581200 PMID: 12438314.

24. Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. Physiological reviews. 2005; 85(4): 1255–70. doi: 10.1152/physrev.00025.2004 PMID: 16183912.

25. Simeone DM, Zhang L, Treutelaar MK, Graziano K, Logsdon CD, Burant CF. Islet hypertrophy following pancreatic disruption of Smad4 signaling. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2006; 291(6):E1305–16. Epub 2006/06/01. doi: 10.1152/ajpendo.00561.2005 PMID: 16735447.

26. Li L, Seno M, Yamada H, Kojima I. Promotion of beta-cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. Endocrinology. 2001; 142(12):5379–85. doi: 10.1210/endo.142.12.8520 PMID: 11713238.

27. Kaduk B, Husslein EM, Siegfried A. Morphology of the chronic toxicity of busulfan on the islets of Langerhans in the rat. Hepato-gastroenterology. 1987; 34(3):108–12. PMID: 3301605.

28. Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, Kordes C, Haussinger D. Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. Pancreas. 2004; 28(2):129–37. PMID: 15028944.

29. Hong OK, Lee SH, Rhee M, Ko SH, Cho JH, Choi YH, et al. Hyperglycemia and hyperinsulinemia have additive effects on activation and proliferation of pancreatic stellate cells: possible explanation of islet-specific fibrosis in type 2 diabetes mellitus. Journal of cellular biochemistry. 2007; 101(3):665–75. Epub 2007/01/11. doi: 10.1002/jcb.21222 PMID: 17212361.

30. Stegink LD, Brummel MC, Boaz DP, Filer LJ Jr. Monosodium glutamate metabolism in the neonatal pig: conversion of administered glutamate into other metabolites in vivo. The Journal of nutrition. 1973; 103(8):1146–54. Epub 1973/08/01. PMID: 4719726.

31. Chevassus H, Renard E, Bertrand G, Mourand I, Puech R, Molinier N, et al. Effects of oral monosodium (L)-glutamate on insulin secretion and glucose tolerance in healthy volunteers. British journal of clinical pharmacology. 2002; 53(6):641–3. Epub 2002/06/06. PMID: 12047489; PubMed Central PMCID: PMC1874333.

32. Gammelsaeter R, Coppola T, Marcaggi P, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Attwell D, et al. A role for glutamate transporters in the regulation of insulin secretion. PloS one. 2011; 6(8):e22960. Epub 2011/08/20. doi: 10.1371/journal.pone.0022960 PMID: 21853059; PubMed Central PMCID: PMC3154915.

33. Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology. 2009; 31(4):249–61. doi: 10.1358/mf.2009.31.4.1362513 PMID: 19557203.

34. Ferrannini E, Mari A. beta-Cell function in type 2 diabetes. Metabolism: clinical and experimental. 2014; 63(10):1217–27. doi: 10.1016/j.metabol.2014.05.012 PMID: 25070616.

35. Schwitzgebel VM. Many faces of monogenic diabetes. Journal of diabetes investigation. 2014; 5(2): 121–33. doi: 10.1111/jdi.12197 PMID: 24843749; PubMed Central PMCID: PMC4023572.

36. Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, et al. Consensus meeting: monosodium glutamate—an update. European journal of clinical nutrition. 2007; 61(3): 304–13. Epub 2006/09/08. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602526 PMID: 16957679.

37. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008; 22(3):659–61. Epub 2007/10/19. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF PMID: 17942826.

38. Sharma A, Prasongwattana V, Cha'on U, Selmi C, Hipkaeo W, Boonnate P, et al. Monosodium glutamate (MSG) consumption is associated with urolithiasis and urinary tract obstruction in rats. PloS one.

2013; 8(9):e75546. Epub 2013/10/03. doi: 10.1371/journal.pone.0075546 PMID: 24086562; PubMed Central PMCID: PMC3784461.

39. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science. 1969; 164(3880):719–21. Epub 1969/05/09. PMID: 5778021.

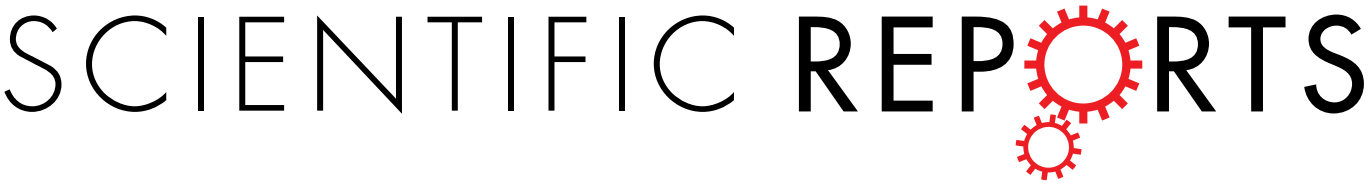
40. Arees EA, Mayer J. Monosodium glutamate-induced brain lesions: electron microscopic examination. Science. 1970; 170(3957):549–50. Epub 1970/10/30. PMID: 5507208.

41. Mozaffari MS, Abdelsayed R, Patel C, Schaffer SW. Effects of dietary salt and fat on taurine excretion in healthy and diseased rats. Advances in experimental medicine and biology. 2006; 583:173–80. PMID: 17153600.

42. Katsuda Y, Ohta T, Miyajima K, Kemmochi Y, Sasase T, Tong B, et al. Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. Exp Anim. 2014; 63(2):121–32. PMID: 24770637; PubMed Central PMCID: PMC4160981.

43. Wang X, DuBois DC, Sukumaran S, Ayyar V, Jusko WJ, Almon RR. Variability in Zucker diabetic fatty rats: differences in disease progression in hyperglycemic and normoglycemic animals. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy. 2014; 7:531–41. doi: 10.2147/DMSO.S69891 PMID: 25419150; PubMed Central PMCID: PMC4234283.

44. Franco CC, Miranda RA, de Oliveira JC, Barella LF, Agostinho AR, Prates KV, et al. Protective Effect of Metformin Against Walker 256 Tumor Growth is Not Dependent on Metabolism Improvement. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2014; 34(6):1920–32. doi: 10.1159/000366390 PMID: 25500480.



OPEN

High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells *via* STAT3 activation

Received: 18 August 2015
Accepted: 30 November 2015
Published: 08 January 2016

Charupong Saengboonmee[1,4], Wunchana Seubwai[2,4], Chawalit Pairojkul[3,4] & Sopit Wongkham[1,4]

Epidemiological studies have indicated diabetes mellitus (DM) as a risk of cholangiocarcinoma (CCA), however, the effects and mechanisms of high glucose on progression of CCA remain unclear. This study reports for the first time of the enhancing effects of high glucose on aggressive phenotypes of CCA cells via STAT3 activation. CCA cells cultured in high glucose media exerted significantly higher rates of cell proliferation, adhesion, migration and invasion than those cultured in normal glucose. The phosphokinase array revealed STAT3 as the dominant signal activated in response to high glucose. Increased nuclear STAT3, p-STAT3 and its downstream target proteins, cyclin D1, vimentin and MMP2, were shown to be underling mechanisms of high glucose stimulation. The link of high glucose and STAT3 activation was confirmed in tumor tissues from CCA patients with DM that exhibited higher STAT3 activation than those without DM. Moreover, the levels of STAT3 activation were correlated with the levels of blood glucose. Finally, decreasing the level of glucose or using a STAT3 inhibitor could reduce the effects of high glucose. These findings suggest that controlling blood glucose or using a STAT3 inhibitor as an alternative approach may improve the therapeutic outcome of CCA patients with DM.

Diabetes Mellitus (DM), a disease characterized by high blood glucose, is globally increasing in both industrialized and developing countries[1,2]. Apart from its mild to serious complications, DM also increases risk for other non-communicable diseases including cancers. Not only an association with cancer risk, DM also promotes the progression of tumors resulting in a worse prognosis of patients in many types of cancer[3,4].

Cholangiocarcinoma (CCA), is a malignancy that arises from the bile duct epithelia. Its incidence is considered low in the western countries but relatively high in Southeast Asia[5]. The highest incidence of CCA has been reported in the Northeast of Thailand where the infection of the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* was shown to be a major risk factor[6,7]. Less than 1% of the *Opisthorchis viverrini*-infected individuals, however, develop CCA[8,9], indicating that other individual risk factors may play a crucial role in CCA development.

Epidemiological studies have clearly demonstrated DM as one of the risk factors of CCA in the western countries[10,11]. In the current literature there is no direct study indicating the association of DM and CCA in Thai patients. The geographical mortality surveys in Thailand, however, have shown the overlay of geographical mortality of DM and CCA in northeast Thailand[12]. The possible risks and promoting factors of DM on CCA is currently reviewed[9]. Although, the effects of DM on progression and poor prognosis of cancer patients were repeatedly reported, the mechanisms by which DM or high blood glucose affects CCA remains unclear[13]. The understanding of interaction between the high glucose condition and CCA may unveil an alternative approach to improve the therapeutic outcome of CCA patients.

In the present study, it is demonstrated for the first time, the enhancing effect of high glucose upon the aggressive phenotypes of CCA cell lines, namely growth, adhesion, migration and invasion. The molecular pathway linking high glucose conditions to the aggressive properties of CCA was shown to be via STAT3 activation. The tie between high glucose and STAT3 activation was confirmed in CCA patients as nuclear p-STAT3 activation was significantly enhanced in tumor tissues of CCA patients with DM. These findings suggest the implication of controlling blood glucose or using a STAT3 inhibitor as a strategy for treatment of CCA patients with DM.

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. [2]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. [3]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. [4]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.W. (email: sopit@kku.ac.th)

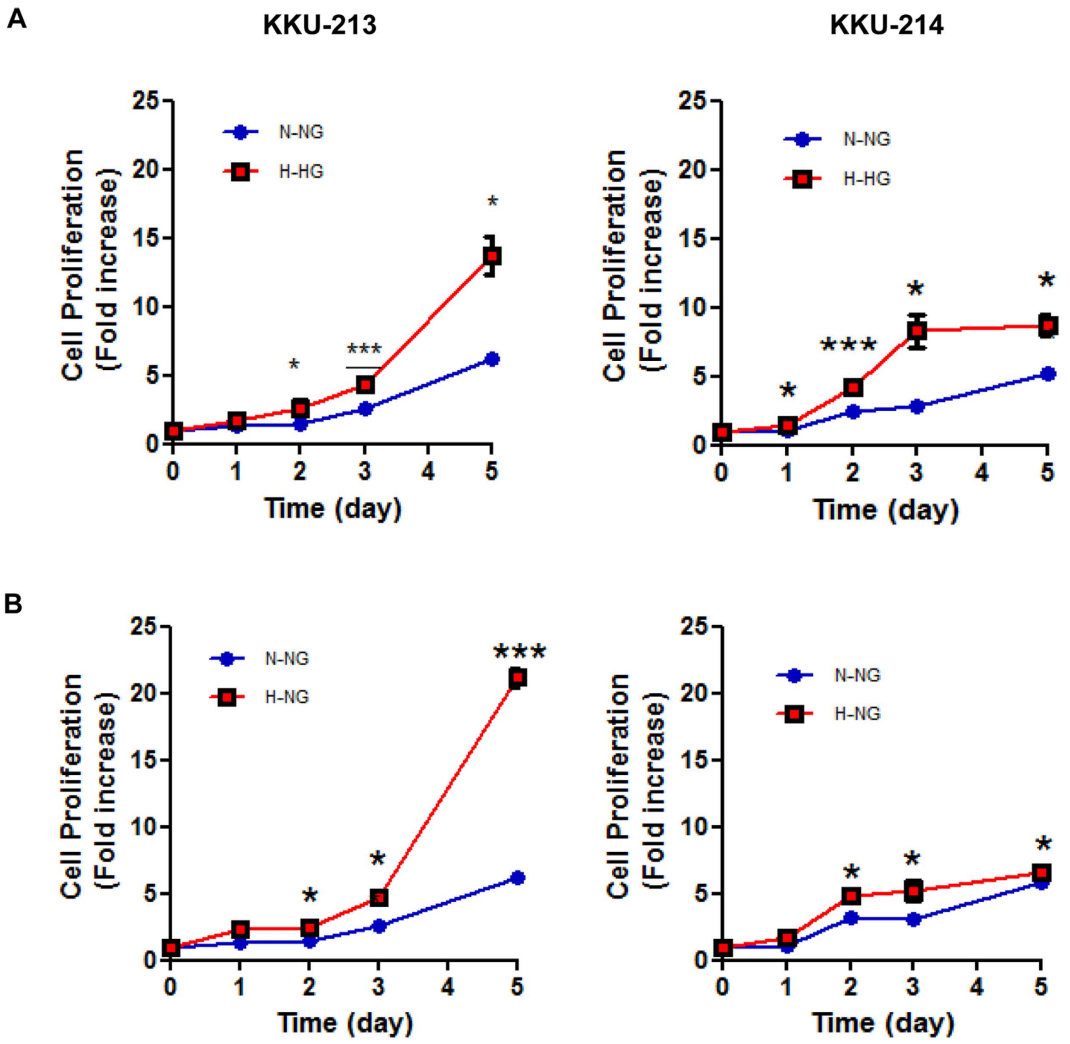


Figure 1. High glucose condition promotes proliferation of CCA cells. (**A**) HG cells cultured in high glucose media (H-HG) showed significantly higher proliferation rates than NG cells cultured in normal glucose media (N-NG). (**B**) Switching media by culturing NG cells in high glucose media (H-NG) significantly increased proliferation rates as compared to NG cells cultured in normal glucose media (N-NG). The data are mean ± SD of triplicate assays and is one representation of three independent experiments. NG and HG = cells continuously cultured in normal and high glucose media; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Results

To test the effects of high glucose on the metastatic potential of CCA cells, two highly metastatic CCA cell lines, KKU-213 and KKU-214 were cultured in media containing normal glucose (N; 5.56 mM) or high glucose (H; 25 mM). Cells cultured in normal glucose media were designated as NG cells and those cultured in high glucose media were designated as HG cells.

High glucose promotes CCA cells proliferation. NG cells and HG cells were cultured in the specified media for 5 days and cell numbers at days 1, 2, 3 and 5 were determined using the MTT assay. The proliferation rates of NG cells and HG cells were compared. As shown in Fig. 1A, the HG cells of both tested cell lines had significantly higher proliferation rates than the NG cells ($P < 0.05$). To assure that the growth enhancing effect was due to the glucose condition, the NG cells were switched to culture in the media with high glucose (H-NG). The proliferation rates of the H-NG cells were significantly increased compared to those of NG cells cultured in the normal glucose condition (N-NG) ($P < 0.05$; Fig. 1B).

High glucose promotes adhesion, migration and invasion of CCA cells. Adherence to the extracellular matrix (ECM) is an important property for metastatic cells to localize at the secondary site, thus, the effect of high glucose on promoting cell adhesion to the ECM was next observed. CCA cells were allowed to adhere on a Matrigel pre-coated plate for 1 h and the numbers of adhered cells were determined. It is obvious that the number of adhered cells of the HG group were significantly higher than those of NG group ($P < 0.05$; Fig. 2A).

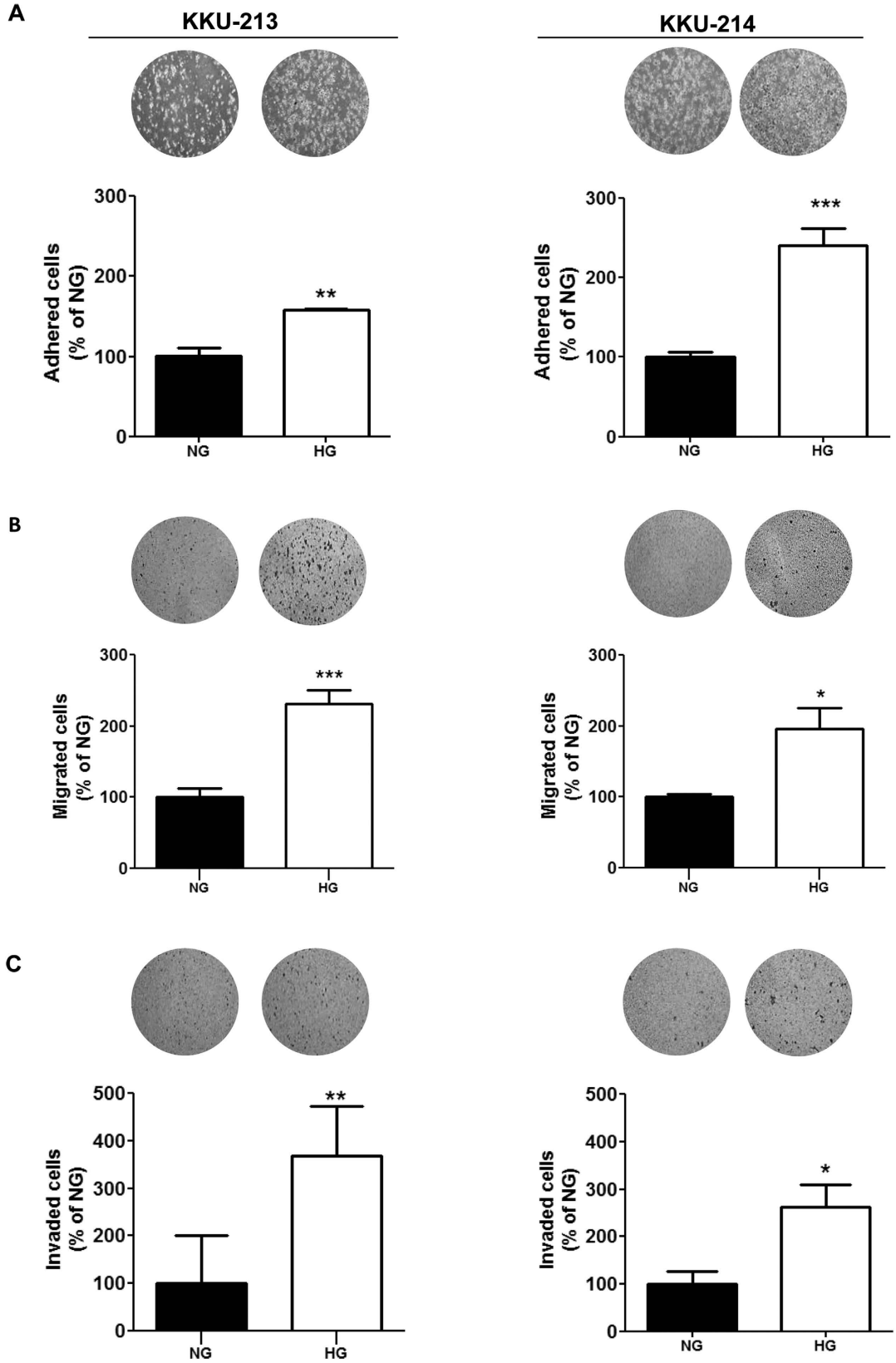


Figure 2. High glucose promotes metastatic related phenotypes of CCA cells. HG cells and NG cells were compared for (**A**) adhesion, (**B**) migration and (**C**) invasion. The data are mean ± SD of triplicates and is one representation of two independent experiments. NG and HG = cells continuously cultured in normal and high glucose media; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

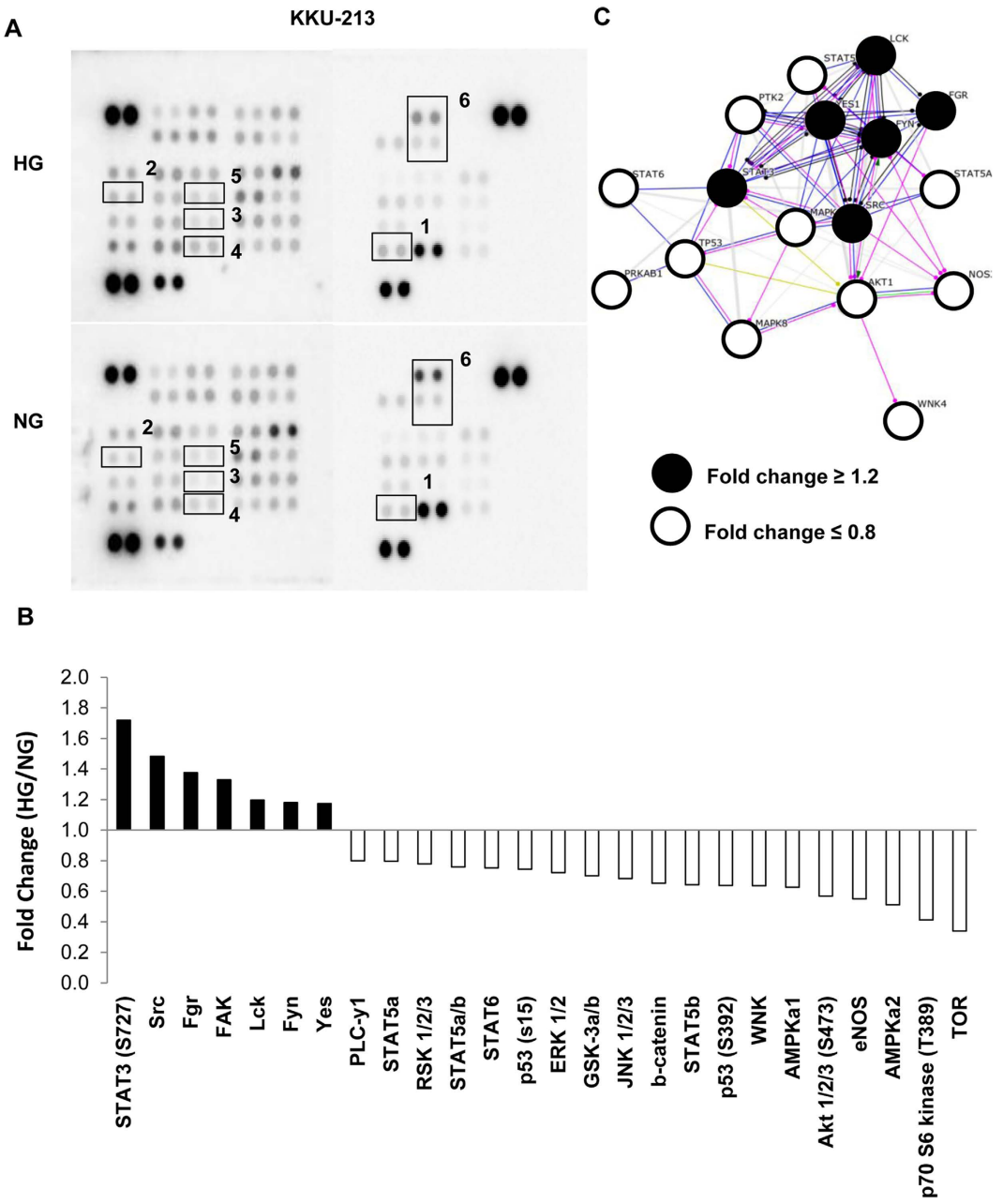


Figure 3. Differential phosphokinase profiles of HG cells vs. NG cells of KKU-213. The phosphokinase signaling (**A**) was screened in HG vs. NG cells of KKU-213 using a phospho-kinase array kit containing 46 phosphokinases. (**B**) The p-STAT3 (S727) is the dominant kinase induced by high glucose, followed by SFK and FAK. (**C**) The protein interaction prediction by String 9.1 suggests the interaction of STAT3 and SFK signaling pathways in HG cells. SFK = Src Family Kinases, FAK = focal adhesion kinase; 1 = STAT3 (S727), 2 = Src, 3 = Fgr, 4 = FAK, 5 = Lck, 6 = p53.

The effects of high glucose on cell motility and invasion were tested using the Boyden chamber assay. As shown in Fig. 2B, the migrated cells of HG cells from both KKU-213 and KKU-214 were almost double those of the NG cells ($P < 0.05$). Similar results were obtained for the invasion assay as the numbers of the invaded cells of the HG cells were significantly higher than those of NG cells ($P < 0.05$) (Fig. 2C).

The phosphokinase array revealed STAT3 as a candidate pathway induced by high glucose. To examine the possible molecular signals that were activated by high glucose and related to progression of CCA cells, the phosphokinase array containing 46 specific antibodies to phosphokinases was used to screen the phosphorylation status of multiple cellular kinases. As KKU-213 showed a strong response to the high glucose condition, therefore cell lysates from NG and HG cells of KKU-213 were used for phosphokinase array screening. When HG to NG cells, were compared, there were 7 phosphokinases activated (signals >1.2 fold) and 19 phospho-kinases inactivated (signal <0.8) (Fig. 3A,B).

Among the phosphokinases activated, p-STAT3 (S727) was the highest activated signal in HG cells, followed by the Src Family Kinases (SFKs) (Src, Fgr, Yes, Lck) and the focal adhesion kinase (FAK). Contrarily, tumor suppressor proteins, *i.e*., p-p53 and p-AMPKα were inactivated in HG cells. The interactions of these kinases were then generated using String 9.1 (http://string-db.org, accessed on October 22, 2014) (Fig. 3C) and the REACTOME pathway was analyzed using the "Enrichment demand" of STRING 9.1. These results suggest the STAT3 pathway to be dominant in HG cells (Supplementary Table 1).

High glucose promotes phosphorylation and nuclear localization of STAT3 in CCA cells. The activation of the STAT3 pathway in NG and HG cells of KKU-213 and KKU-214 was further verified by immunoblotting. As shown in Fig. 4A, the levels of p-STAT3 at both Y705 and S727 were significantly increased in HG cells while the levels of total STAT3 were not different. To ascertain the activation of STAT3 in HG cells, localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) were determined using immunocytofluorescent staining. As shown in Fig. 4B, the HG cells of KKU-213 and KKU-214 exhibited nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) whereas NG cells showed predominantly cytoplasmic localization.

CCA tissues from patients with DM exhibited high activation of STAT3. To demonstrate the association of the high glucose condition and STAT3 activation in CCA patients, the immunohistochemistry of STAT3 and p-STAT3 (S727) were performed in tumor tissues from CCA patients with various histological types (Supplementary Table 2). Age and sex matched patients were divided into two groups according to the levels of preoperative fasting blood glucose (FBG)[14] to be non-DM if FBG < 126 mg/dL ($n = 11$) and DM if FBG ≥ 126 mg/dL ($n = 9$). The ages (mean $\pm$ SD, range) of the non-DM (55 ± 20 years, 43–68 years) *vs*. DM groups (56 ± 19 years, 51–65 years) were not significantly different. The FBS levels (mean $\pm$ SD, range) of the non-DM group (83 ± 6 mg/dL, 70–96 mg/dL) *vs*. DM groups (200 ± 44 mg/dL, 133–290 mg/dL) were markedly different ($P < 0.001$). As shown in Fig. 4C,D, expression of nuclear STAT3 and nuclear p-STAT3 (S727) but not cytoplasmic STAT3 and cytoplasmic pSTAT3 (S727) of tumor tissues from CCA patients with DM were significantly higher than those with non-DM ($P < 0.05$). Regardless of the histological types of CCA, the association of blood glucose levels and STAT3 activation was tightly bound by the fact that the levels of nuclear STAT3 in tumor tissues were significantly correlated to the levels of patient blood glucose (Fig. 4E; Spearman's Rho $= 0.896$, $P < 0.01$).

Downstream target genes of STAT3 were up-regulated in the high glucose condition. To confirm the association of STAT3 activation and the aggressive phenotypes observed in HG cells, the levels of p-STAT3 and its downstream target proteins related to proliferation (cyclin D1), migration (vimentin) and invasion (matrix metalloproteinase 2; MMP2) were determined. As shown in Fig. 5, all p-STAT3 downstream target proteins tested were up-regulated in the HG cells compared with those of the NG cells.

Glucose when reduced to normal level decreases cell proliferation and STAT3 activation of CCA cells. It was further questioned as to whether glucose induced STAT3 activation can be controlled by the level of glucose. The HG cells were switched to culture in normal glucose media (N-HG). Cell proliferation and STAT3 activation of the N-HG cells were determined and compared with those of HG cells that were continued to be cultured in high glucose media (H-HG). The proliferation rate of N-HG cells was significantly reduced compared to those of H-HG ($P < 0.05$) (Fig. 6A). In addition, the levels of p-STAT3, both Y705 and S727, were significantly reduced to nearly the basal level of the NG cells when HG cells were switched to be cultured in a normal glucose condition (Fig. 6B).

STAT3 inhibitor suppresses high glucose-induced growth in CCA cells. To verify whether a STAT3 inhibitor can minimize the effects of high glucose induced growth in CCA, Stattic, a well-known inhibitor for nuclear translocation of STAT3, was used. The HG cells of KKU-213 and KKU-214 were cultured in high glucose media in the presence of 0.1 and 1 μM of Stattic. Cells without Stattic and in the presence of vehicle were used as controls. As shown in Fig. 6C, the proliferation of CCA cells treated with Stattic was significantly suppressed ($P < 0.05$) at 0.1 and 1 μM of Stattic for KKU-213 and 1 μM Stattic for KKU-214. The action of Stattic on inhibition of nuclear translocation of STAT3 and p-STAT3 (S727) was demonstrated by immunocytofluorescent staining (Fig. 6D).

Discussion

In the present study, it is shown for first time that a high glucose condition could promote the proliferation and metastatic potential of CCA cells. The phosphokinase array data suggested that STAT3 activation was the dominant pathway responsible for the glucose enhancing progression of HG cells. The downstream targets of p-STAT3, *i.e*., cyclin D1, MMP2, and vimentin were increased in HG cells, supporting the roles of p-STAT3 in increasing cell proliferation, migration and invasion. The effect of high glucose on STAT3 activation was confirmed in tissues from CCA patients with DM who had a higher activation of STAT3 than that of non-DM patients. Finally, it was demonstrated that the effects of high glucose on progression of CCA cells could be reduced by either monitoring the levels of glucose or using a STAT3 inhibitor which subsequently reduced the aggression of CCA cells.

The evidence of diabetogenic conditions, i.e. high blood glucose, enhanced the risk and progression of several cancers has been increasingly demonstrated for a decade. The growing epidemiological evidence suggests DM as a risk factor for CCA development[10,11,15], however, the effects of DM or a high glucose condition on CCA progression at the molecular level is limited.

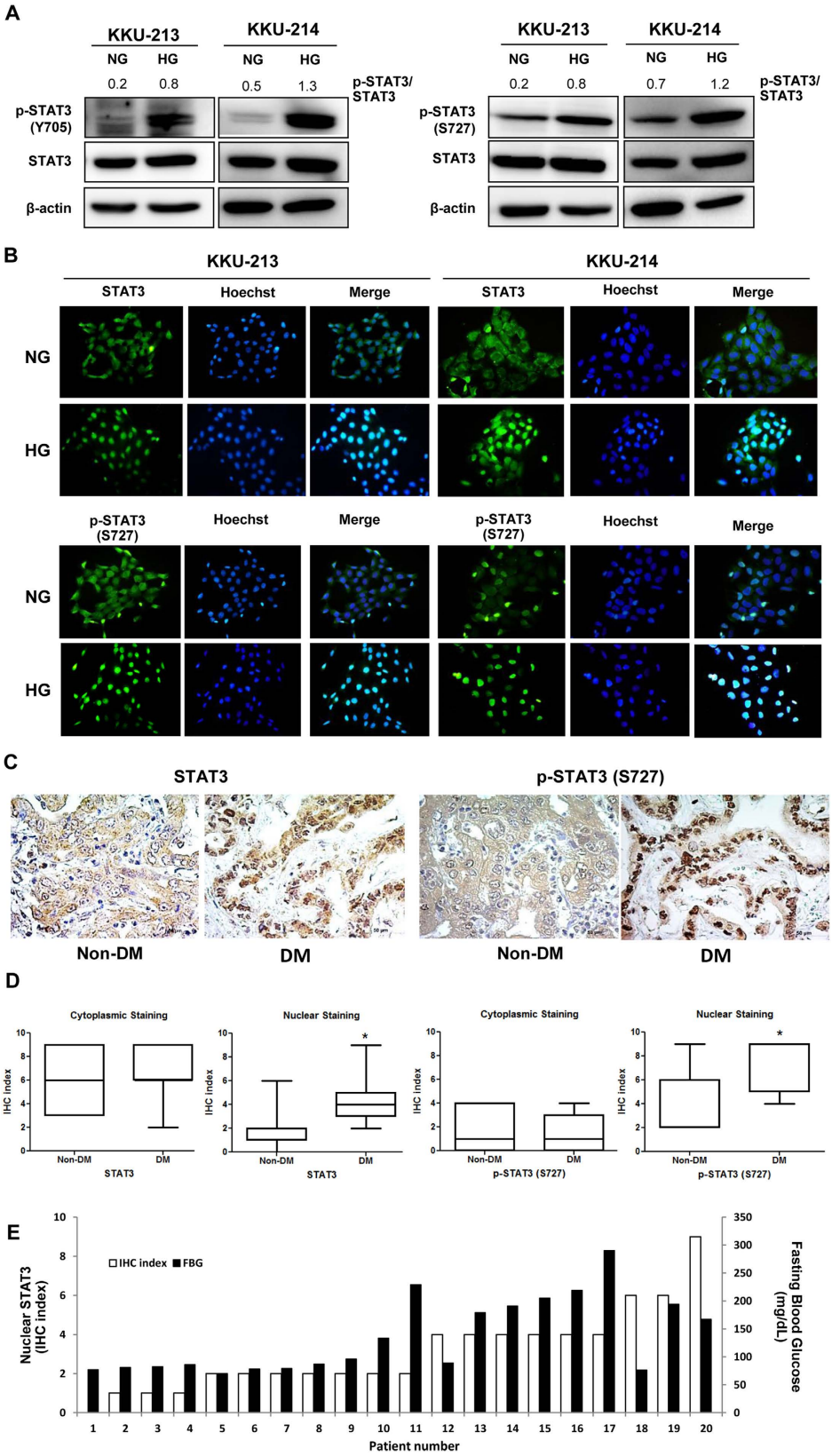


Figure 4. High glucose promotes phosphorylation and nuclear translocation of STAT3. Activation of STAT3 was verified in HG cells vs. NG cells of KKU-213 and KKU-214. (**A**) p-STAT3 of Y705 and S727 were determined using western blotting. β-Actin was used as an internal control and the numbers indicate the p-STAT3/STAT3 ratio. (**B**) Nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) was demonstrated using immunocytofluorescent staining. Hoechst staining (blue) indicates nucleus; STAT3 and p-STAT3 conjugated FITC (green) indicate cytoplasmic or nuclear localization of STAT3 and p-STAT3; and the merged image

(bright blue) indicates co-localization of STAT3 and p-STAT3 with Hoechst. (**C**) The immunohistochemistry of STAT3 and p-STAT3 in CCA patient tissues with DM ($\geq$126 mg/dL; n = 9) and no DM (<126 mg/dL; n = 11) indicates significantly higher nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) of tissues from CCA patients with DM than those without DM. (**D**) The quantification of immunohistochemistry of STAT3 and p-STAT3. (**E**) The immunohistochemistry index (IHC) of nuclear STAT3 in CCA tissues were correlated with the levels of fasting blood sugars of individual patients (Spearman's Rho = 0.896, $P < 0.01$). NG and HG = cells continuously cultured in normal and high glucose media; $^{*}P < 0.05$.

High glucose levels are a new and neglected factor that links DM and cancer as an increased risk and progression of many cancers[16,17]. High glucose can promote many "hallmarks of cancer" phenotypes such as growth, metastatic potential and induction of specific isoforms of enzymes involving the predominant aerobic glycolysis or Warburg effect[18]. It is shown in the present study that CCA cells cultured in the high glucose condition had significantly higher rates of cell proliferation, adhesion, migration and invasion than those cultured in normal glucose. Moreover, switching cells cultured from normal glucose media to high glucose media enhanced cell proliferation. Similar observations were reported in several cancers, *e.g.,* cancers of breast, pancreas, prostate and colon[19–23]. It has been well recognized that the effects of glucose on cancer progression is an alternative function of glucose other than being the energy source[24].

In the present study, comparisons of kinase signaling between CCA cells cultured in normal and high glucose conditions indicated that STAT3 activation was the dominant signaling pathway in HG cells. Phosphorylation of STAT3 at S727 and Y705 were highly activated in the cells cultured in high glucose as shown by the western blotting. The immunocytofluorescent staining of STAT3 and p-STAT3 (S727) affirmed this finding in such a way that HG cells exhibited significantly higher signals of nuclear STAT3 and p-STAT3 (S727) than the NG cells in both KKU-213 and KKU-214. The solid association of HG and STAT3 activation was strongly supported in CCA patients by the immunohistochemistry data showing that nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) in CCA patient tissues with DM was significantly higher than those without DM. Moreover, the levels of STAT3 activation in tumor tissues were impressively correlated with the levels of blood glucose of CCA patients.

To link that the progressive phenotypes observed in HG cells were under STAT3 activation, the expressions of STAT3 downstream target proteins namely cyclin D1, vimentin and MMP2 were determined and compared between NG *vs*. HG CCA cells. The expression of these 3 proteins were representative of cell proliferation activation, migration and invasion, when they were significantly increased with high glucose. Phosphorylation of STAT3 upon high glucose activation was also reported in breast cancer cells[25,26] and rat colon cancer cells[27] resulting in increased cell proliferation and motility. Besides the activation of STAT3, JAK/STAT[26,27], PI3K/AKT[29] and wnt/β-catenin[25], it was also reported to be promoted by high glucose as reported in cancers of breast, colon, pancreas and ovary. Therefore, the molecular mechanisms that responded to the activation of high glucose may be varied according to the type of cancer.

STAT3 is a transcription factor that plays important roles in the development and progression of many cancers. As a consequence, it becomes promising to be a therapeutic target of cancer treatment[28,29]. In CCA, STAT3 was reported to be a key molecule that gradually increased during the development of CCA as demonstrated in the liver fluke associated hamster model. High expressions of STAT3 and p-STAT3 (Y705) in CCA patient tissues were associated with poor prognosis. Patients with high STAT3 and p-STAT3 expression had shorter survival times than those with low expression of STAT3[30]. In addition, inhibition of STAT3 activation, significantly reduced the migratory activity of CCA cells[31]. These data suggested the association of STAT3 in the development and progression of CCA.

Apart from classical phosphorylation of Y705, the phosphorylation at S727 of STAT3 is needed for the maximal function in gene transcription[32,33]. The significant associations of p-STAT3 (S727) with tumorigenesis of prostate cancer and with the migration activity of sarcomatoid CCA[34] have been emphasized[35]. The increased phosphorylation of p-STAT3 at Y705 and S727 in the HG cells as observed in the present study may imply the maximal activation of STAT3 in response to the high glucose condition.

Besides p-STAT3 (S727), up-regulation of p-Src (Y419) and p-SFKs were also activated under the HG condition. As Src is a kinase that can phosphorylate STAT3[36], therefore increased STAT3 phosphorylation in HG cells may be, in part, stimulated by Src activation. Roles of Src and FAK in promoting proliferation and invasion were also reported in CCA[37,38]. The mechanism by which high glucose promotes progression of CCA cells via activation of STAT3 and Src is in turn the mechanism that activates the transcription of downstream target genes associated with aggressive phenotypes are summarized in Fig. 7.

The enhanced effect of high glucose on progression of CCA cells via STAT3 activation is demonstrated in the present study, both in cell lines and CCA patient tissues. Whether controlling the levels of glucose or reducing STAT3 activation could minimize the progressive phenotype, namely by inhibiting proliferation, was further explored. The proliferation rate and levels of p-STAT3 were markedly reduced to near the basal level when the HG cells were switched to culture in the normal glucose condition. The decreases of cell adhesion, migration and invasion were also expected when HG cells were cultured in normal glucose media. This expectation was based on the fact that 1) activation of STAT3 was tied to the level of glucose and 2) STAT3 regulated migration and invasion, thus inhibiting STAT3 activation using STAT3 inhibitors significantly decreased cell migration of CCA cell lines[39].

Exposure to transient to excessively high levels of glucose could trigger the changes in epigenetic modification and induce long-lasting changes of gene expression in the experienced hyperglycemia cancer cells[40]. In addition, these "hyperglycemic memory" tumor cells exhibited significantly greater aggressive behavior (growth and metastasis) than those harvested from the control, both *in vitro* and in the mouse model[41,42]. These studies indicated

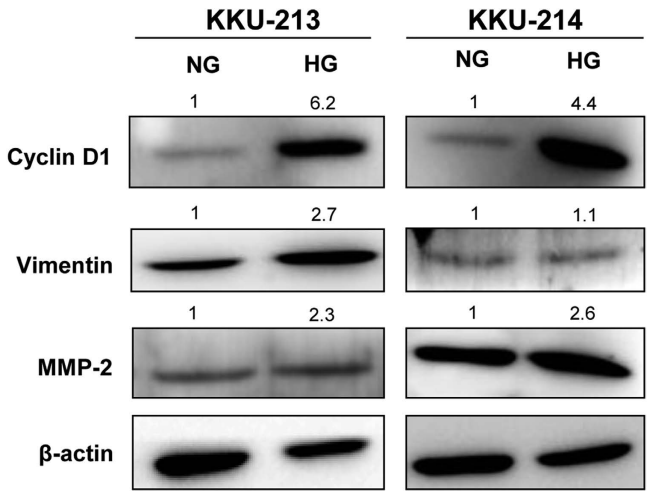


Figure 5. Downstream target genes of STAT3 related to proliferation, migration and invasion were up-regulated in HG conditions. Cyclin D1, vimentin and MMP2, the downstream targets of STAT3, were validated in NG vs. HG cells of KKU-213 and KKU-214 using western blotting. Quantification of each protein was performed using β-actin as an internal control. The expression of each protein was compared between NG and HG by giving NG = 1. The data one representation of two independent experiments. NG and HG = cells were continuously cultured in normal and high glucose media.

that the effect of high glucose on cancer progression as stated in the present study and other reports is a consistent feature and the molecular mechanisms shown in cell lines and CCA patient tissues should be consistent *in vivo*.

In the current study, Stattic, a well-known inhibitor for nuclear translocation of STAT3 significantly reduced cell growth of HG cells cultured in the high glucose conditions. These data imply the possible clinical benefit of controlling blood glucose or STAT3 activation in CCA patients who have high blood glucose. The advantage of controlling blood glucose levels was shown in hepatocellular carcinoma (HCC) patients in such a way that the HCC patients with DM who could control blood glucose had significantly lower recurrence rates than those who could not[43]. From this perspective, either controlling blood glucose or using a STAT3 inhibitor may be a promising therapeutic strategy for CCA patients who have high blood glucose levels.

On the other hand, metformin, an antidiabetic drug, has been shown to exert the antitumor activity in many cancer types[44,45] including CCA[46]. Metformin supplementation might then improve survival of CCA patients after operation[46] and reduce risk of intrahepatic CCA among persons with DM[10]. A retrospective study of 250 DM patients who were newly diagnosed for CCA, however, showed that metformin did not improve the survival of these CCA patients[47]. Whether metformin might benefit CCA patients is an issue for future investigation.

In this study, there is also the limitation that the CCA cell lines and the vast majority of CCA cases presented in this study were associated with long-standing chronic inflammation from liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection and hence, may not fully reflect CCAs with other risk factors. The effects of high glucose on progression of non-*Opisthorchis viverrini* related CCAs should be investigated.

In summary, this study highlights the enhancing effect of high glucose on progressive phenotypes of CCA cell lines. Activation of STAT3, increasing of p-STAT3 and nuclear translocation of p-STAT3, were shown to be some of the underlining mechanisms of the high glucose condition. These findings were demonstrated not only in CCA cell lines but also in CCA patient tissues. Controlling glucose levels or reducing STAT3 activation could minimize the enhancing effects of high glucose on progression of CCA, and may be of benefit in the treatment of CCA patients with high blood glucose.

Materials and Methods

Cell lines and CCA tissues. Human CCA cell lines; namely KKU-213 and KKU-214 were established from CCA patients and obtained from Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, Osaka, Japan. All cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco/Invitrogen, Calsbald, CA) with normal (N; 5.56 mM) or high (H; 25 mM) concentrations of glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco/Invitrogen) and a 1% antibiotic-antimycotic (Gibco/Invitrogen). Cells were incubated in a 37 °C, 5% CO_2, humidified incubator. All cell lines were cultured in N or H media for at least 5 passages allowing for their adaptation prior to use[48]. Cells harvested from the culture conditions for normal glucose media were designated as NG cells and those cultured in high glucose media were designated as HG cells.

Paraffin-embedded histologically proven CCA tissues (n = 20) were obtained from the specimen bank of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand. Written informed consent was obtained from each subject and the protocol has been reviewed and approved by The Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research (HE571464) based on the Declaration of Helsinki and ICH-Good Clinical Practice Guidelines. The experiments were conducted in accordance with the approved protocols.

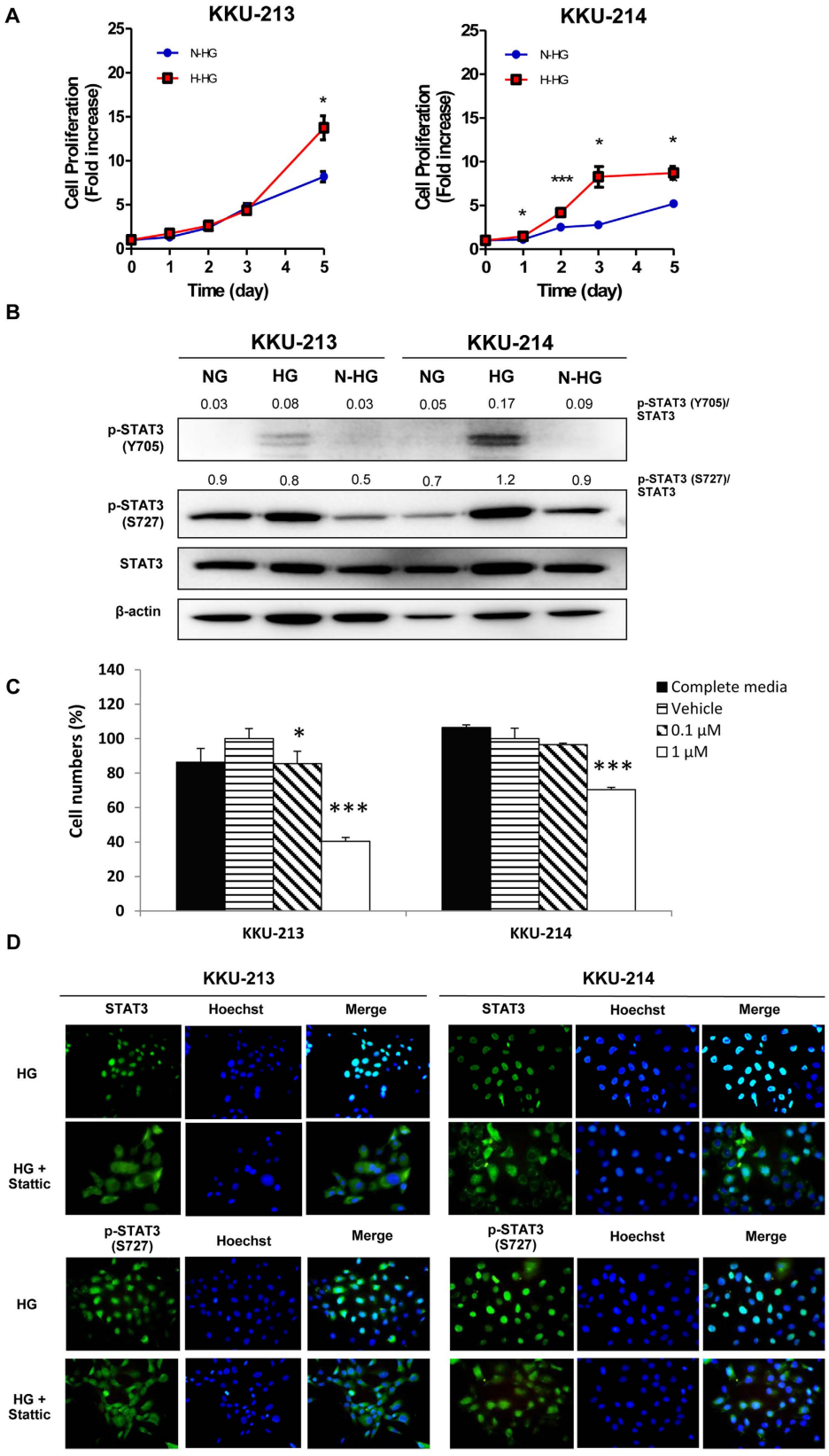


Figure 6. Controlling glucose level or using STAT3 inhibitor reduces the enhancing effect of high glucose on CCA cells. The HG cells cultured in the high glucose media (H-HG) were switched to be cultured in normal glucose media (N-HG) and compared for (**A**) cell proliferation; (**B**) expression of p-STAT3 (Y705 and S727). The numbers represent the pSTAT3 to STAT3 ratios of each band; (**C**) The treatment of Stattic (STAT3 inhibitor) significantly reduced proliferation and (**D**) inhibited nuclear translocation of STAT3 and p-STAT3 (S727) of HG cells. NG and HG = cells were continuously cultured in normal and high glucose media; $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$.

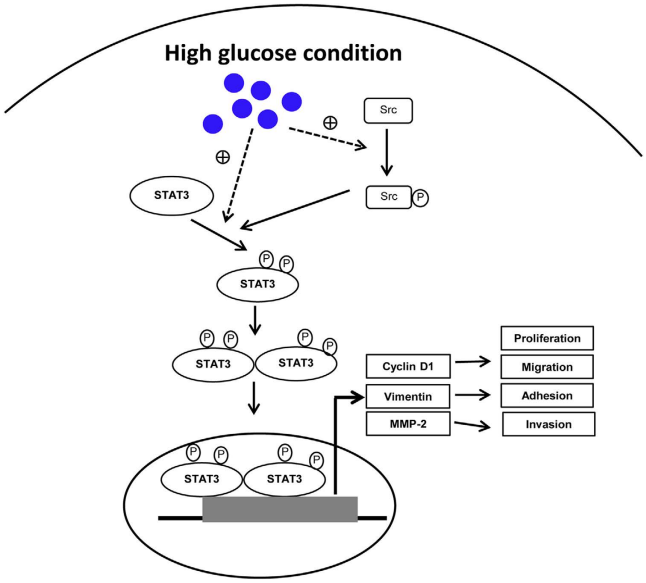


Figure 7. Molecular mechanism of high glucose promotes progression of CCA cells. High glucose levels promoted the phosphorylation and nuclear translocation of STAT3 which in turn activated the transcription of downstream target genes associated with aggressive phenotypes. High glucose also activated Src and stimulated STAT3 phosphorylation. Solid arrow = mechanism demonstrated in the present study; dashed arrow = unclarified mechanism.

Proliferation and Cytotoxic assay. Cell numbers were estimated using the MTT assay. Briefly, 3×10^3 cells/well of NG or HG cells were seeded in a 96-well plate containing normal or high glucose media and incubated for 12 h. Then the media was replaced with specified media conditions and incubated further for 1, 2, 3 and 5 days with media changing at day 3 to prevent the effect of insufficient nutrients. At the completed incubation time, media was removed and 110 μL of 0.5 mg/mL MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) in PBS was added. Cells were further incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO_2. The formazan crystals were dissolved in dimethylsulfoxide and the optical density was measured at 540 nm using a microplate reader (SUNRISE, Groedig, Austria).

A STAT3 inhibitor, Stattic (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used to inhibit the activation and nuclear localization of STAT3[49]. Cells in high glucose media were seeded into a 96-well plate and incubated overnight. Then cells were changed into the media containing 0.1 or 1 μM of Stattic and incubated for a further 72 h. The effect of Stattic on cell proliferation was examined using the MTT assay.

Adhesion assay. A 96 well-plate was pre-coated with 100 μL of 50 μg/mL of Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) at 37 °C, 5% CO_2, overnight. After blocking with 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h, cells (2×10^4 cells/well) in serum free media were seeded and allowed to adhere for 1 h at 37 °C, 5% CO_2. The adhered cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.5% crystal violet. The stain was solubilized with 2% sodium dodecylsulfate in distilled water and the absorbance was measured at OD540.

Migration and invasion assay. CCA cell lines, KKU-213 and KKU-214 (30,000 cells/well) in serum free media were seeded in the upper Transwell®chambers (Corning, Lowell, MA) with complete media as a chemoattractant in the lower chamber. The plates were incubated at 37 °C, 5% CO_2; 6 h for KKU-213 and 17 h for KKU-214. The migrated cells were fixed with 4% formaldehyde and stained with 0.1% sulforhodamine B. The migrated cells were photographed and counted under a low power microscope using Image J software (National Institutes of Health, USA).

The invasion assay was performed in the same manner as the migration assay except the upper chamber was pre-coated with 50 μg/well of Matrigel overnight before seeding cells. The invaded cells were determined after 6 h incubation for KKU-213, and 23 h for KKU-214.

Phospho-kinase array. The human phospho-kinase array kit (ARY003B, R&D system, Minneapolis, MN) containing 46 phosphokinases printed in duplication was used to screen the signaling pathway. Briefly, the 80% confluent NG or HG cells were lysed with NP-40 lysis buffer containing phosphatase- and protease-cocktail inhibitors (Roche, Mannheim, Germany) and incubated at 4 °C for 15 min. Cell lysate was obtained after centrifugation at 12,000 xg, 4 °C, for 15 min and the total protein was quantified using Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the instructions of the manufacturer. Total protein lysate (600 μg) was incubated with an antibody-array membrane at 4 °C, overnight. The membrane was then incubated with cocktail-detection antibody and streptavidin horseradish peroxidase. The signals were detected by

Chemireagent provided in the same kit and quantified using a Image Quant™ Imager (GE Healthcare Bioscience AB, Uppsala, Sweden).

Immuno-blot analysis. The antibodies used in this study were anti-vimentin (ab137231) (Abcam, Cambridge, UK), anti-β-actin (A5441) (Sigma, St. Louis City, MO), anti-STAT3 (C-20), anti-p-STAT3 (Y705) (B-7), anti-p-STAT3 (S727) (S727-R), anti-Cyclin D1 (H-295) and anti-MMP2 (H-79) (Santa Cruz Biotechnology).

Cell lysate was collected and quantified for protein concentration as mentioned above. Total protein of 30 μg was subjected to a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond™-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The membrane was probed with each primary antibody at 4 °C overnight and HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare) for 1 h at room temperature. The signals were detected using an enhanced chemiluminescence prime Western blotting detection kit (GE Healthcare). Image analysis was performed using the Image Quant™ Imager (GE Healthcare).

Immunocytofluorescent staining. CCA cells were seeded in a Matrigel pre-coated slide chamber with a density of 1×10^4 cells/well. Cells were seeded and incubated at 37 °C, 5% CO_2 for 72 h. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. Nonspecific antigens were blocked with 5% fetal bovine serum. The fixed cells were incubated with 1: 100 anti-STAT3 or anti-p-STAT3 (S727) antibodies at 4 °C overnight and FITC-conjugated secondary antibody (1: 200) (Santa Cruz Biotechnology) and 1: 10,000 Hoechst (Invitrogen, Eugene, OR), at room temperature for a further 2 h. The fluorescent imaging was obtained using a fluorescence microscope (ECLIPSE Ni-U; Nikon, Tokyo, Japan) with Nikon NIS-Elements software.

For the effect of Stattic on localization of STAT3 and p-STAT3 (S727), seeded cells were treated with 1 μM of Stattic (Santa Cruz Biotechnology) for 48 h before subjecting to the immunocytofluorescent staining.

Immunohistochemistry. STAT3 and p-STAT3 (S727) were detected in the paraffin-embedded CCA tissues using a standard immunohistochemistry protocol. Briefly, the tissues were incubated with 1: 100 of anti-STAT3 or anti-p-STAT3 (S727) at room temperature, overnight. The Envision-Plus HRP system (Dako, Carpinteria, CA) against the primary antibody was applied at room temperature for 2 h. The peroxidase activity was observed using diaminobenzidine tetrahydroxychloride solution (DAB; Dako) as a substrate, and counter stained with hematoxylin. The frequency of target molecules were semi-quantitatively scored on the basis of percentage of the positively stained cells as 0 = negative; 1–25% = 1; 26–50% = 2; and >50% = 3. The intensity of stained cells was scored as weak = 1, moderate = 2 and strong = 3. The immunohistochemistry (IHC) index was calculated as frequency × intensity.

Statistical analysis. All quantitative data are shown as mean ± SD of a representative from at least two independent experiments. Triplicate tests were performed for each experiment. The two-tail Student's *t* test was used to compare the differences between two groups. $P < 0.05$ was considered as statistical significance.

References

1. Danaei, G. *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* **378,** 31–40, doi: 10.1016/s0140-6736(11)60679-x (2011).
2. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3,** e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442 (2006).
3. Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G. & Vigneri, R. Diabetes and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **16,** 1103–1123, doi: 10.1677/erc-09-0087 (2009).
4. Giovannucci, E. *et al.* Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* **33,** 1674–1685, doi: 10.2337/dc10-0666 (2010).
5. Sithithaworn, P. *et al.* The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. *Parasitol. Int.* **61,** 10–16, doi: 10.1016/j.parint.2011.08.014 (2012).
6. Vatanasapt, V. *et al.* A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **21,** 489–494 (1990).
7. Vatanasapt, V. *et al.* Cholangiocarcinoma in north-east Thailand. *Lancet* **335,** 116–117 (1990).
8. Mairiang, E. *et al.* Ultrasonography assessment of hepatobiliary abnormalities in 3359 subjects with Opisthorchis viverrini infection in endemic areas of Thailand. *Parasitol. Int.* **61,** 208–211, doi: 10.1016/j.parint.2011.07.009 (2012).
9. Saengboonmee, C., Seubwai, W., Wongkham, C. & Wongkham, S. Diabetes mellitus: Possible risk and promoting factors of cholangiocarcinoma: Association of diabetes mellitus and cholangiocarcinoma. *Cancer Epidemiol.* **39,** 274–278, doi: 10.1016/j.canep.2015.04.002 (2015).
10. Chaiteerakij, R. *et al.* Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma: association between metformin use and reduced cancer risk. *Hepatology* **57,** 648–655, doi: 10.1002/hep.26092 (2013).
11. Palmer, W. C. & Patel, T. Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.* **57,** 69–76, doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.022 (2012).
12. Faramnuayphol, P., Chongsuvivatwong, V. & Pannarunothai, S. Geographical variation of mortality in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai* **91,** 1455–1460 (2008).
13. Liu, R. Q. *et al.* Prognosis of the intrahepatic cholangiocarcinoma after resection: hepatitis B virus infection and adjuvant chemotherapy are favorable prognosis factors. *Cancer Cell Int.* **13,** 99, doi: 10.1186/1475-2867-13-99 (2013).
14. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care 38 Suppl, S8-S16, doi: 10.2337/dc15-S005 (2015).
15. Jing, W. *et al.* Diabetes mellitus and increased risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* **21,** 24–31, doi: 10.1097/CEJ.0b013e3283481d89 (2012).
16. Duan, W. *et al.* Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *Biomed. Res. Int.* **2014,** 461917, doi: 10.1155/2014/461917 (2014).
17. Garcia-Jimenez, C., Garcia-Martinez, J. M., Chocarro-Calvo, A. & De la Vieja, A. A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/beta-catenin signaling by high glucose. *J. Mol. Endocrinol.* **52,** R51–66, doi: 10.1530/jme-13-0152 (2014).

18. Rempel, A., Mathupala, S. P. & Perdersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells: regulation of the Type II hexokinase promoter by glucose and cyclic AMP. *FEBS Lett.* **385,** 233–237 (1996).
19. Yamamoto, M., Patel, N. A., Taggart, J., Sridhar, R. & Cooper, D. R. A shift from normal to high glucose levels stimulates cell proliferation in drug sensitive MCF-7 human breast cancer cells but not in multidrug resistant MCF-7/ADR cells which overproduce PKC-betaII. *Int. J. Cancer* **83,** 98–106 (1999).
20. Takatani-Nakase, T., Matsui, C., Maeda, S., Kawahara, S. & Takahashi, K. High glucose level promotes migration behavior of breast cancer cells through zinc and its transporters. *PLoS One* **9,** e90136, doi: 10.1371/journal.pone.0090136 (2014).
21. Liu, H., Ma, Q. & Li, J. High glucose promotes cell proliferation and enhances GDNF and RET expression in pancreatic cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **347,** 95–101, doi: 10.1007/s11010-010-0617-0 (2011).
22. Li, W. *et al.* Hyperglycemia enhances the invasive and migratory activity of pancreatic cancer cells via hydrogen peroxide. *Oncol. Rep.* **25,** 1279–1287, doi: 10.3892/or.2011.1150 (2011).
23. Biernacka, K. M. *et al.* Hyperglycaemia-induced chemoresistance of prostate cancer cells due to IGFBP2. *Endocr. Relat. Cancer* **20,** 741–751, doi: 10.1530/erc-13-0077 (2013).
24. Chocarro-Calvo, A., Garcia-Martinez, J. M., Ardila-Gonzalez, S., De la Vieja, A. & Garcia-Jimenez, C. Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Mol. Cell.* **49,** 474–486, doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.022 (2013).
25. Gupta, C. & Tikoo, K. High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *J. Mol. Endocrinol.* **51,** 119–129, doi: 10.1530/jme-13-0062 (2013).
26. Lopez, R. *et al.* Hyperglycemia enhances the proliferation of non-tumorigenic and malignant mammary epithelial cells through increased leptin/IGF1R signaling and activation of AKT/mTOR. *PLoS One* **8,** e79708, doi: 10.1371/journal.pone.0079708 (2013).
27. Lin, C. Y. *et al.* Impact of high glucose on metastasis of colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.* **21,** 2047–2057, doi: 10.3748/wjg.v21.i7.2047 (2015).
28. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **9,** 798–809, doi: 10.1038/nrc2734 (2009).
29. Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R. & Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* **14,** 736–746, doi: 10.1038/nrc3818 (2014).
30. Dokduang, H. *et al.* STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* **21,** 767–776, doi: 10.1002/jhbp.131 (2014).
31. Senggunprai, L., Kukongviriyapan, V., Prawan, A. & Kukongviriyapan, U. Quercetin and EGCG exhibit chemopreventive effects in cholangiocarcinoma cells via suppression of JAK/STAT signaling pathway. *Phytother. Res.* **28,** 841–848, doi: 10.1002/ptr.5061 (2014).
32. Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J. E., Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82,** 241–250 (1995).
33. Wen, Z. & Darnell, J. E., Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* **25,** 2062–2067 (1997).
34. Hong, S. M. *et al.* Rapamycin inhibits both motility through down-regulation of p-STAT3 (S727) by disrupting the mTORC2 assembly and peritoneal dissemination in sarcomatoid cholangiocarcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* **30,** 177–187, doi: 10.1007/s10585-012-9526-9 (2013).
35. Qin, H. R. *et al.* Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation. *Cancer Res.* **68,** 7736–7741, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-1125 (2008).
36. Yeatman, T. J. A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 470–480, doi: 10.1038/nrc1366 (2004).
37. Pongchairerk, U., Guan, J. L. & Leardkamolkarn, V. Focal adhesion kinase and Src phosphorylations in HGF-induced proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line, HuCCA-1. *World J. Gastroenterol.* **11,** 5845–5852 (2005).
38. Khansaard, W. *et al.* Increased EphB2 expression predicts cholangiocarcinoma metastasis. *Tumour Biol.* **35,** 10031–10041, doi: 10.1007/s13277-014-2295-0 (2014).
39. Aneknan, P. *et al.* Luteolin arrests cell cycling, induces apoptosis and inhibits the JAK/STAT3 pathway in human cholangiocarcinoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15,** 5071–5076 (2014).
40. Pirola, L., Balcerczyk, A., Okabe, J. & El-Osta, A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6,** 665–675, doi: 10.1038/nrendo.2010.188 (2010).
41. Park, J., Sarode, V. R., Euhus, D., Kittler, R. & Scherer, P. E. Neuregulin 1-HER axis as a key mediator of hyperglycemic memory effects in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109,** 21058–21063, doi: 10.1073/pnas.1214400109 (2012).
42. Ikemura, M. *et al.* Pivotal role of oxidative stress in tumor metastasis under diabetic conditions in mice. *J. Control Release* **170,** 191–197, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.05.028 (2013).
43. Hosokawa, T. *et al.* Hyperglycemia is a significant prognostic factor of hepatocellular carcinoma after curative therapy. *World J. Gastroenterol.* **19,** 249–257, doi: 10.3748/wjg.v19.i2.249 (2013).
44. Pernicova, I. & Korbonits, M. Metformin–mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10,** 143–156, doi: 10.1038/nrendo.2013.256 (2014).
45. Sui, X. *et al.* Metformin: A Novel but Controversial Drug in Cancer Prevention and Treatment. *Mol. Pharm.* **11,** doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00577 (2015).
46. Jiang, X. *et al.* Metformin inhibits tumor growth by regulating multiple miRNAs in human cholangiocarcinoma. *Oncotarget* **6,** 3178–3194 (2015).
47. Yang, Z., Zhang, X., Roberts, R. O., Roberts, L. R. & Chaiteerakij, R. Metformin does not improve survival of cholangiocarcinoma in persons with diabetes. *Hepatology*, doi: 10.1002/hep.27821 (2015).
48. Masur, K. *et al.* Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br. J. Cancer* **104,** 345–352, doi: 10.1038/sj.bjc.6606050 (2011).
49. Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U. & Berg, T. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem. Biol.* **13,** 1235–1242, doi: 10.1016/j.chembiol.2006.09.018 (2006).

Acknowledgements

This work was co-supported by research grants from Khon Kaen University and the TRF Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund to S. Wongkham (RTA5780012), W. Seubwai (TRG5780188); and Faculty of Medicine, Khon Kaen University (I58117). C. Seangboonmee is under the supports of the BSc-PhD-MD program, Faculty of Medicine, Khon Kaen University and the Junior Science Talent Project (JSTP), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), JSTP-06-56-01E. We would like to thank Prof. James A Will for editing this manuscript via the Faculty of Medicine Publication Clinic, and Dr. K. Thepsuthammarat, Clinical Epidemiology Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand for consultation on statistical analysis.

Author Contributions

C.S., W.S. and S.W. conceived-designed experiment and wrote the manuscript. C.S. performed experiments. C.S., W.S., C.P. and S.W. analyzed data. C.S. and W.S. prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Saengboonmee, C. *et al.* High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells *via* STAT3 activation. *Sci. Rep.* **6**, 18995; doi: 10.1038/srep18995 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Received: 22 January 2016
Accepted: 18 May 2016
Published: 13 June 2016

Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-κB

Chatchai Phoomak[1,2], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2], Kanlayanee Sawanyawisuth[1,2], Wunchana Seubwai[2,3], Chaisiri Wongkham[1,2], Atit Silsirivanit[1,2] & Sopit Wongkham[1,2]

O-GlcNAcylation, an O-linked protein glycosylation with a single molecule of N-acetylglucosamine (GlcNAc), is reversibly controlled by O-GlcNAc transferase (OGT) and N-acetyl D-glucosaminidase (OGA). Aberrant O-GlcNAcylation contributes an important role in initiation and progression of many human cancers. Elevation of O-GlcNAcylation in tumor tissues and poor prognosis of cholangiocarcinoma (CCA) patients have been reported. In this study, the role of O-GlcNAcylation in promoting tumor progression was further investigated in CCA cell lines. Suppression of O-GlcNAcylation using small interfering RNAs of OGT (siOGT) significantly reduced cell migration and invasion of CCA cells whereas siOGA treated cells exhibited opposite effects. Manipulating levels of O-GlcNAcylation did affect the nuclear translocation of NF-κB and Akt-phosphorylation together with expression of matrix-metalloproteinases (MMPs). O-GlcNAcylation and nuclear translocation of NF-κB, the upstream signaling cascade of MMP activation were shown to be important for MMP activation. Immunoprecipitation revealed the elevation of O-GlcNAc-modified NF-κB with increased cellular O-GlcNAcylation. Involvement of O-GlcNAcylation in MMP-mediated migration and invasion of CCA cells was shown to be via O-GlcNAcylation and nuclear translocation of NF-κB. This information indicates the significance of O-GlcNAcylation in controlling the metastatic ability of CCA cells, hence, O-GlcNAcylation and its products may be new targets for treatment of metastatic CCA.

O-GlcNAcylation, an O-linked glycosylation of many nucleocytoplasmic proteins with a single molecule of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), is a dynamic and reversible process for adding or removal of GlcNAc onto a serine (Ser)/threonine (Thr) residue[1]. This process is regulated by the actions of two enzymes; O-GlcNAc transferase (OGT) and N-acetyl D-glucosaminidase (OGA), which catalyze O-GlcNAc addition and removal[2,3].

GlcNAc or phosphate competitively modifies the same or proximal Ser/Thr residues of several nucleocytoplasmic proteins, leading to the changes in activity or conformation of the proteins[4–6]. As a consequence, O-GlcNAcylation of a particular protein plays a significant role on its destination and function, such as phosphorylation, degradation, localization, and protein-protein interaction[7]. Therefore, O-GlcNAcylation is involved in a wide range of biological processes, such as signal transduction, transcription, cell cycle regulation, and metabolism[6–9]. Alteration of O-GlcNAcylation has been shown to participate in the pathological progression of many human diseases[4,6,7,10] including cancers. Elevations of O-GlcNAcylation have been demonstrated to be associated with the aggressiveness of many types of cancer; *e.g.*, cancers of breast[11,12], colon[13,14], liver[15], lung[13], prostate[16,17], pancreas[18], and ovary[19].

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [2]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [3]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S. (email: atitsil@kku.ac.th) or S.W. (email: sopit@kku.ac.th)

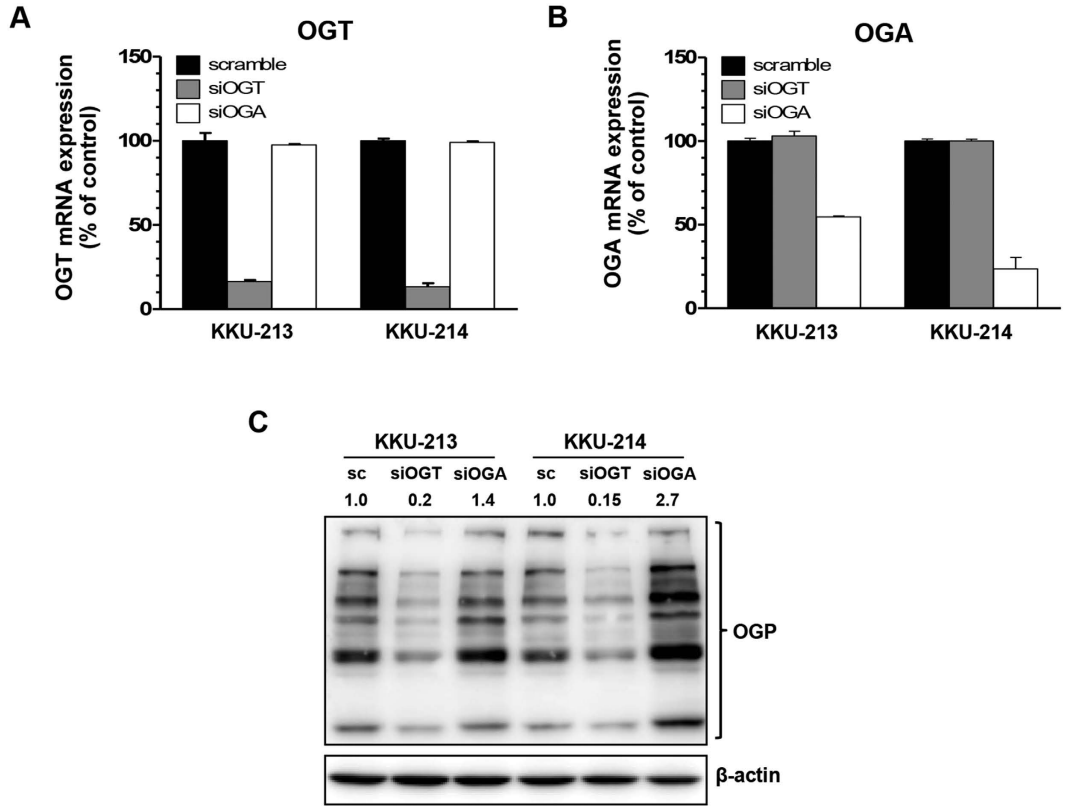


Figure 1. siOGT and siOGA could regulate O-GlcNAcylation in CCA cells. To manipulate the O-GlcNAcylation status in CCA cell lines, KKU-213 and KKU-214 cells were treated with siOGT or siOGA for 48 h. The treated cells were monitored for (**A**) OGT and (**B**) OGA expressions using real-time PCR; (**C**) O-GlcNAcylated products (OGP) using western blotting with O-GlcNAc-specific mAb (RL2). The numbers on top of the western blot represent the percentage of OGP by giving the scramble controls (sc) = 1. (**A**,**B**) are the averages from three independent experiments; (**C**) is one representative from three independent experiments.

Cholangiocarcinoma (CCA) is a rare bile duct cancer, however, the incidence of CCA is now increasing worldwide. CCA is highly metastatic which is the main cause of death of CCA patients. Understanding the molecular basis of metastasis may lead to the discovery of alternative or adjunctive and effective treatment for CCA. The elevation of O-GlcNAcylation in CCA tissues of patients was recently reported and shown to be the result of increasing OGT and decreasing OGA[20]. Moreover, high levels of O-GlcNAcylation in CCA tissues were associated with poor clinical outcomes of the patients.

In this study, the association of O-GlcNAcylation and metastasis in CCA cell lines was emphasized. Suppression of O-GlcNAcylation significantly reduced cell migration and invasion of CCA cells whereas enhancing O-GlcNAcylation exhibited the opposite effects. A molecular mechanism by which O-GlcNAcylation regulated progression of CCA cells was revealed to be via O-GlcNAcylation of NF-κB. This information indicates the significant roles of O-GlcNAcylation in controlling the metastatic ability of CCA cells and hence O-GlcNAcylation and its products may be the new targets for treatment of CCA with metastasis.

Results

O-GlcNAcylation regulates migration and invasion abilities of CCA cells. As O-GlcNAcylation, is a dynamic and reversible process regulated by OGT (addition of O- GlcNAc) and OGA (removal of O-GlcNAc), therefore, cellular O-GlcNAcylation levels can be manipulated using small interfering RNAs specific to OGT or OGA. Suppression of OGT will decrease the O-GlcNAcylation whereas suppression of OGA will increase the O-GlcNAcylation and reverse the results of OGT suppression. In this study, the roles of O-GlcNAcylation in CCA were examined in two CCA cell lines, KKU-213 and KKU-214 using the specific siRNA to OGT (GCGUGUUCCCAAUAGUGUAtt) or OGA (GUCCACAGAUGGCUCUAAAtt)[15]. After 48 h of siRNA treatment, when compared to the scramble control cells, the OGT expression was decreased to 16% in KKU-213 and 13% in KKU-214 by siOGT (Fig. 1A) and OGA expression was suppressed by siOGA to 55% in KKU-213 and 24% in KKU-214 cells (Fig. 1B). Each siRNA had no cross-effect on the other, as cells treated with siOGT had no effect on OGA expression and *vice versa*. In addition, the cellular O-GlcNAcylation represented as OGP in the western blot, was significantly suppressed by siOGT and enhanced by siOGA (Fig. 1C). Compared with the scramble control, OGP was dramatically reduced to 0.2 in KKU-213 and 0.15 in KKU-214 by siOGT and was obviously increased to 1.4 in KKU-213 and 2.7 in KKU-214 by siOGA.

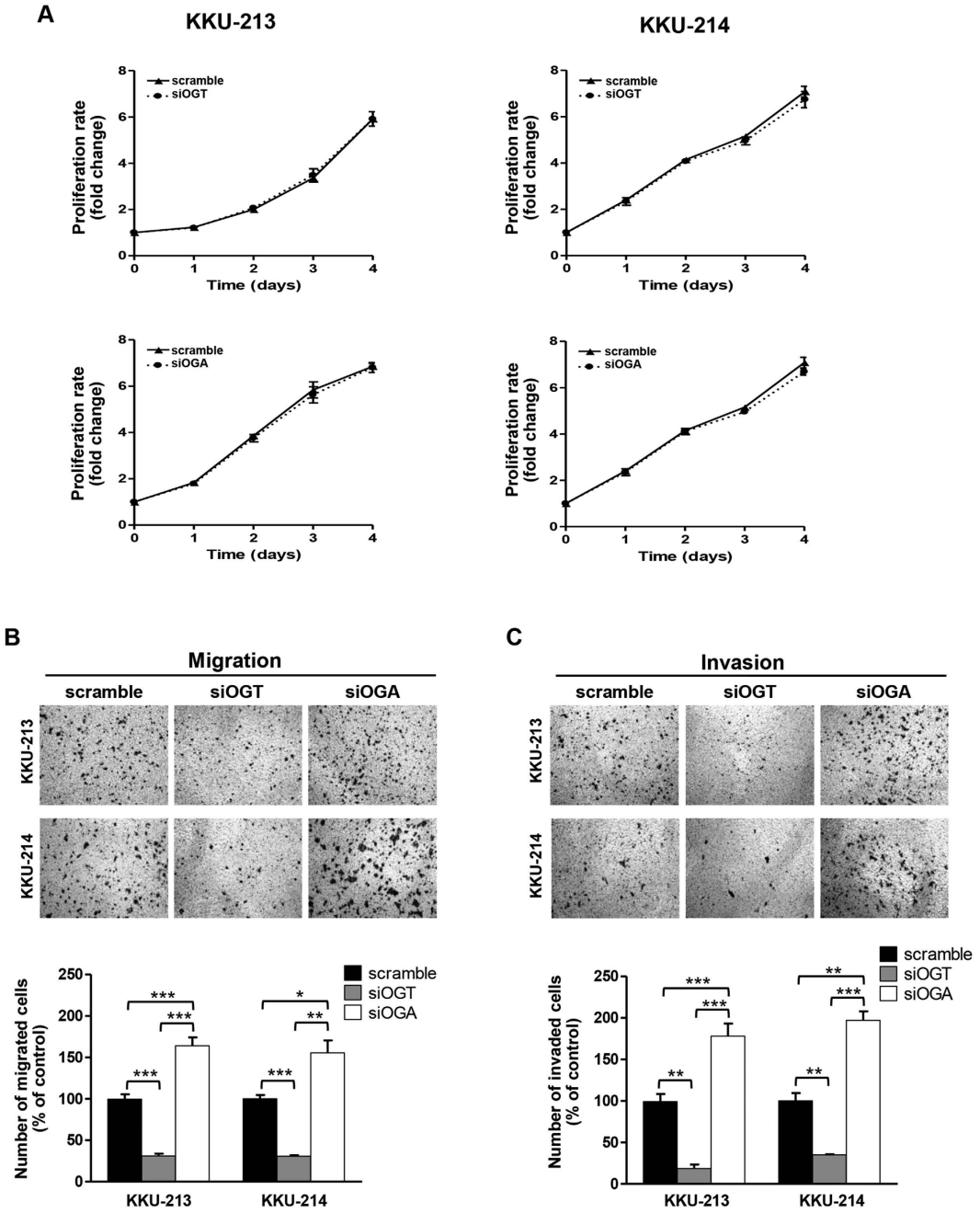


Figure 2. O-GlcNAcylation status modulated migration and invasion abilities of CCA cells. Treatment of siOGT or siOGA in CCA cell lines, KKU-213 and KKU-214, for 48 h had no effect on (**A**), cell proliferation, but significantly affected (**B**) cell migration and (**C**) invasion. The numbers of migrated and invaded cells were compared with the scramble controls (100%). The results (mean ± SEM) are the averages from three independent experiments; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

The effects of O-GlcNAcylation on cell proliferations of KKU-213 and KKU-214 cells were examined. As shown in Fig. 2A, neither treatments of siOGT or siOGA affected rates of cell proliferation. In contrast, siOGT treatment for 48 h, significantly reduced cell migration and invasion as determined by the Boyden chamber assay. Suppression of O-GlcNAcylation using siOGT could markedly decrease migratory cells to 30% (Fig. 2B), and invaded cells to 15–30% of the controls (Fig. 2C). Conversely, enhancement of O-GlcNAcylation by siOGA treatment significantly increased migration and invasion abilities to 150–180% of the controls (Fig. 2B,C).

O-GlcNAcylation modulates expressions of matrix metalloproteases. To explore the molecular mechanism by which O-GlcNAcylation regulates migration and invasion of CCA cells, the expression of 17 metastasis associated genes reported to be the downstream signaling cascades of three O-GlcNAcylated proteins, namely Akt, β-catenin and NF-κB (Fig. 3A), that were determined in siOGT and siOGA treated cells. The

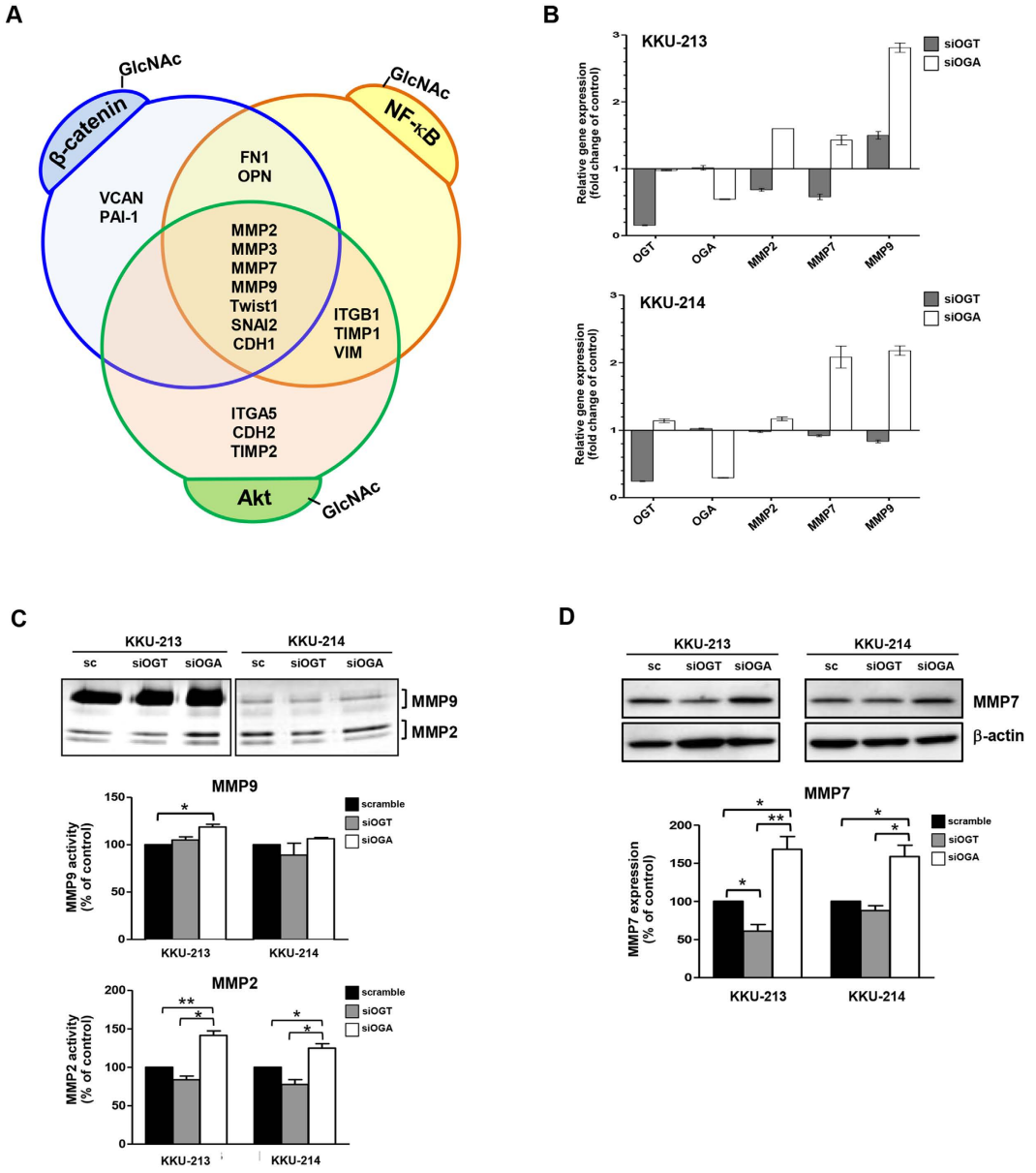


Figure 3. O-GlcNAcylation modulated progression of CCA cells via up-regulation of MMPs. The metastatic-associated genes were determined in 48 h with treated siOGT; and siOGA cells using real-time RT-PCR. (**A**) Seventeen metastatic-associated genes are grouped according to their up-stream O-GlcNAcylated regulators. (**B**) The expressions of *MMP2*, *MMP7* and *MMP9* were examined in siOGT and siOGA treated cells and compared with the scramble control cells using real-time PCR. (**C**) Validation of MMP2 and MMP9 by gelatin zymography and (**D**) of MMP7 by western blotting. The quantitative analyses are compared in each graph by using the scramble controls as 100%. The results (mean ± SEM) are the averages from three independent experiments; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

expression levels of E-cadherin (CDH1), fibronectin (FN1), integrin-α5 (ITGA5), integrin-β1 (ITGB1), MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, N-cadherin (CDH2), osteopontin (OPN), serpine 1 (PAI-1), slug (SNAI2), TIMP1, TIMP2, TWIST1, versican (VCAN), and vimentin (VIM) were examined using real time PCR, in KKU-213 cells treated with siRNA for 48 h. Genes with expression levels over 1.2 or less than 0.8 of the scramble control cells were considered to be significantly different. Genes in which expression levels were altered by siOGT treatment and reversed by siOGA treatment were selected for validation in KKU-214 cells (Supplementary Table S2). Finally, the expression levels of matrix metalloproteases (MMPs), namely MMP2, MMP7, and MMP9, were found to be suppressed. The expression levels of MMPs corresponded well with the levels of O-GlcNAcylation manipulated in both cell lines tested which indicated the strong association of MMPs and O-GlcNAcylation, therefore, the expressions of these MMPs genes were selected for further validation at the protein level. The association of O-GlcNAcylation and expression of MMPs was confirmed using the gelatin zymography assay. The activities of MMP2 were significantly reduced in siOGT and enhanced in siOGA treated cells, in both cell

lines (Fig. 3C). Similar observations were obtained for MMP7 as shown by western blotting of both cell lines (Fig. 3D). To affirm the effect of O-GlcNAcylation on promoting progression of CCA cells, the consequences of increasing O-GlcNAcylation using PUGNAc (a well-known OGA inhibitor) were studied in one more CCA cell line, KKU-100. Comparable results similar to using siOGA were obtained (Supplementary Fig. S1). Taken together, the expressions of MMP2 and MMP7 exhibited obvious and consistent associations with the levels of O-GlcNAcylation in all CCA cell lines.

Nuclear translocation of NF-κB and phosphorylation of Akt are regulated by O-GlcNAcylation. To understand the linkage of O-GlcNAcylation and MMPs expression, the upstream signaling cascades of MMP activation were further defined. As shown in Fig. 3A, PI3K-Akt, β-catenin, and NF-κB are the three suggested candidates. To demonstrate the association of these three candidates and the expression of MMPs, the activation of Akt phosphorylation (Ser473), and nuclear translocation of β-catenin and NF-κB (p65) were evaluated in the siOGT and siOGA-treated KKU-213 and KKU-214 cells. As shown in Fig. 4A, suppression of O-GlcNAcylation using siOGT effectively diminished phosphorylation of Akt in both CCA cell lines. The alteration of O-GlcNAcylation, however, did not affect the nuclear localization of β-catenin as β-catenin in the nuclear fraction was not altered by the manipulation of siOGT or siOGA (Fig. 4B). On the other hand, regulation of O-GlcNAcylation via siOGT or siOGA did affect the nuclear translocation of NF-κB. As compared to the scramble control cells, siRNA treatment did not disturb the level of total cellular NF-κB. In contrast, the nuclear NF-κB signal was significantly reduced in siOGT treated cells and opposite effects were observed in the siOGA treated cells (Fig. 4C).

To confirm the effect of O-GlcNAcylation on nuclear translocation of NF-κB, the immunocytofluorescent staining of NF-κB was examined in siOGT and siOGA-treated cells. As shown in Fig. 4D, most of the siOGT-treated cells exhibited cytoplasmic NF-κB staining, whereas most of the siOGA-treated cells possessed nuclear NF-κB signals.

Nuclear translocation of NF-κB is associated with migration/invasion and MMP7 activity of CCA cells. To test whether the nuclear translocation of NF-κB was related to migration and invasion activities of CCA cells, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a specific inhibitor of nuclear translocation of NF-κB[21], was used for this purpose. The effectiveness of DHMEQ on the inhibition of nuclear translocation of NF-κB was checked first. The immunocytofluorescent staining of NF-κB demonstrated that DHMEQ did decrease the nuclear translocation of NF-κB in the DHMEQ-treated CCA cells (Fig. 5A). On the other hand, DHMEQ treatment did not affect the global O-GlcNAcylation or disturb the cellular expression of NF-κB as determined by western blots (Fig. 5B). The effects of DHMEQ on migration and invasion activities of CCA cells were assessed next. The numbers of migrated and invaded cells were significantly reduced in the DHMEQ treated cells compared with the vehicle control cells (Fig. 5C). The DHMEQ treatment also suppressed the expression of MMP7 as shown by western blot (Fig. 5D). Taken together, nuclear translocation of NF-κB had a positive correlation with migration/invasion and MMP7expression of CCA cell lines.

NF-κB was modified by O-GlcNAc and modulated by cellular O-GlcNAcylation. In this study, it was shown that O-GlcNAcylation did affect the nuclear translocation of NF-κB which in turn regulated cell migration and invasion via MMP expression. To affirm that NF-κB was O-GlcNAcylated, the immunoprecipitation of NF-κB (p65) was performed and verified with western blotting against O-GlcNAc specific mAb (RL2). The reciprocal immunoprecipitations of O-GlcNAcylated proteins with O-GlcNAc specific mAb and verified with NF-κB western blotting were also performed. To enhance the O-GlcNAcylation in CCA cells, cells were first treated with PUGNAc before the immunoprecipitation assay. The efficiency of PUGNAc on OGP enrichment was demonstrated by OGP western blot as shown in Fig. 6A. The migration and invasion of PUGNAc treated cells were observed as compared with vehicle control cells. PUGNAc treatment significantly induced the migration and invasion abilities of CCA cells similar to the siOGA treatment (Fig. 6B).

The specificity of the antibodies used in the immunoprecipitation assay were clarified using cell lysates treated with isotype-immunoglobulin as controls. As shown in Fig. 6C, NF-κB was identified in the immunoprecipitation of O-GlcNAcylated proteins from PUGNAc treated cells. In parallel, O-GlcNAc modification was identified in the immunoprecipitate of NF-κB. These results indicated that NF-κB was modified by O-GlcNAc and cellular O-GlcNAcylation modulated the level of O-GlcNAc-modified NF-κB.

Discussion

Evidence from many studies indicates the positive association of O-GlcNAcylation and progression of cancer through *e.g.*, growth, apoptosis resistance, migration, invasion, and angiogenesis of cancer[22–24]. Recently, elevation of O-GlcNAcylation in tumor tissues of CCA patients was reported in association with poor clinical outcomes[20]. In the current study, the association of O-GlcNAcylation with progression, migration and invasion, of CCA and the insights underlining the mechanisms are reported.

In this current study, specific siOGT and siOGA were used to suppress or enhance the O-GlcNAcylation status in two CCA cell lines. The involvement of O-GlcNAcylation and progression of CCA cells were demonstrated by the fact that suppression of O-GlcNAcylation using siOGT significantly decreased migration and invasion of CCA cell lines and the opposite observations were obtained when cells were treated with siOGA. This finding seems to be a shared feature of cancer cells. The association of O-GlcNAcylation and metastasis has been reported in many types of cancers. The *in vitro* functional analysis of HepG2, a hepatoma cell line, showed that migration and invasion abilities of the cells were significantly decreased after suppression of O-GlcNAcylation by siOGT and were increased after enhancing O-GlcNAcylation by siOGA[15]. Moreover, silencing of OGT significantly suppressed the *in vivo* lung metastasis of the 4T1 breast cancer cell line[25].

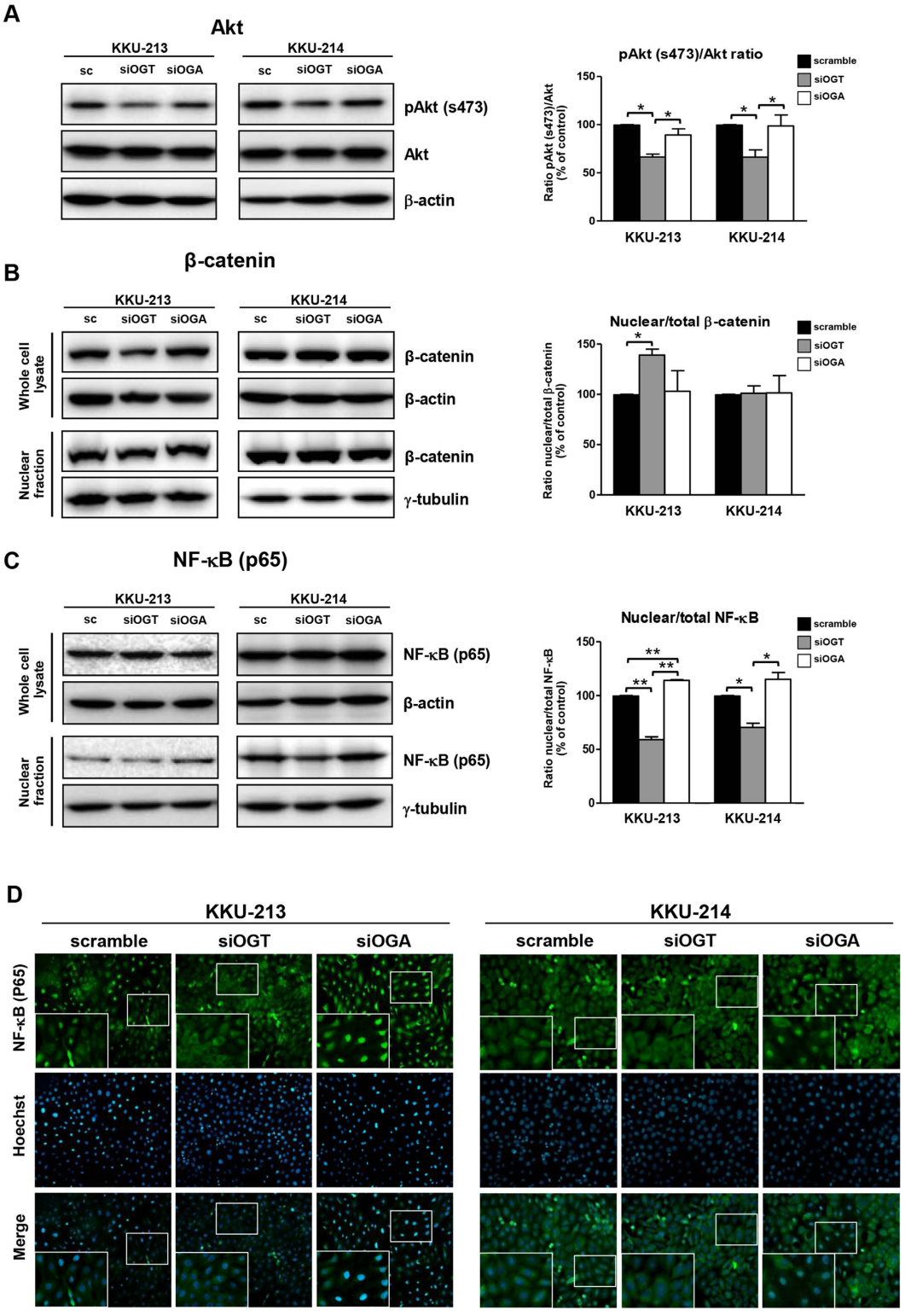


Figure 4. NF-κB nuclear translocations and Akt phosphorylations were associated with O-GlcNAcylation. The activations of Akt, β-catenin and NF-kB were determined in 48 h treated siOGT; and siOGA cells. (**A**) Total Akt and phosphorylated-Akt were determined by western blot analysis. (**B**) Total cellular and nuclear β-catenin and (**C**) NF-κB were examined by western blotting. (**D**) Cellular localization of NF-κB (green) is demonstrated by immunocytofluorescent staining; nuclei (blue) are stained with Hoechst 33342. The quantitative analyses are compared in each graph by using the scramble control as 100%. The results (mean ± SEM) are the averages from three independent experiments; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

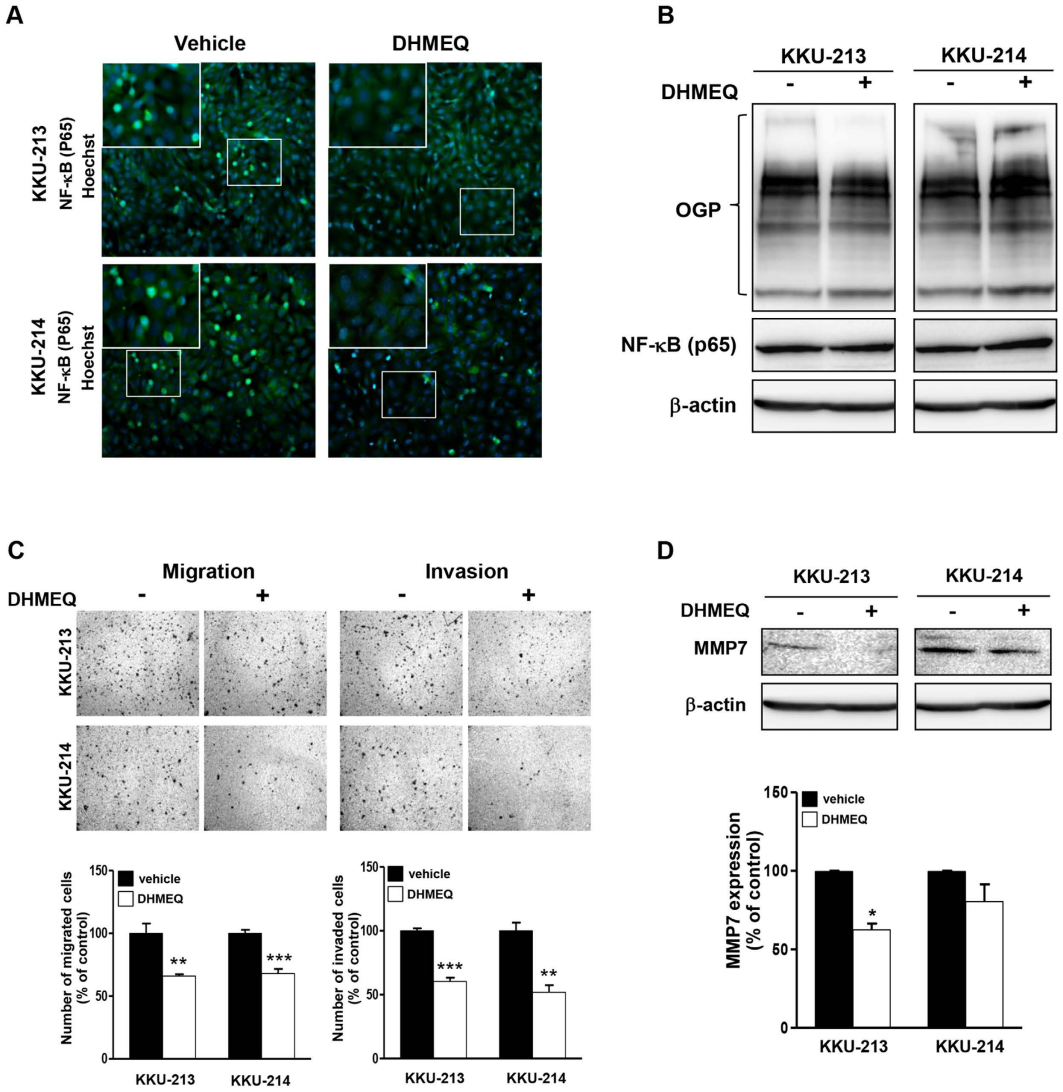


Figure 5. Migration and invasion of CCA cells were reduced by DHMEQ, a specific inhibitor of nuclear translocation of NF-κB. (**A**) The inhibition effect of DHMEQ on the nuclear translocation of NF-κB was confirmed by immunocytofluorescence. (**B**) DHMEQ had no effect on cellular OGP and NF-κB as determined by western blotting. (**C**) DHMEQ inhibited cell migration and invasion compared with the vehicle control cells. (**D**) Western blotting indicates that MMP7 expression was suppressed in the presence of DHMEQ. The data (mean ± SEM) in (**A**,**B**) represent one of two independent experiments. The quantitative analyses are compared in each graph by using the vehicle control as 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

The association of increased O-GlcNAcylation and enhancement of tumor growth as well as proliferation of cancer cells have been reported in many cancers[11,26,27]. O-GlcNAcylation of glucose 6 phosphate dehydrogenase promoted cell proliferation in lung cancer both *in vitro* and *in vivo*[26]. Knockdown of OGT significantly suppressed *in vitro* colony formation and *in vivo* tumor formation of the MDA-MB-231 breast cancer cell line[11].

Manipulating the level of O-GlcNAcylation using siOGT and siOGA in CCA cells did affect the expression of many metastasis associated genes including MMPs, however, only the expression of MMP7 exhibited a significant response and corresponded well with the level of O-GlcNAcylation in both CCA cell lines. Increasing MMP expression may be the common signaling pathway in response to the elevation of O-GlcNAcylation, as the decrease of MMPs expression after OGT inhibition was repeatedly reported in several cancers such as breast cancer[11] and prostate cancer[16]. Similarly, the increase of O-GlcNAcylation by OGA inhibition induced the expressions of MMPs in the HepG2 hepatoma cell line[15].

The mechanism by which O-GlcNAcylation participates in metastasis is not completely understood. Integrated information of O-GlcNAcylated proteins from the dbOGAP database (http://cbsb.lombardi.georgetown.edu/OGAP.html) and the signaling pathways revealed three upstream signaling cascades of MMP activation, PI3K-Akt, Wnt/β-catenin and NF-κB[28–32], that are O-GlcNAc modified. To find out which of these O-GlcNAcylated proteins was involved in the signaling cascade of MMP activation, the activations of Akt, β-catenin and NF-κB, were investigated. The results indicated that suppression of O-GlcNAcylation

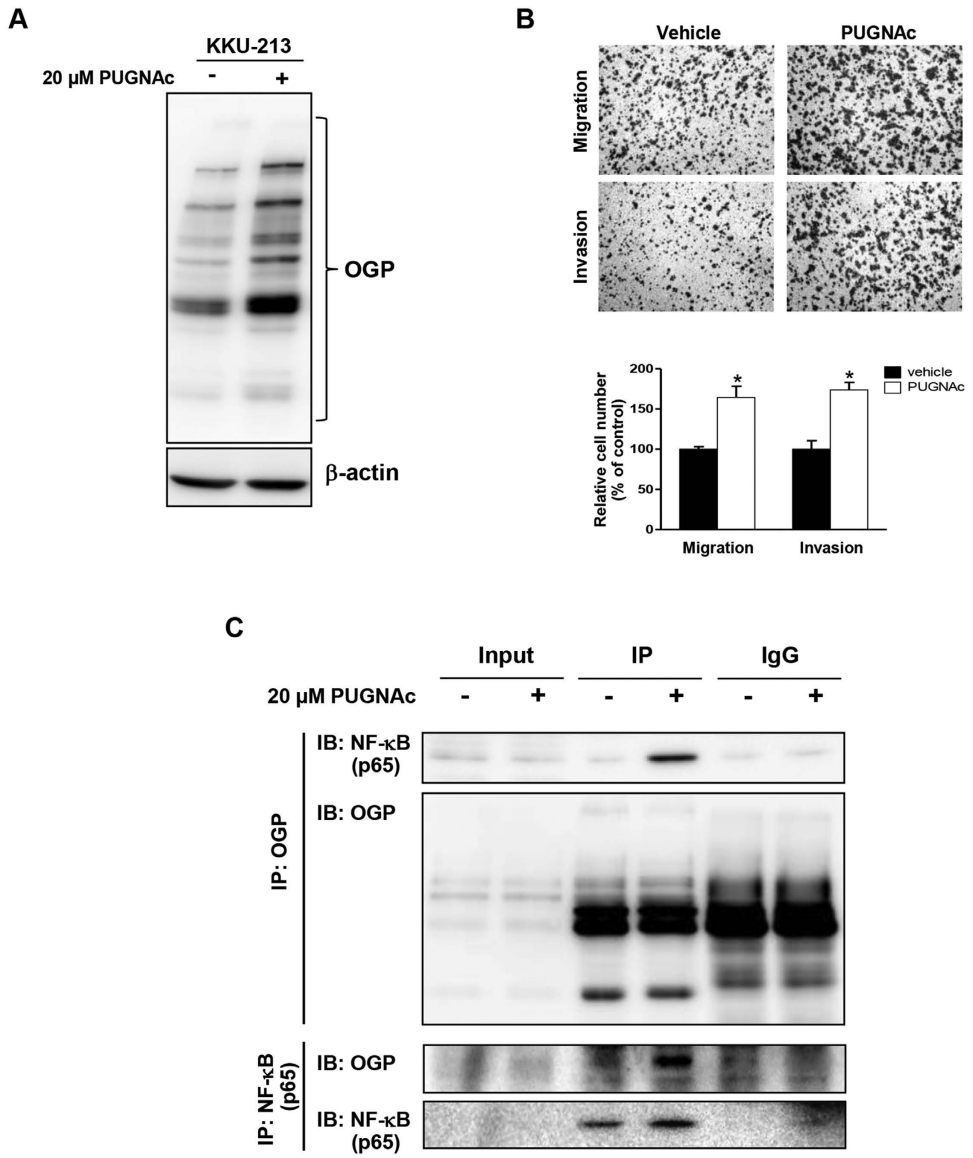


Figure 6. NF-κB was O-GlcNAcylated and modulated by cellular O-GlcNAcylation. (**A**) Western blot of OGP demonstrates the enhanced O-GlcNAcylation in KKU-213 cells using 20 μM PUGNAc. (**B**) The migration and invasion abilities of PUNAc treated cells were increased compared with vehicle control cells. The data shown are one representative from two independent experiments. (**C**) Cell lysates from cells treated (+) or untreated (−) with PUGNAc were subjected to immunoprecipitation using anti-OGP followed by western blot analysis with anti NF-κB; the *vice versa* experiments were also performed. The data are one representative from three independent experiments. The quantitative analyses (mean ± SEM) are compared in each graph by using the vehicle control as 100%. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

in siOGT-treated cells significantly reduced the Akt phosphorylation and nuclear translocation of NF-κB. This observation was confirmed by the fact that enhancing O-GlcNAcylation in siOGA treated cells gave the opposite observations with siOGT treated cells. These results suggested Akt and NF-κB to be the upstream O-GlcNAc-modified proteins responsible for MMP activation. Moreover, the essential role of O-GlcNAcylation for nuclear translocation of NF-κB was confirmed by the NF-κB imunocytofluorsecent staining data. These findings are in agreement with previous reports. The importance of O-GlcNAcylation on nuclear translocation of NF-κB and the consequential transcriptional activation has been shown in Caco2 cells[27,33].

The associations of nuclear translocation of NF-κB and the increased migration/invasion and activation of MMP expression observed in siOGA treated cells were further elucidated. DHMEQ, a well-known inhibitor of nuclear translocation of NF-κB, was used as the model. These data clearly showed that DHMEQ had no effect on either cellular O-GlcNAcylation or NF-κB expression but strongly inhibited nuclear translocation of NF-κB and consequently suppressed cell migration/invasion and MMP7 expression. To tie the connection of O-GlcNAcylation and NF-κB, it was next demonstrated that NF-κB was, in fact, O-GlcNAcylated in the study model. Immunoprecipitation experiments using an antibody specific to NF-κB and probed with an antibody

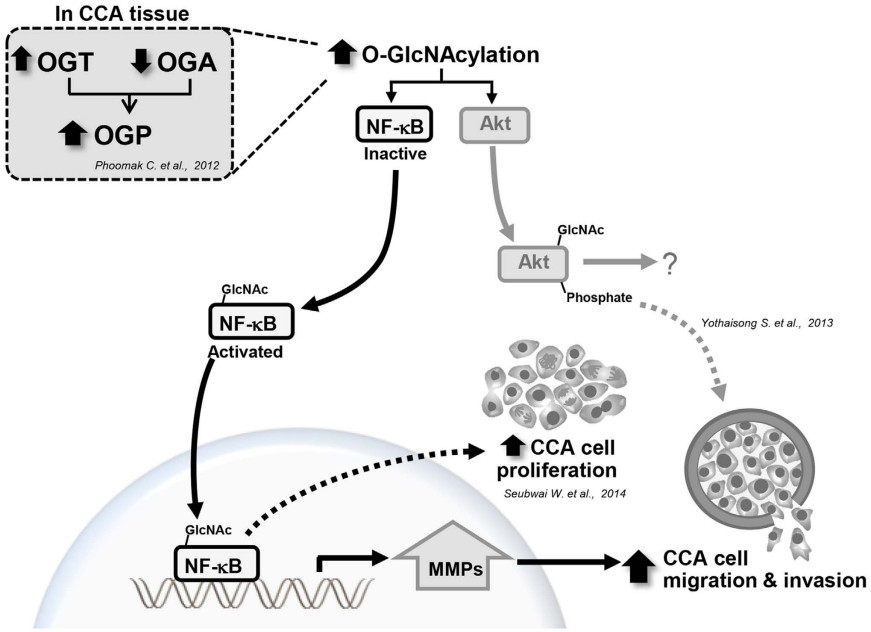


Figure 7. Schematic diagram depicts the mechanism by which O-GlcNAcylation promotes metastasis of CCA cells via modulating the nuclear translocation of NF-κB and MMPs expression. The increase of OGT and decrease of OGA expression leading to the elevation of OGP was found in tumor tissues of CCA patients. The elevation of O-GlcNAcylation activates NF-κB and Akt signaling pathways. As shown in this study, O-GlcNAcylation of NF-κB is necessary for nuclear translocation and the consequential transcriptional activation of the down-stream signaling of NF-κB. Expression of MMP7 was demonstrated to be one of the NF-κB down-stream signaling pathways that is involved with cell migration/invasion. Solid arrows indicate the findings from this study; dashed arrows indicate the findings from other reports.

against O-GlcNAcylated proteins; and *vice versa* were performed. The results confirmed that NF-κB was O-GlcNAcylated and regulated via manipulation of cellular O-GlcNAcylation.

The results together suggested that elevation of O-GlcNAcylation could enhance migration/invasion ability of CCA cells by sequential reactions as defined in this study: 1) increasing of cellular O-GlcNAcylation increases the O-GlcNAcylation of transcriptional factor NF-κB and the signaling protein (Akt); 2) O-GlcNAc modification activates the nuclear translocation of NF-κB and the phosphorylation of Akt; 3) the transcriptional activation of downstream signaling increases MMP expression and results in 4) the increasing of cell migration and invasion. The schematic outline of this proven mechanism is depicted in Fig. 7.

The findings from this study expand the understanding of O-GlcNAcylation and metastasis in CCA as a whole. Elevation of O-GlcNAcylation in tumor tissues was reported in association with poor survival of CCA patients[20]. The underlining mechanism is shown, in part, via the O-GlcNAcylation/activation of NF-κB and Akt. These two signaling pathways were shown to be essential for metastasis of CCA[21,34]. Activation of NF-κB should be a good target for CCA treatment as more than 70% of tumor tissues of CCA patients had high expressions of NF-κB[21]. In addition, inhibition of NF-κB activation significantly induced cell apoptosis in CCA cells, as demonstrated *in vitro* and *in vivo*[21]. Moreover, O-GlcNAcylation of NF-κB, at Thr-322 and Thr-352, has been revealed as an important mechanism to control its nuclear translocation. This specific O-GlcNAcylation may be a novel molecular target inhibitor of NF-κB and consequently CCA metastasis.

Besides the nuclear translocation of O-GlcNAcylated NF-κB, the effect of O-GlcNAcylation on Akt-phosphorylation that may regulate MMP expression and metastasis of CCA should be further studied. Similar observations were also reported in other cancer cells. Enhancement of O-GlcNAcylation by PUGNAc or siOGA induced the phosphorylation of Akt at ser-473 and increased the proliferation of thyroid anaplastic cancer cells[35] whereas the increase of O-GlcNAcylated Akt conferred chemo-resistance in breast cancer-derived MCF-7 cells[36].

The modification of proteins by O-GlcNAcylation, especially the transcription factors, is an important process for cell homeostasis. As a consequence, alteration of O-GlcNAcylation participates in the pathological progression of many human diseases including cancers. Understanding O-GlcNAcylation in a particular disease may lead to a novel target for the disease control. In this study, progression of CCA cells, namely in migration and invasion, was enhanced with the increase of O-GlcNAcylation. The observation was tightly regulated by O-GlcNAcylation which was proven in part via the NF-κB signaling pathway. O-GlcNAcylation of NF-κB is essential for nuclear translocation of NF-κB which subsequently activates the transcription of MMPs, the key protease enzymes facilitating metastasis of CCA. Determination of O-GlcNAcylated proteins in highly metastatic CCA cell lines is undertaken to uncover the target proteins modulated by O-GlcNAcylation. O-GlcNAcylation and its products may be the new targets for treatment of CCA with metastasis.

Materials and Methods

Cell culture and treatment. CCA cell lines (KKU-213 and KKU-214), were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCBR) Cell Bank, Osaka, Japan. The cell lines were cultured in F-12 Nutrient Mixture (Ham's F-12) (Gibco, NY) containing 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. Transient enhancement of O-GlcNAcylation was performed using OGA inhibitor [O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidenamino)-N-phenylcarbamate; PUGNAc]. Cells were incubated with 20 μM PUGNAc (Sigma Aldrich, St. Louis, MO.) for 1 h before subjecting them to further experiments. Inhibition of nuclear translocation of NF-κB was employed by incubating cells with 2.5 μg/ml dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)[21].

Suppression of OGT and OGA expression by specific-siRNAs. Suppression or enhancing O-GlcNAcylation in CCA cell lines was performed using si-RNA specific to OGT or OGA[15]. CCA cell lines (2×10^5 cells/well) were cultured in a 6-well plate for 24 h then transfected with 100 pmole of siOGT or siOGA using 2 μg/ml of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, NY) according to the recommendations from the manufacturer. Excess transfection complex was removed after 6 h and cells continued to be cultured in 10% FBS in Ham's F-12 for the subsequent experiments. Control experiments were performed using cells treated with siControl (Negative Control siRNA, 1027310, Qiagen).

Cell migration and invasion. Migration and invasion were analyzed using the Boyden chamber assay with transwell cell culture inserts (8.0 μm pore size, Corning Incorporated, Corning, NY). Inserts pre-coated overnight with 100 μl of 0.4 mg/ml of basement membrane matrix (BD MatrigelTM, BD biosciences) were used for the invasion assay. siRNA-treated or control cells (4×10^4 cells/well) were allowed to migrate or invade for 9 h for KKU-213 and 24 h for KKU-214. Non-migrated/invaded cells were scraped out, and the migrated and invaded cells were stained with 0.4% sulforhodamine B in 0.1% acetic acid. Cells were counted under the microscope using a 10X objective lens with 5 microscopic fields/samples. Experiments were performed in duplicate; the data presented are the averages from three independent experiments.

Cell proliferation. Cell proliferation was measured at 24, 48, 72, and 96 h using the MTT proliferation assay (Moleular probes, Eugene, OR) according to the manufacturer's guidelines. Briefly, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT reagent) was added into each well to obtain the final concentration of 0.5 mg/ml. After 4 h incubation, 0.04 N HCl in isopropanol was added to dissolve the insoluble formazan complex and the absorbance at 540 nm was measured. Cell numbers (% of control) were calculated as (OD of treatment × 100)/mean OD of control.

Nuclear fractionation. The nuclear fraction was extracted as previously described[37]. Briefly, cells were washed by cold PBS, and harvested in cell lysis buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, and 0.5 mM DTT). The nuclear pellets were collected, washed twice with ice cold PBS and lysed with nuclear lysis buffer (20 mM HEPES–KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT). Protein concentrations were determined and kept at −20 °C until analysis. Phosphatase inhibitor (PhosStop; Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), protease inhibitor (Complete Mini, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), and OGA inhibitor (5 μM PUGNAc) were added at every step.

SDS-PAGE and Western blot analysis. Total protein was extracted from CCA cell lines using 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.4 containing phosphatase inhibitor, protease inhibitor, and 5 μM PUGNAc. Protein (30 μg) was solubilized in the sample loading medium (SM; 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β-ME, 10% Glycerol, and 0.01% Bromphenol blue), separated by SDS-PAGE according to Laemmli[38], and electro-transferred onto a PVDF membrane using Bolt and Marhoney transferring buffer (40 mM Tris base, 20 mM sodium acetate, 2 mM EDTA, pH 7.4, 20% methanol, and 0.05% SDS)[39]. Immunodetection of particular proteins was performed using specific monoclonal antibodies as follow; 1:200 of anti-OGT and anti-MMP7 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); 1:400 of anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories, New Jersey); 1:1000 of anti-NF-κB (p65) (Santa Cruz), anti-β-tubulin (Santa Cruz, CA), anti-O-GlcNAc (RL2, Pierce Biotechnology, IL), anti-Akt and anti-pAkt (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). The immunoreactivity was detected with the ECLTM Prime Western Blotting Detection System (AmershamTM, Buckinghamshire, UK) and analyzed using an ImageQuant LAS 4000 mini image analyzer and ImageQuant™ TL analysis software (GE healthcare, Buckinghamshire, UK).

RNA extraction and real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Ambion) and converted to cDNA using the high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reactions were performed using cDNA converted from 40 ng of total RNA, 0.4 μM of forward- and reverse-primers (Supplementary Table S1), and LightCycle 480® SYBR green I master mix (Roche Diagnostic). PCR was performed in the LightCycle 480® real-time PCR system (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) with a slight modification from that previously described[40]. The annealing at 60 °C for 10 sec and the PCR reaction was ended with a final extension at 72 °C for 10 min. The gene expression level was relatively quantified from duplicated samples using LightCycle 480® Relative Quantification software (Roche Diagnostic). β-2microglobulin (B2M) was used as an internal control[41].

Gelatin zymography. The gelatin zymography was performed as previously described[42]. In brief, after 48 h of siRNA treatment, cells in 6 well plates were washed and maintained in 800 μl serum free medium for 24 h then 200 μl of conditioned medium collected and concentrated by a CentriVap centrifugal concentrator (Labconco, Kansas, MO). Samples were reconstituted with 20 μl of 1X sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromphenal blue) and separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel containing 0.1%

gelatin using Leammli buffer. After washing, gelatinase activity was stimulated by incubation overnight in 50 mM Tris PH 7.4, 5 mM $CaCl_2$, 1 μM $ZnCl_2$, 0.01% NaN_3 at 37 °C and stained with 0.5% Coomassie blue R250.

Immunocytofluorescence. After treatment, cells were fixed with 4% paraformadehyde and permeabilized using 0.2% Triton X-100. After blocking the non-specific binding with 5% FBS in PBS, cells were incubated with 1:100 anti-NF-κB (Santacruz) at 4 °C, overnight. The reactivity was detected by incubation with 1:100 anti-rabbit-IgG-FITC (Santa Cruz) for 1 h at room temperature. Nuclei were stained with 1:10,000 Hoechst 33342 (Molecular probe, invitrogen, UK) and the fluorescence signal was observed under the Nikon fluorescence microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Immunoprecipitation. Cells were lysed by lysis buffer containing 25 mM HEPES, 10 mM $Na_4P_2O_7.10H_2O$, 100 mM NaF, 5 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4, 1% Triton X-100, and 5 μM PUGNAc. Cell lysates (385 μg) were immunoprecipitated with 2 μg anti-O-GlcNAc (RL2) at 4 °C, overnight. Protein-G sepharose beads were added and continually rotated for 2 h. After complete rotation, the mixtures were centrifuged at 5,000 rpm for 5 min; the precipitated-beads were subsequently washed 5 times with lysis buffer. After washing, the bound proteins were solubilized with SM-buffer, then subjected to SDS-PAGE and western blotting.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® 5.0 software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA). Student's t-test was used to compare the ability of cells on particular functions between treatments and controls. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

References

1. Torres, C. R. & Hart, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* **259,** 3308–17 (1984).
2. Haltiwanger, R. S., Holt, G. D. & Hart, G. W. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* **265,** 2563–8 (1990).
3. Dong, D. L. & Hart, G. W. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* **269,** 19321–30 (1994).
4. Hart, G. W., Housley, M. P. & Slawson, C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446,** 1017–22 (2007).
5. Hu, P., Shimoji, S. & Hart, G. W. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett* **584,** 2526–38 (2010).
6. Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G. & Lagerlof, O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* **80,** 825–58 (2011).
7. Zachara, N. E. & Hart, G. W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta* **1761,** 599–617 (2006).
8. Ruan, H. B., Singh, J. P., Li, M. D., Wu, J. & Yang, X. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **24,** 301–9 (2013).
9. Singh, J. P., Zhang, K., Wu, J. & Yang, X. O-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics. *Cancer Lett* **356,** 244–50 (2015).
10. Butkinaree, C., Park, K. & Hart, G. W. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* **1800,** 96–106 (2010).
11. Caldwell, S. A. *et al.* Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* **29,** 2831–42 (2010).
12. Champattanachai, V. *et al.* Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics* **13,** 2088–99 (2013).
13. Mi, W. *et al.* O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* **1812,** 514–9 (2011).
14. Yehezkel, G., Cohen, L., Kliger, A., Manor, E. & Khalaila, I. O-linked beta-N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* **287,** 28755–69 (2012).
15. Zhu, Q. *et al.* O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* **29,** 985–93 (2012).
16. Lynch, T. P. *et al.* Critical role of O-Linked beta-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* **287,** 11070–81 (2012).
17. Kamigaito, T. *et al.* Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **17,** 18–22 (2014).
18. Ma, Z., Vocadlo, D. J. & Vosseller, K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-kappaB activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **288,** 15121–30 (2013).
19. Jin, F. Z., Yu, C., Zhao, D. Z., Wu, M. J. & Yang, Z. A correlation between altered O-GlcNAcylation, migration and with changes in E-cadherin levels in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res* **319,** 1482–90 (2013).
20. Phoomak, C. *et al.* Overexpression of O-GlcNAc-transferase associates with aggressiveness of mass-forming cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* **13** Suppl, 101–5 (2012).
21. Seubwai, W. *et al.* Aberrant expression of NF-kappaB in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy. *PLoS One* **9,** e106056 (2014).
22. Fardini, Y., Dehennaut, V., Lefebvre, T. & Issad, T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol* (*Lausanne*) **4,** 99 (2013).
23. Ma, Z. & Vosseller, K. O-GlcNAc in cancer biology. *Amino Acids* **45,** 719–33 (2013).
24. de Queiroz, R. M., Carvalho, E. & Dias, W. B. O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front Oncol* **4,** 132 (2014).
25. Gu, Y. *et al.* GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* **70,** 6344–51 (2010).
26. Rao, X. *et al.* O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. *Nat Commun* **6,** 8468 (2015).
27. Yang, Y. R. *et al.* Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF-kappaB signaling. *Oncotarget* **6,** 12529–42 (2015).
28. Tamamura, Y. *et al.* Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* **280,** 19185–95 (2005).
29. Felx, M. *et al.* Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clin Sci* (*Lond*) **110,** 645–54 (2006).
30. Chien, C. S., Shen, K. H., Huang, J. S., Ko, S. C. & Shih, Y. W. Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Mol Cell Biochem* **333,** 169–80 (2010).

31. Lee, Y. C. *et al.* Inhibitory effects of andrographolide on migration and invasion in human non-small cell lung cancer A549 cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Eur J Pharmacol* **632,** 23–32 (2010).
32. Lu, K. W. *et al.* Gypenosides inhibits migration and invasion of human oral cancer SAS cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 -9 and urokinase-plasminogen by ERK1/2 and NF-kappa B signaling pathways. *Hum Exp Toxicol* **30,** 406–15 (2011).
33. Yang, W. H. *et al.* NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci. USA* **105,** 17345–50 (2008).
34. Yothaisong, S. *et al.* Increased activation of PI3K/AKT signaling pathway is associated with cholangiocarcinoma metastasis and PI3K/mTOR inhibition presents a possible therapeutic strategy. *Tumour Biol* **34,** 3637–48 (2013).
35. Krzeslak, A., Jozwiak, P. & Lipinska, A. Down-regulation of beta-N-acetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncol Rep.* **26,** 743–9 (2011).
36. Kanwal, S. *et al.* O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor alpha expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One* **8,** e69150 (2013).
37. Andrews, N. C. & Faller, D. V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19,** 2499 (1991).
38. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–5 (1970).
39. Bolt, M. W. & Mahoney, P. A. High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **247,** 185–92 (1997).
40. Bunthot, S. *et al.* Overexpression of claudin-4 in cholangiocarcinoma tissues and its possible role in tumor metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* **13** Suppl, 71–6 (2012).
41. Kraiklang, R. *et al.* A novel predictive equation for potential diagnosis of cholangiocarcinoma. *PLoS One* **9,** e89337 (2014).
42. Frankowski, H., Gu, Y. H., Heo, J. H., Milner, R. & Del Zoppo, G. J. Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol.* **814,** 221–33 (2012).

Acknowledgements

This project was co-supported by the TRF Senior Research Scholar Grant and Khon Kaen University to SW (RTA5780012); the Research Grant for New Scholar co-funded by the Office of the Higher Education Commission, TRF and Khon Kaen University (KKU) (MRG-5580031) to AS, Research grants from KKU (580605), Faculty of Medicine, KKU (IN58139), and the RGJ-PhD Program, TRF (PHD/0016/2556) to CP and SW. The authors would like to thank Prof. Kazuo Umezawa, Aichi Medical University, Japan for providing the DHMEQ; Prof. James A Will for editing this manuscript via the Faculty of Medicine Publication Clinic, KKU.

Author Contributions

A.S., K.V., C.W. and S.W. conceived-designed experiments; C.P., K.V. and A.S. performed experiments; C.P. and K.V. prepared the figures; C.P., A.S., C.W. and S.W. wrote the manuscript. All authors participated in the interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Phoomak, C. *et al.* Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-κB. *Sci. Rep.* **6**, 27853; doi: 10.1038/srep27853 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Oncology Research, Vol. 23, pp. 21–28
Printed in the USA. All rights reserved.
Copyright © 2016 Cognizant, LLC.

0965-0407/16 $90.00 + .00
DOI: http://dx.doi.org/10.3727/096504015X14424348426071
E-ISSN 1555-3906
www.cognizantcommunication.com

Inhibition of NF-κB Activity Enhances Sensitivity to Anticancer Drugs in Cholangiocarcinoma Cells

Wunchana Seubwai,*†‡ Kulthida Vaeteewoottacharn,‡§ Ratthaphol Kraiklang,¶ Kazuo Umezawa,# Seiji Okada,** and Sopit Wongkham‡§

*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
†Comprehensive Cancer Research Group, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
‡Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
§Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
¶Department of Nutrition, Faculty of Public Health, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
#Department of Molecular Target Medicine, Aichi Medical University, Nagakute, Japan
**Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Honjo, Kumamoto, Japan

Cholangiocarcinoma (CCA) is a dismal cancer. At present, there is no effective chemotherapeutic regimen for CCA. This may be due to the marked resistance of CCA to chemotherapy drugs, for which a mechanism remains unknown. Nuclear factor-κB (NF-κB) is constitutively activated in a variety of cancer cells, including CCA. It has been shown to play roles in growth, metastasis, and chemoresistance of cancer. In the present study, we examined whether NF-κB is involved in the chemoresistance of CCA and whether dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), an effective NF-κB inhibitor, can overcome the drug resistance of CCA. Two CCA cell lines, KKU-M213 and KKU-M214, were treated with DHMEQ and/or chemotherapeutic drugs. Cell viability, apoptosis, and the expressions of the ATP-binding cassette (ABC) transporters were compared. The combination of chemotherapy drugs, 5-fluorouracil, cisplatin, and doxorubicin, with DHMEQ significantly enhanced the cytotoxicity of all chemotherapeutic drugs compared to DHMEQ or drug alone. Furthermore, the mRNA level of ABCB1, a multidrug-resistant protein, was significantly decreased in the 5-fluorouracil combined with DHMEQ-treated cells. These findings suggest that the inhibition of NF-κB by DHMEQ enhanced the chemoresponsiveness of CCA cells, possibly by reducing the expression of ABC transporter. Inhibition of NF-κB may be a potential chemodrug-sensitizing strategy for chemoresistant cancer such as CCA.

Key word: Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ); Nuclear factor-κB (NF-κB); Cholangiocarcinoma (CCA); ATP-binding cassette family (ABC) transporters; Chemotherapeutic drugs

INTRODUCTION

The incidence of cholangiocarcinoma (CCA), a cancer of biliary epithelium, is increasing worldwide. Chronic inflammation of the bile duct epithelium seems to be the common risk factor of CCA around the world. In northeast Thailand, where the world incidence of CCA is high (1), epidemiology and animal studies demonstrated the association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection and CCA in this area (2). Owing to delayed diagnosis, an operational cure is applicable for only a few patients, and most of the CCA patients are untreated or received only palliative treatment. Many chemotherapeutic drugs such as 5-fluorouracil (5-FU), gemcitabine (GEM), cisplatin (CIS), and doxorubicin (DOX) have been used for the treatment of CCA patients with a low response rate and short median survival time (3,4). The frequent acquisition of drug-resistant phenotypes and the occurrence of secondary malignancies associated with chemotherapy are serious problems at present. The toxic effect of chemotherapy is the additional major drawback in the treatment of CCA patients. Thus, searching for new or alternative approaches of an effective treatment for CCA is needed.

Nuclear factor κB (NF-κB) has recently emerged as a potential molecular target for the treatment of several malignancies (5–7). NF-κB is activated by various stimuli including cytokines, UV radiation, chemical carcinogens, tumor necrosis factor-α, radiotherapy (8,9), and chemotherapeutic agents (10). Activated NF-κB promotes over 150 target transcripts, which include various genes involved in cell proliferation (11), angiogenesis

Address correspondence to Wunchana Seubwai, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel: 66-43-202-859; E-mail: wunchanas@yahoo.com

(11), metastasis (12), suppression of apoptosis (13), and chemotherapeutic drug resistance (14).

ATP-binding cassette family transporters (ABC transporters) play a role in the resistance of malignant cells to anticancer agents such as 5-FU, CIS, and DOX. Inhibitors for the major ABC transporter proteins contributing to multidrug resistance (MDR) have been developed. Extensive preclinical and clinical research has been carried out aimed at blocking the ABC transporters to prevent the development of drug resistance during chemotherapy (15). ABC transporters are activated through NF-kB pathway (16,17). Therefore, NF-κB would be a valid therapeutic target for an effective cancer treatment, especially for a multidrug-resistant cancer like CCA.

Our previous study showed that NF-κB proteins were overexpressed in almost all CCA patient tissues, and the NF-kB inhibitors [cepharanthene and dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)] could significantly reduce cell growth and enhance cell apoptosis of CCA cell lines both in vitro and xenografted mouse model (18,19). These findings suggested NF-κB as an attractive molecular target for CCA therapy. In the present study, we investigate whether inhibition of NF-kB activation by DHMEQ, a novel NF-κB inhibitor, can enhance the chemosensitivity of CCA cell lines to 5-FU, CIS, and DOX. The effect of DHMEQ on the expression of ABC transporters was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines

Human CCA cell lines derived from primary CCA patient tumors, namely KKU-M213 and KKU-M214, were established (20) and registered at the Japanese Collection of Research Bioresources (JCBR) Cell Bank, Osaka, Japan. The two cell lines were used in the present study as they had high expression of all NF-κB subunits (p50, p52, and p65) (18). CCA cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1% L-glutamine, and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C and 5% CO_2.

Chemicals

DHMEQ was synthesized as described previously (21). All chemotherapeutic drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Cell Viability Test

Cell viability was determined by MTT assay. In brief, 3×10^3 cells per well were seeded in a 96-well plate and incubated with 5 µg/ml DHMEQ alone or DHMEQ plus various concentrations of 5-FU, CIS, and DOX for 48 h at 37°C in 5% CO_2. Cells treated with 0.001% DMSO were used as a control. Subsequently, 10 µl of MTT (Sigma-Aldrich) was added to yield the final concentration of 0.5 mg⁄ml. After 4-h incubation, absorption at 570 nm was determined with an automatic ELISA plate reader (Multiskan; Thermo Electron, Vantaa, Finland).

Cell Death Assay Using Annexin V/Propidium Iodide Staining

Cytotoxicity of DHMEQ on CCA cells was examined using annexin V/propidium iodide (PI) staining. KKU-M213 and KKU-M214 cells were seeded in a 24-well cell culture plate at a density of 1×10^4 cells for 24 h to adhere and subsequently treated with DHMEQ or DHMEQ plus various concentrations of 5-FU. Cells were incubated further at 37°C, 5% CO_2 for 48 h, and stained with H33342, PI, and annexin V (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluted in culture medium for 30 min before image acquisition in an IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare, UK). The 20× objective was used to collect images for all fluorescence channels, and five fields of view per well were monitored. Image analysis for the multiplex assay was performed using the IN Cell Analyzer Workstation ver.3.7 (GE Healthcare, UK).

RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, cells were lysed in TRIzol reagent, and chloroform was added. After centrifugation at 12,000 × *g* for 15 min at 4°C, the RNA containing upper phase was collected, mixed with isopropanol, and centrifuged to precipitate RNA. RNA pellet was washed with 70% ethanol, air dried, dissolved in 20–30 µl of DEPC-treated water, and stored at −80°C until use. Two micrograms of total RNA was reverse transcribed to cDNA using RT-PCR according to the manufacturer's protocol (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Real-Time PCR

The expression of ABC transporters (ABCB1, ABCC1, ABCC6, ABCC11, and ABCG2) in CCA cell lines, KKU-M213 and KKU-M214, were examined by real-time PCR with 2× SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Mannhiem, Germany) in a LightCycle® 480 Real time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Thermal profile was 50 cycles of 95°C for 10 s, 55°C for 10 s, and 72°C for 3 s. After PCR, a melting curve was constructed at the range of 50°C to 99°C. All data were analyzed using LightCycle® 480. The expressions of ABC transporters were normalized with β-actin. All primers used were the same as those described previously (22). The specificity of the primers was tested using Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), Electronic PCR (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/epcr/), melting curve analysis, and the conventional PCR for a single PCR product verification.

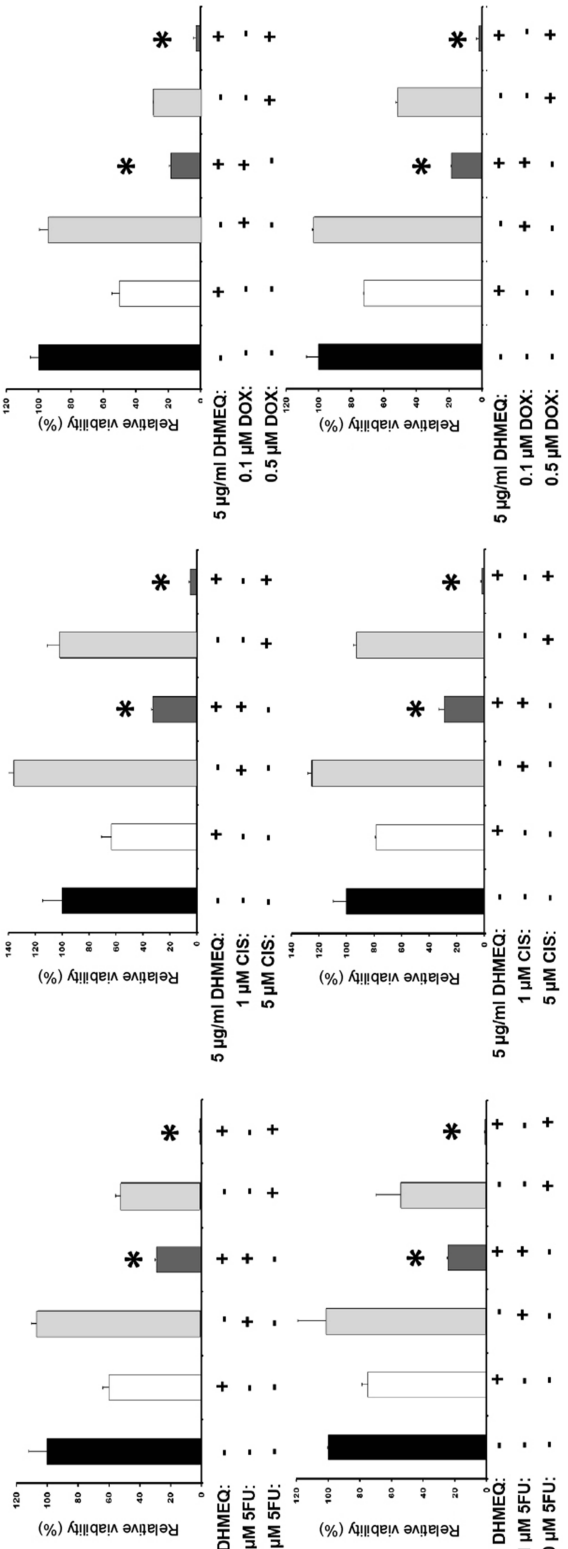


Figure 1. Cytotoxic effect of anticancer drugs with or without DHMEQ on CCA cell lines. Viabilities of KKU-M213 and KKU-M214 cells exposed to the indicated concentrations of 5-FU, CIS, and DOX with or without DHMEQ for 48 h were determined by MTT assay. Bars represent the mean and SD of triplicates. The data are a representative from two independent experiments. *$p < 0.05$ versus anticancer drugs alone.

Statistical Analysis

The results were presented as the mean ± SD of at least two triplicates from two separated experiments. Statistical significance was determined using the Student's *t*-test, and $p < 0.05$ was required for statistical significance.

RESULTS

Blocking of NF-κB by DHMEQ Sensitizes Human CCA Cell Lines to Anticancer Drugs

To examine whether DHMEQ could sensitize the CCA cells to certain anticancer drugs when used in combination, KKU-M213 and KKU-M214 cells were treated with the fixed dose of 5 μg/ml DHMEQ with or without various concentrations of anticancer drugs (1 and 10 μM 5-FU; 1 and 5 μM CIS; 0.1 and 0.5 μM DOX), and the viability of the cells were determined by MTT assay. DHMEQ was fixed at 5 μg/ml because it is the IC_{50} for KKU-M213 and IC_{30} for KKU-M214 as determined in our previous experiments (18). In addition, anticancer drugs at low concentration (1 μM 5-FU; 1 μM CIS; 0.1 μM DOX) did not show any antitumor activity in CCA cell lines. However, the combination of 5 μg/ml DHMEQ and chemodrugs significantly enhanced antitumor activity of all the chemotherapeutic drugs tested against two CCA cell lines (KKU-M213 and KKU-M214) compared to the single-agent treatment (Fig. 1).

DHMEQ Enhanced 5-FU-Induced Cell Death

As 5-FU is the widely used chemotherapeutic drug for CCA (23), the mechanism by which DHMEQ affected cell death in combination with 5-FU was further investigated. The number of dead cells was examined by staining with annexin V and PI. Nuclei were labeled with Hoechst 33258, and the fluorescent signals were imaged using IN Cell Analyzer 2000. Increase in DNA condensation (Hoechst 33258 intensity in Fig. 2A) and cell loss were clearly observed in the cells treated with the combination of DHMEQ (5 μg/ml) and 5-FU (1 and 10 μM) compared to those treated with a single agent or control (Fig. 2A). The proportion of dead cells (annexin V-positive and/or PI-positive cells) was significantly increased in both CCA cell lines after treatment with the combination of DHMEQ and 5-FU compared with a single agent or control (Fig. 2B).

Combination of DHMEQ and 5-FU Reduced the Expression of ABC Transporters

Overexpression of ABC transporter mRNAs and proteins after chemotherapy are associated with the drug-resistance phenotype in various cancers (24,25). To determine whether ABC transporters are involved in 5-FU resistance of CCA cells and whether DHMEQ could reverse this association, the expression levels of ABC transporters of CCA cells after treatment with the combination of DHMEQ and 5-FU were measured by real-time PCR. Compared to the vehicle-treated cells, expression of ABCB1 in KKU-M213 and ABCC6 in KKU-M214 was slightly increased in DHMEQ-treated cells. On the other hand, the expression of ABCC1, ABCC6, and ABCG2 in KKU-M213, and ABCG2 in KKU-M214, was decreased in DHMEQ-treated cells. As expected, 5-FU treatment caused significant elevation of ABCB1, ABCC1, ABCC11, and ABCG2 transporters in KKU-M213, and ABCB1 and ABCG2 in KKU-M214 (Fig. 3). Interestingly, when these cell lines were treated with the combination of 5 μg/ml DHMEQ and 1 μM 5-FU, the enhanced expression of the ABC transporter mRNAs by 5-FU was reversed to a certain extent (Fig. 3).

DISCUSSION

NF-κB is constitutively activated in many tumor cells including CCA (5,7,18). The activation of NF-κB has been shown to play a role in carcinogenesis and progression of cancer cells by stimulating cell growth, inhibiting apoptosis, and providing a survival disadvantage (26,27). Because apoptosis is a major antitumor pathway for chemotherapy and radiation-induced cell death, it is currently believed that NF-κB might be involved in the resistance of tumor cells to chemotherapy and radiation (13,14). Furthermore, NF-κB in cancer cells can be activated by many chemotherapeutic agents, including 5-FU, paclitaxel, doxorubicin, etoposide, vincristine, vinblastine, cisplatin, tamoxifen, and camptothecin (14). In the present study, we demonstrated for the first time that combination of chemotherapeutic drug and sublethal concentration of DHMEQ (5.0 μg/ml) significantly enhanced the cytotoxicity of 5-FU, CIS, and DOX on CCA cell lines, KKU-M213 and KKU-M214. The chemosensitizing activities of DHMEQ have been reported in various cancers such as cancers of the head and neck (28) and thyroid (29). In addition, DHMEQ significantly increased cell apoptosis in CCA cell lines, KKU-M213 and KKU-M214. We also demonstrated that DHMEQ could enhance apoptotic action of chemotherapeutic drugs, possibly via suppressing the enhancement of ABC transporter expression by anticancer drugs. Increased efflux of chemotherapeutic drugs from cells is largely mediated by MDR proteins such as ABCB1 and ABCG2. A number of studies have shown that ABC transporter expression was induced by anticancer drugs, leading to an unfavorable outcome in many patients (30). The expression of ABC transporter has been reported to correlate with NF-κB activation (31). Therefore, the combination of conventional chemotherapeutics with NF-κB inhibitors has been considered as an adjunct approach to sensitize cancer cells to chemotherapy (29,32). The increase in ABC transporters, especially

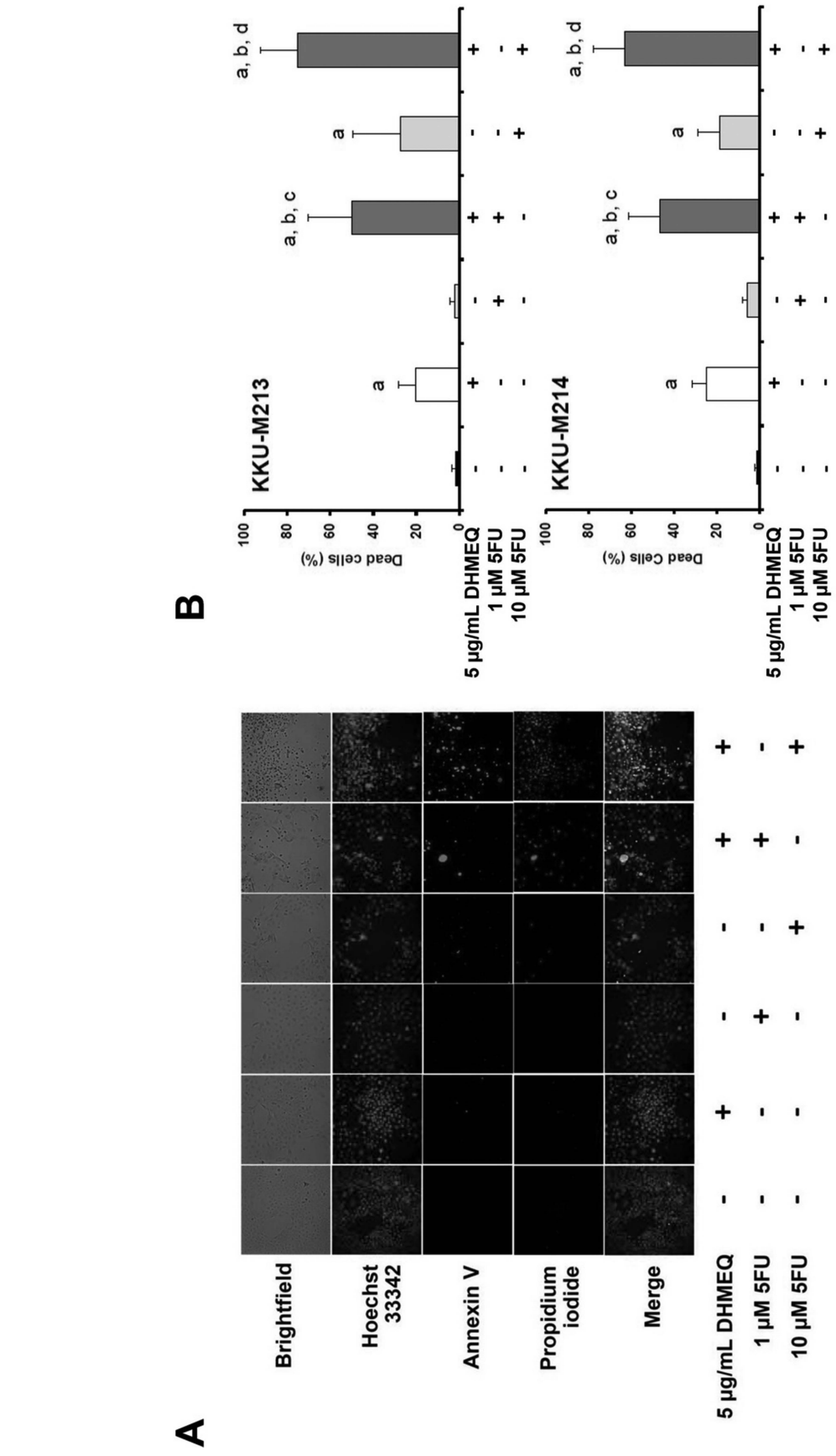


Figure 2. Effect of DHMEQ on 5-FU-induced cell death of CCA cell lines. Cells were treated with 5-FU with or without DHMEQ for 48 h. Cells were stained with various markers, and the image acquisitions were taken in an IN Cell Analyzer 2000. (A) Cells with nuclear fragmentation were identified by the nuclei marker, Hoechst 33342. Dead cells were identified by the presence of FITC-annexin V and/or propidium iodide. (B) Quantitative analysis of dead cell number. Bars represent the mean and SD of triplicates. The data are a representative from two independent experiments. *$p<0.05$: (a) versus control, (b) versus DHMEQ, (c) versus 1 µM 5-FU, (d) versus 10 µM 5-FU.

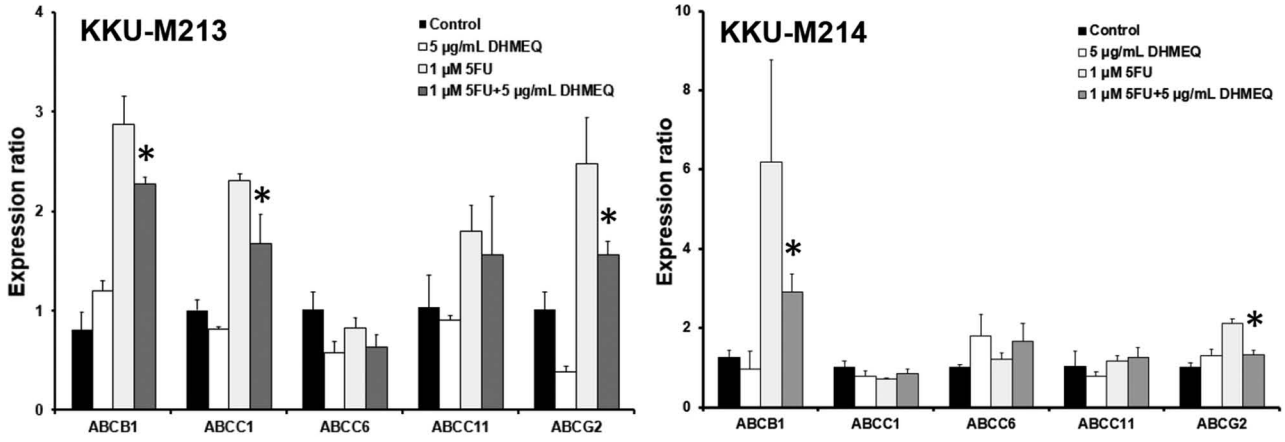


Figure 3. Effect of DHMEQ on mRNA levels of ABC transporter genes in CCA cell lines treated with 5-FU. KKU-M213 and KKU-M214 cells were exposed to indicated concentrations of 5-FU with or without DHMEQ for 48 h. Total cellular RNA was isolated, and transcript levels of the ABCB1, ABCC1, ABCC6, ABCC11, and ABCG2 genes were verified by real time-PCR. The graphs depict the ratios between amplification products of the ABC transporter genes in each treatment condition compared with the control. Bars represent the mean and SD of triplicates. The data are a representative from two independent experiments. *$p < 0.05$ versus DHMEQ.

ABCB1 and ABCG2, was obviously observed in 5-FU-treated CCA cell lines, and this probably is the offense mechanism of CCA cells to chemotherapy. However, this effect of 5-FU was reduced when cells were treated with the combination of 5-FU and DHMEQ. Inhibition of ABC transporter expression by small compounds that increase intracellular accumulation of chemotherapeutic drugs was demonstrated in several cancer cells such as the colon (33) and hepatic cancer cells (34). This may be one of the mechanisms by which NF-κB inhibitor enhances the chemosensitivity of cancer cells. A similar finding was reported with other compounds that affect NF-κB actions. For example, imatinib reverses the acquired resistance to anthracycline, such as doxorubicin, by inhibiting upregulation of the ABC transporter, ABCB1, via the inhibition of NF-κB/p65 nuclear localization (35). Clitocine, an inhibitor of adenosine kinase, was demonstrated to have a chemosensitizing effect on human hepatoma by reversing ABCB1 via downregulation of NF-κB (36).

These actions give at least two advantages for using NF-κB inhibitor to improve the outcome of CCA treatment. First, suppression of NF-κB significantly reduced the growth, cell motility, and invasion activity of CCA cells (18,19,37). Second, blocking of NF-κB action could sensitize the tumor cells to chemotherapeutic drugs via suppressing the expressions of ABC transporters leading to an increase in the intracellular accumulation of chemotherapeutic drugs in CCA cells.

In conclusion, our results provide strong evidence that the blocking action of NF-κB in CCA cell lines can enhance the antitumor activity of anticancer drugs. Suppression of ABC transporter expression, which was upregulated in response to anticancer drug treatment, could be one of the possible mechanisms by which DHMEQ enhanced the sensitivity of CCA cells to chemotherapeutic drugs. Using NF-κB inhibitor in combination with chemotherapeutic drugs may be an interesting strategy to increase the efficacy of the drug treatment in CCA patients.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund and Khon Kaen University (RTA5780012). W. Seubwai was under the New Researcher grant from Khon Kaen University. We are also grateful to the Research Instrument Center of KKU, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, for the technical support of the IN Cell Analysis. The authors sincerely thank Professor Y. Nawa, Visiting Professor, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, for reviewing and editing the manuscript.

REFERENCES

1. Charbel, H.; Al-Kawas, F. H. Cholangiocarcinoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, and diagnosis. Curr. Gastroenterol. Rep. 13:182–187; 2011.
2. Sithithaworn, P.; Yongvanit, P.; Duenngai, K.; Kiatsopit, N.; Pairojkul, C. Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma. J. Hepatobiliary Pancreat. Sci. 21:301–208; 2014.
3. Ramirez-Merino, N.; Aix, S. P.; Cortes-Funes, H. Chemotherapy for cholangiocarcinoma: An update. World J. Gastrointest. Oncol. 5:171–276; 2013.
4. Khan, S. A.; Davidson, B. R.; Goldin, R. D.; Heaton, N.; Karani, J.; Pereira, S. P.; Rosenberg, W. M.; Tait, P.; Taylor-Robinson, S. D.; Thillainayagam, A. V.; Thomas, H. C.; Wasan, H. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: An update. Gut 61:1657–1669; 2012.
5. Jain, G.; Cronauer, M. V.; Schrader, M.; Moller, P.; Marienfeld, R. B. NF-kappaB signaling in prostate cancer: A promising therapeutic target? World J. Urol. 30:303–310; 2012.

6. Morais, C.; Gobe, G.; Johnson, D. W.; Healy, H. The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. Int. J. Biochem. Cell Biol. 43:1537–1549; 2011.
7. Batra, S.; Balamayooran, G.; Sahoo, M. K. Nuclear factor-kappaB: A key regulator in health and disease of lungs. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 59:335–351; 2011.
8. Cheng, J. C.; Chou, C. H.; Kuo, M. L.; Hsieh, C. Y. Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway. Oncogene 25:7009–7018; 2006.
9. Madhusoodhanan, R.; Natarajan, M.; Veeraraghavan, J.; Herman, T. S.; Jamgade, A.; Singh, N.; Aravindan, N. NFkappaB signaling related molecular alterations in human neuroblastoma cells after fractionated irradiation. J. Radiat. Res. 50:311–324; 2009.
10. Fahy, B. N.; Schlieman, M. G.; Virudachalam, S.; Bold, R. J. Inhibition of AKT abrogates chemotherapy-induced NF-kappaB survival mechanisms: Implications for therapy in pancreatic cancer. J. Am. Coll. Surg. 198:591–599; 2004.
11. Sakamoto, K.; Maeda, S.; Hikiba, Y.; Nakagawa, H.; Hayakawa, Y.; Shibata, W.; Yanai, A.; Ogura, K.; Omata, M. Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. Clin. Cancer Res. 15:2248–2258; 2009.
12. Yan, M.; Xu, Q.; Zhang, P.; Zhou, X. J.; Zhang, Z. Y.; Chen, W. T. Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. BMC Cancer 10:437; 2010.
13. Sakuma, Y.; Yamazaki, Y.; Nakamura, Y.; Yoshihara, M.; Matsukuma, S.; Koizume, S.; Miyagi, Y. NF-kappaB signaling is activated and confers resistance to apoptosis in three-dimensionally cultured EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 423:667–671; 2012.
14. Weldon, C. B.; Burow, M. E.; Rolfe, K. W.; Clayton, J. L.; Jaffe, B. M.; Beckman, B. S. NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. Surgery 130:143–150; 2001.
15. Falasca, M.; Linton, K. J. Investigational ABC transporter inhibitors. Expert Opin. Investig. Drugs 21:657–666; 2012.
16. Ros, J. E.; Schuetz, J. D.; Geuken, M.; Streetz, K.; Moshage, H.; Kuipers, F.; Manns, M. P.; Jansen, P. L.; Trautwein, C.; Muller, M. Induction of Mdr1b expression by tumor necrosis factor-alpha in rat liver cells is independent of p53 but requires NF-kappaB signaling. Hepatology 33:1425–1431; 2001.
17. Bentires-Alj, M.; Barbu, V.; Fillet, M.; Chariot, A.; Relic, B.; Jacobs, N.; Gielen, J.; Merville, M. P.; Bours, V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. Oncogene 22:90–97; 2003.
18. Seubwai, W.; Wongkham, C.; Puapairoj, A.; Khuntikeo, N.; Pugkhem, A.; Hahnvajanawong, C.; Chaiyagool, J.; Umezawa, K.; Okada, S.; Wongkham, S. Aberrant expression of NF-kappaB in liver fluke associated cholangiocarcinoma: Implications for targeted therapy. PloS One 9:e106056; 2014.
19. Seubwai, W.; Vaeteewoottacharn, K.; Hiyoshi, M.; Suzu, S.; Puapairoj, A.; Wongkham, C.; Okada, S.; Wongkham, S. Cepharanthine exerts antitumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF-kappaB. Cancer Sci. 101:1590–1595; 2010.
20. Sripa, B.; Leungwattanawanit, S.; Nitta, T.; Wongkham, C.; Bhudhisawasdi, V.; Puapairoj, A.; Sripa, C.; Miwa, M. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). World J. Gastroenterol. 11:3392–3397; 2005.
21. Umezawa, K.; Chaicharoenpong, C. Molecular design and biological activities of NF-kappaB inhibitors. Mol. Cells 14:163–167; 2002.
22. Srimunta, U.; Sawanyawisuth, K.; Kraiklang, R.; Pairojkul, C.; Puapairoj, A.; Titipungul, T.; Hahnvajanawong, C.; Tassaneeyakul, W.; Wongkham, C.; Wongkham, S.; Vaeteewoottacharn, K. High expression of ABCC1 indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. Asian Pac. J. Cancer Prev. 13(Suppl):125–130; 2012.
23. Sookprasert, A.; Chindaprasert, J.; Wirasorn, K. Systemic therapy for locally advanced and metastatic cholangiocarcinoma. Asian Pac. J Cancer Prev. 13(Suppl):3–6; 2012.
24. Vander Borght, S.; van Pelt, J.; van Malenstein, H.; Cassiman, D.; Renard, M.; Verslype, C.; Libbrecht, L.; Roskams, T. A. Up-regulation of breast cancer resistance protein expression in hepatoblastoma following chemotherapy: A study in patients and in vitro. Hepatol. Res. 38:1112–1121; 2008.
25. Ricciardelli, C.; Ween, M. P.; Lokman, N. A.; Tan, I. A.; Pyragius, C. E.; Oehler, M. K. Chemotherapy-induced hyaluronan production: A novel chemoresistance mechanism in ovarian cancer. BMC Cancer 13:476; 2013.
26. Chen, W.; Li, Z.; Bai, L.; Lin, Y. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. Front Biosci. (Landmark Ed) 16:1172–1185; 2011.
27. Inoue, J.; Gohda, J.; Akiyama, T.; Semba, K. NF-kappaB activation in development and progression of cancer. Cancer Sci. 98:268–274; 2007.
28. Ruan, H. Y.; Masuda, M.; Ito, A.; Umezawa, K.; Nakashima, T.; Yasumatsu, R.; Kuratomi, Y.; Yamamoto, T.; Weinstein, I. B.; Komune, S. Effects of a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), on growth, apoptosis, gene expression, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Head Neck 28:158–165; 2006.
29. Meng, Z.; Mitsutake, N.; Nakashima, M.; Starenki, D.; Matsuse, M.; Takakura, S.; Namba, H.; Saenko, V.; Umezawa, K.; Ohtsuru, A.; Yamashita, S. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, enhances antitumor activity of taxanes in anaplastic thyroid cancer cells. Endocrinology 149:5357–5365; 2008.
30. Herraez, E.; Gonzalez-Sanchez, E.; Vaquero, J.; Romero, M. R.; Serrano, M. A.; Marin, J. J.; Briz, O. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. Mol. Pharm. 9:2565–2576; 2012.
31. Zhang, J.; Lu, M.; Zhou, F.; Sun, H.; Hao, G.; Wu, X.; Wang, G. Key role of nuclear factor-kappaB in the cellular pharmacokinetics of adriamycin in MCF-7/Adr cells: The potential mechanism for synergy with 20(S)-ginsenoside Rh2. Drug Metab. Dispos. 40:1900–1908; 2012.
32. Suzuki, K.; Aiura, K.; Matsuda, S.; Itano, O.; Takeuchi, O.; Umezawa, K.; Kitagawa, Y. Combined effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer. Clin. Exp. Metastasis 30:381–392; 2013.

33. Xing, Y.; Wang, Z. H.; Ma, D. H.; Han, Y. FTY720 enhances chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin and etoposide via the modulation of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1. J. Dig. Dis. 15:246–259; 2014.
34. Huang, C.; Xu, D.; Xia, Q.; Wang, P.; Rong, C.; Su, Y. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of human hepatic cancer cells by astragaloside II. J. Pharm. Pharmacol. 64:1741–1750; 2012.
35. Sims, J. T.; Ganguly, S. S.; Bennett, H.; Friend, J. W.; Tepe, J.; Plattner, R. Imatinib reverses doxorubicin resistance by affecting activation of STAT3-dependent NF-kappaB and HSP27/p38/AKT pathways and by inhibiting ABCB1. PloS One 8:e55509; 2013.
36. Sun, J.; Yeung, C. A.; Co, N. N.; Tsang, T. Y.; Yau, E.; Luo, K.; Wu, P.; Wa, J. C.; Fung, K. P.; Kwok, T. T.; Liu, F. Clitocine reversal of P-glycoprotein associated multi-drug resistance through down-regulation of transcription factor NF-kappaB in R-HepG2 cell line. PloS One 7:e40720; 2012.
37. Uthaisar, K.; Seubwai, W.; Srikoon, P.; Vaeteewoottacharn, K.; Sawanyawisuth, K.; Okada, S.; Wongkham, S. Cepharanthine suppresses metastatic potential of human cholangiocarcinoma cell lines. Asian Pac. J. Cancer Prev. 13(Suppl):149–54; 2012.

Establishment and characterization of a novel human cholangiocarcinoma cell line with high metastatic activity

KWUNTIDA UTHAISAR[1,3,7], KULTHIDA VAETEEWOOTTACHARN[1,3], WUNCHANA SEUBWAI[2,3], CHUTIMA TALABNIN[4], KANLAYANEE SAWANYAWISUTH[1,3], SUMALEE OBCHOEI[1,3], RATTHAPHOL KRAIKLANG[5], SEIJI OKADA[6] and SOPIT WONGKHAM[1]

[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, and [3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002; [4]School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000; [5]Department of Nutrition, Faculty of Public Health, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand; [6]Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan

Received March 18, 2016; Accepted May 11, 2016

DOI: 10.3892/or.2016.4974

Abstract. Cholangiocarcinoma (CCA) is a highly metastatic tumor, and the lung is a common site of metastasis. A greater understanding of the biology of metastases is needed to improve treatment outcomes. Herein, a highly metastatic human CCA subline, KKU-213L5 from an original cell line, KKU-213 that has marginally metastatic ability, was established and characterized. KKU-213L5 was selected *in vivo* through the fifth serial passage of pulmonary metastasized tissues via tail-vein injection in NOD/scid/Jak3 mice. The metastatic abilities of the KKU-213L5 cells were compared with the parental line *in vitro* and *in vivo*. The expression profile of this metastatic cell line was determined using real-time PCR. KKU-213L5 cells were found to possess higher metastatic phenotypes, i.e., growth rates, stem cell surface markers (CD133), migration and invasion characteristics when compared with the parental cells. Compared to the KKU-213 cells, KKU-213L5 cells formed larger tumors in subcutaneous xenografted mice and had a >10-fold increase in lung metastases in the tail-vein injected metastatic mouse model. Mice injected intravenously with KKU-213L5 cells had a significantly shorter survival. Analysis of the expressed genes related to progression of cancer revealed significant upregulation of anterior gradient protein-2 (AGR2) and suppression of KiSS-1 in the KKU-213L5 cells. The association of these two genes with metastasis was affirmed in CCA patient tissues since increased AGR2 expression and decreased KiSS-1 expression were found in higher stage patient tumors. In conclusion, a highly metastatic human CCA cell line was established and characterized. It is plausible that the differential expression between the parental KKU-213 and highly metastatic KKU-213L5 cells may be beneficial to classify novel genes associated with metastasis. The KKU-213L5 cell line should serve as a valued device for discovering the molecular mechanisms of CCA metastasis and enabling the search for an effective therapy for the unmet clinical need in CCA.

Correspondence to: Professor Sopit Wongkham, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 123 Mitraparb Road, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand
E-mail: sopit@kku.ac.th

Professor Seiji Okada, Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan
E-mail: okadas@kumamoto-u.ac.jp

Present address: [7]Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand

Key words: cholangiocarcinoma, bile duct cancer, metastasis, AGR2, KiSS-1, metastasis-associated genes, metastatic mouse model, cell line

Introduction

Metastasis is the most detrimental feature of cancer that leads to patient mortality. It is a highly selective process which is comprised of a number of complex and interrelated steps. Cancer cells must escape from the primary tumor site, survive in the circulation, invade multiple distant tissues or organs and finally inhabit specific organ sites (1,2). Cancer cells in primary and metastatic tumors exhibit differences in biological heterogeneity that raise difficulty for the treatment of metastatic tumors. Understanding the cellular and molecular pathogenesis of metastasis is important to prevent metastasis and to search for an effective therapy for metastatic cancers.

Cholangiocarcinoma (CCA) is a highly invasive tumor that leads to an extremely poor prognosis. As CCA is difficult to diagnose at the early stage, the vast majority of CCA patients are diagnosed when the disease has progressed to the metastatic stage. The common sites of metastasis are the liver, lymph nodes, lung and bone (3-6). Metastasis is usually the cause of death of CCA patients. Current treatments e.g., radio-

therapy, chemotherapy and surgery do not effectively ensure or prolong patient survival (7).

At present, the understanding of the metastatic process of CCA at the molecular level is limited. Experimental systems that mimic endogenous contributing factors are required to understand the complexity of metastasis. Most of the CCA cell lines used rarely develop tumors that metastasize, making it difficult to study these detrimental events in cancer progression. To understand the molecular mechanism of metastasis in CCA, a highly metastatic CCA cell line is needed. This cell line can then be used to investigate the causes of metastasis while at the same time test for new therapies. Moreover, the molecular networks and signaling pathways between individual molecules and metastasis can be elucidated.

In the present study, an *in vivo* selection resulted in the establishment of a human CCA cell subline, KKU-213L5, which possesses higher metastatic behaviors, i.e., growth rate, stem cell marker characteristics, migration and invasion abilities, than those of the parental, KKU-213 cells. The aggressiveness of KKU-213L5 compared to the parental cells was demonstrated in the subcutaneous xenograft and tail vein injected lung metastasis mouse models. Expression levels of various molecules with regard to the metastatic processes were compared. Finally, two genes, anterior gradient protein-2 (AGR2) and KiSS-1, were identified in the KKU-213L5 cell line and their associations with metastasis in CCA patients were validated. This newly established subline should be of benefit not only to basic investigations but also to translational research efforts on the metastasis of CCA and of cancer as a whole.

Materials and methods

Cell lines and CCA patient tissues. The parental CCA cell line, KKU-213, was established from the primary tumor of a Thai male with histologically confirmed CCA as previously described (8). The presence of liver fluke *Opisthorchis viverrini* eggs was noted in this pathological record. The cell line KKU-213 (JCRB1557) was purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCBR) Cell Bank, Osaka, Japan.

Paraffin-embedded histologically confirmed CCA tissues (n=32) were obtained from the specimen bank of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand. The protocol was reviewed and approved by The Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research (HE571464) based on the Declaration of Helsinki and ICH-Good Clinical Practice Guidelines.

Establishment of a highly metastatic KKU-213L5 subline. A highly metastatic subline namely, KKU-213L5, was established from the metastasized lung tissues of NOD/scid/Jak3 mice (NOJ mice) (9). Mice were accommodated and monitored according to institutional guidelines. The Institutional Animal Care and Use Committee of Kumamoto University approved the experimental procedures.

The parental cells, KKU-213 ($5x10^5$ cells), were inoculated through tail veins of the 8- to 10-week old male NOJ mice. Approximately 18 days after injection, the mice were sacrificed and the pulmonary metastatic tumors were resected and minced for *in vitro* culture. The cells were re-passaged and cultured until the absence of fibroblasts occurred. Then, cultured metastatic tumor cells were inoculated into the naïve mice in the same manner. After repeating these *in vivo* selection procedures 5 times, the cells which preferentially metastasized to the lungs following intravenous injection were obtained and designated as KKU-213L5 (lung metastatic variant 5).

KKU-213 and KKU-213L5 cells were cultured in Ham's F-12 media supplemented with 10% heated inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml of penicillin G and 100 μg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37˚C in a 5% CO_2 incubator.

Cell proliferation and clonogenic assays. Cell proliferation was determined using the dye exclusion method. Briefly, exponentially growing cells ($5x10^3$ cells/well) were plated into a 24-well plate. Every other day, the cells were trypsinized and viable cells were determined by trypan blue staining. Doubling times of each cell line were calculated as described by Patterson (10).

Survival and proliferative activities were determined using a clonogenic assay (11). Briefly, 200 cells in Ham's F-12 with 10% FBS were seeded in 6-well plates and incubated in a 5% CO_2 incubator at 37˚C for 7 days. Colonies were fixed in 4% v/v paraformaldehyde, stained with 0.5% w/v crystal violet and counted.

Cell surface marker determination. The expression levels of cell surface markers were determined by flow cytometric analyses with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD29 (TS2/16; BioLegend, San Diego, CA, USA), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD34 (AC136; Miltenyi Biotec, Teterow, Germany), fluoresecein isothiocyanate-conjugated (FITC) anti-CD44 (IM7), Alexa Fluor® 647-conjugated anti-CD90 (F15-42-1), APC-conjugated anti-CD117 (104D2) (all from BioLegend) and PE-conjugated anti-CD133 (AC133; Miltenyi Biotec). Single-cell suspensions of ~$1x10^6$ cells were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% FBS and 0.05% sodium azide. After staining with each antibody and incubation for 30 min on ice, the cells were washed twice with PBS and analyzed on an LSR II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The expression levels of each surface marker were analyzed from at least 20,000 cells using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA) and presented as a percentage of positive cells. Isotype-matched antibodies were used as controls.

Wound healing assay. Cells were seeded into a 12-well plate and incubated overnight in complete media. A sterile 200-μl pipette tip was used to create a scratch wound on the monolayer of cells and the detached cells were removed. Cells were then incubated further in 1% FBS media, and images were captured at 6, 12, 18 and 24 h. The migrating distance was measured as the relative distance of cell migration measured from 0 time as previously described (12).

In vitro cell migration and invasion assays. The migration and Matrigel cell invasion assays were performed as previously described (12). Briefly, polycarbonate membranes with 8-μm

pores were coated with 0.5 mg/ml Matrigel (BD Biosciences) and allowed to stand overnight. The membranes were rehydrated and $1.2x10^4$ of CCA cells were placed onto the upper chamber of a Transwell unit. Ham's F-12 media with 10% FBS was used as a chemoattractant in the bottom chamber. After 18 h, 4% paraformaldehyde was added to fix the migrated or invaded cells before the cells were stained with 0.4% sulforhodamine B. The membranes were dried and the numbers of migrated/invaded cells from 9 x low power fields (magnification, x100) were counted. Mean values were determined from triplicated assays. At least two independent experiments were performed.

Tumor growth assay in xenografted mice. KKU-213 or KKU-213L5 cells ($1x10^6$ cells) were subcutaneously injected in each flank side of the 8- to 10-week old male BALB/c Rag-$2^{-/-}$/Jak$3^{-/-}$ mice (n=8). Tumor volumes were measured using a vernier every 3 days. Tumors were removed and weighed at 12 days post-injection.

Pulmonary metastasis assay in vivo. NOJ mice aged 8-10 weeks were used to estimate the *in vivo* metastatic potential to the lung. KKU-213 or KKU-213L5 cells ($5x10^5$ cells/mouse) were intravenously inoculated in mice via the tail vein. Lungs were removed on days 13 and 21 after inoculation, and fixed in 4% paraformladehyde overnight for histochemical study. The total number of lung micrometastases and macrometastases were microscopically evaluated. Cell clusters with a diameter <100 μm were defined as micrometastases and those of diameter >100 μm were defined as macrometastases. For survival analysis, the survival of mice was observed until 40 days.

Histological evaluations. The paraffin sections were prepared for histological study according to the standard protocol. The sections were stained with hematoxylin and eosin, or CK19 antibody for immunohistochemistry. For CK19-immunohistochemistry, tissue sections were incubated with anti-KRT19 (HPA002465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 4˚C overnight followed by biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at room temperature for 30 min. Signals were enhanced using the Vectastain Elite ABC standard kit (Vector Laboratories) and detection was performed using the Histofine® DAB substrate kit (Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japan).

AGR2 and KiSS-1 immunohistochemistry was performed in 32 intrahepatic mass-forming CCA patient tissues using 1:500 rabbit polyclonal anti-AGR2 antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA) and 1:50 rabbit polyclonal anti-KiSS-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) at room temperature, overnight. Anti-rabbit IgG EnVison (Dako, Carpinteria, CA, USA) was used as the secondary antibody. The percentage of positive cells was scored as follows: 0%, negative; 1-25%, +1; 26-50%, +2; and >50%, +3; and the intensity of the staining as follows: weak, 1; moderate, 2; and strong, 3. The expression levels of AGR2 and KiSS-1 were semi-quantitatively determined using an immunohistochemistry (IHC) index equal to the percentage of positive cells x intensity.

Real-time RT-PCR array. A real-time PCR array of 79 genes including 77 metastatic-associated genes and two internal control genes [β-actin and β_2 microglobuli (B_2M)] was set (Table I). The metastatic-associated genes were selected from the literature review, a commercial metastatic PCR array, and the 'Epithelial mesenchymal transition gene signatures in cancer drug discovery, diagnostics and treatment' (13). The primer sequences were designed using Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to extract total RNA from cells, and reverse transcription of total RNA (2 μg) was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR, the PCR protocol and data analysis were as described by Uthaisar *et al* (12). β_2M was used as an internal control.

Statistical analysis. Data were analyzed using SPSS 16.0 Windows Evaluation software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative data are expressed as mean ± SD. Student's t-test was used for comparison between two groups. A P-value of <0.05 was considered to indicate a statistically significant result.

Results

Properties of the highly metastatic subline KKU-213L5 in vitro

Morphology and growth properties of the cultured cells. The culture appearance of the established KKU-213L5 cell subline and the parental KKU-213 cell line as determined by phase contrast microscopy demonstrated considerably similar epithelial morphology with a polygonal shape, and large nuclei (Fig. 1A). The growth rate of the KKU-213L5 subline exceeded that of the parental KKU-213 cells (Fig. 1B). The average doubling time for KKU-213 was 23.4 h and that for the metastatic KKU-213L5 was 20.3 h. The clonogenic assay that represents survival and proliferative activities revealed that KKU-213L5 cells had a significantly higher colony forming capability than that of the KKU-213 cells (Fig. 1C).

Migration and invasion activities. Migration and invasion are the most important phenotypic characteristics of cancer metastasis. To examine the ability of migration, cell scratching assays were performed and compared between the KKU-213 and KKU-213L5 cells. Following incubation of physically wounded cells at indicated time points, the relative migrating distance of KKU-213L5 was significantly longer than that of KKU-213 (P<0.001; Fig. 2A). The migration activities using Boyden chamber assays demonstrated that KKU-213L5 cells had a ~5-fold higher migration ability than the parental line (P<0.01) (Fig. 2B). The number of migrated cells observed was 521±87 for KKU-213L5 and 104±11 for KKU-213.

Invasion is a crucial step in metastasis; the invasion ability of the KKU-213L5 cells was compared to that of KKU-213 cells using the Matrigel invasion assay. As shown in Fig. 2C, KKU-213L5 had an aggressive capacity to invade the matrix compared to the parental cells (P<0.001). The number of invaded cells for KKU-213L5 was 188±9 and for KKU-213 the number was 120±8.

Differential expression of stem cell markers. Emerging roles of cancer stem cells (CSCs) in tumorigenesis, growth and

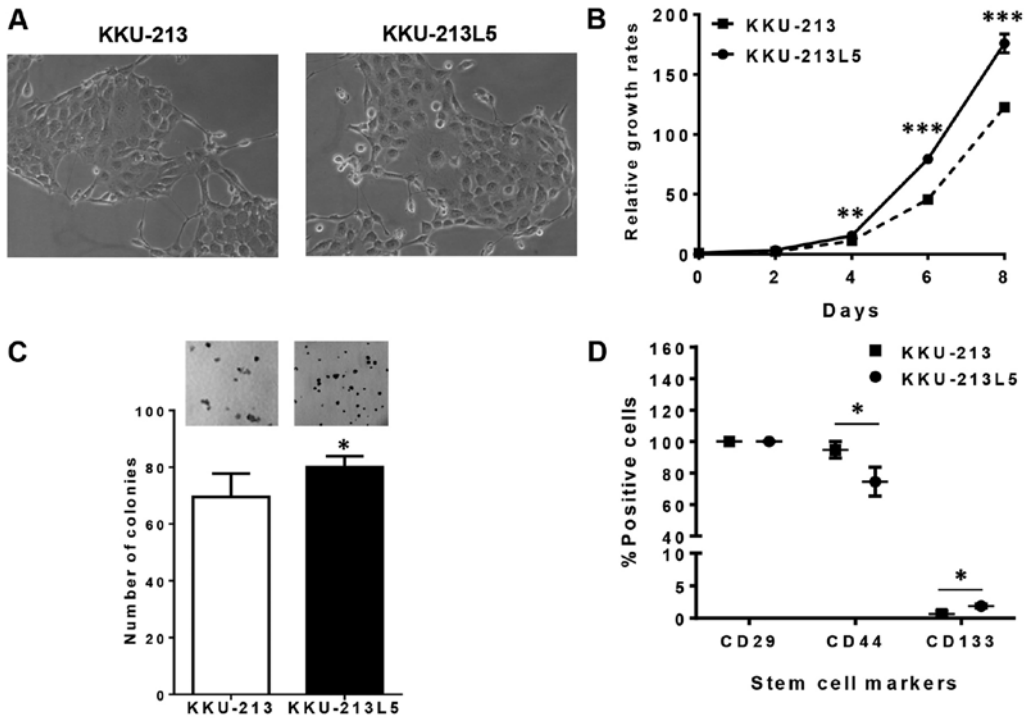


Figure 1. Characteristics of the KKU-213 and KKU-213L5 cells. (A) Cell morphology, (B) the proliferative potential as determined by dye exclusion, (C) colony formation assays, and (D) surface marker expression were compared between the KKU-213 and KKU-213L5 cells. The data are shown as mean ± SD from triplicate assays of one of two independent experiments for proliferation and colony formation assays; and from 3 independent experiments for surface marker expression; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

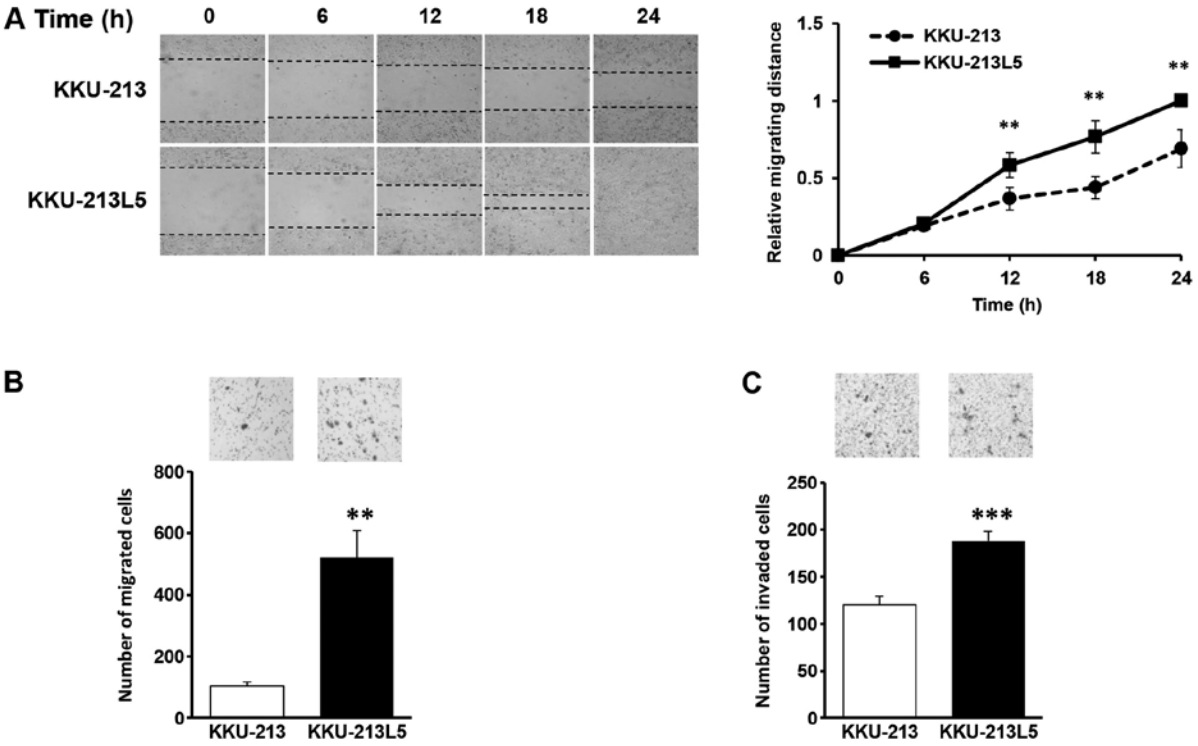


Figure 2. Cell migration and invasion. Cell migration of the KKU-213 and KKU-213L5 cells was compared using (A) wound healing and (B) Boyden chamber assays. (C) Invasion activity was determined using Matrigel-coated Boyden chambers. Images from 9 fields/condition were captured under a magnification of x100 and cell numbers were counted. All data are mean ± SD of triplicate assays and represent one of two independent experiments; **P<0.01, ***P<0.001.

metastasis have been recognized (14). The high plasticity and stress-resistant phenotypes of CSCs make them potential candidates for metastatic cells. It was speculated that the *in vivo* selection of KKU-213 cells may preferentially select

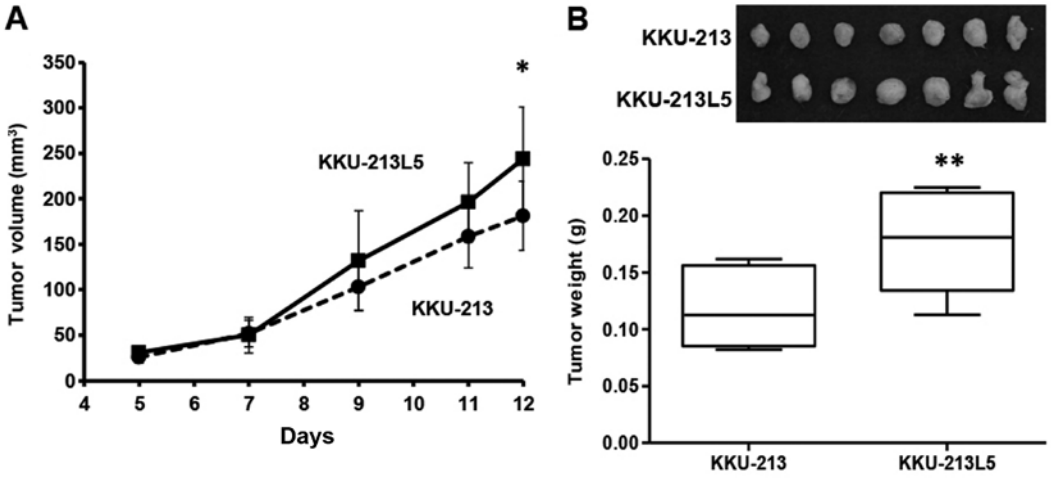


Figure 3. Tumor growth *in vivo*. Cells from the KKU-213 and KKU-213L5 cell lines were subcutaneously injected in BALB/c Rag-2$^{-/-}$/Jak3$^{-/-}$ mice (n=8). (A) Tumor volume and (B) weight with tumor masses in small insets are shown after 12 days. The data are mean ± SD. *P<0.05, **P<0.01.

CSCs in KKU-213L5. Six CSC markers (CD29, CD34, CD44, CD90, CD117 and CD133) from common liver stem cell markers (15) were investigated in the parental KKU-213 and highly metastatic KKU-213L5 cells. Only 3 markers; CD29, CD44 and CD133, were expressed on the surface of these CCA cells and only CD44 and CD133 were differentially expressed (Fig. 1D). As compared to KKU-213, the expression of CD133 was increased (1.9±0.3 vs. 0.7±0.5; P<0.05) whereas that of CD44 was decreased (74.5±9.3 vs. 94.7±5.2; P<0.05) in the KKU-213L5 cells.

Properties of the highly metastatic subline KKU-213L5 in vivo

Tumorigenicity. Both KKU-213 and KKU-213L5 cells were tumorigenic as the sizes of inoculums were progressively increased and reached sizes of 0.1-0.25 g within 12 days. The tumor growths of the KKU-213L5 subline, however, exceeded those of the parental KKU-213 cells both in tumor volume (Fig. 3A) and tumor weight (Fig. 3B). At 12 days post-inoculation, the average tumor weight of the KKU-213L5 cells (0.18±0.04 g) was significantly higher than that of the parental KKU-213 cells (0.11±0.03 g; P<0.01). Distant organ metastases, e.g., lung and liver were not observed in this period of time.

Metastatic activity. The aggressiveness of the metastatic KKU-213L5 cells over the parental cells was determined by the percent survival of the mice after tail-vein injection (Fig. 4A). Mice injected with KKU-213L5 had shorter survival with a median survival of 21 days compared to 36 days of the parental cell group (log-rank; P<0.0001). The KKU-213L5 cells developed lung metastases with high efficiency in the animal model. After 13 and 21 days post intravenous injection, the CCA cells that were colonized in the lungs were examined using cytokeratin-19 (CK19) immunohistochemistry (Fig. 4B). KKU-213L5-injected mice significantly developed numerous lung colonizations with micrometastatic and macrometastatic foci within 13 days of injection, whereas the metastatic foci were hardly detected in the KKU-213 cell group (Fig. 4C; P<0.001). Macrometastases were observed from the KKU-213 cells at 21 days post-injection but the number was considerably fewer than those observed for the KKU-213L5 cells (P<0.05).

Identification of metastasis-related genes in KKU-213L5. Cancer metastasis is a complicated process supported by abnormal expression of metastasis-associated genes. To understand the molecular mechanisms supporting the highly metastatic activities of KKU-213L5, differential expression levels of 77 metastatic-associated genes regarding cell proliferation, cell migration and cell invasion (Table I) were determined in the KKU-213L5 cells in comparison with the KKU-213 cells using real-time PCR.

To increase the chance for uncovering the metastatic-associated genes, the expression levels of genes that were >1.2-fold different were designated as upregulated and those <0.5-fold were designated as downregulated. Cluster analysis (dChip) of the metastatic-associated genes revealed 21 differentially expressed genes in KKU-213L5 with 7 upregulated and 14 downregulated. AGR2, KRT13, EREG and FN1 were upregulated with a >2-fold difference; whereas JAG1, ANXA1 and EGFR3 had a >1.2-fold difference. In contrast, KiSS-1, IFI27, VIM, CDH2 and PXN were downregulated with a <0.5-fold difference (Fig. 5; Table II). Using STRING9.1 (http://string-db.org), these differentially expressed genes were suggested to be involved in wound healing and cellular component movement.

Expression levels of AGR2 and KiSS-1 are associated with metastatic potential of KKU-213L5 cells. As shown in Fig. 5, AGR2 was in the first rank of upregulated genes and KiSS-1, a metastasis suppressor was in the first rank of downregulated genes found in the KKU-213L5 cells when compared to those of the parental KKU-213 cells. To validate the association of these two genes in the metastasis of CCA, the expression levels of AGR2 and KiSS-1 were confirmed in clinical specimens from CCA patients with different metastatic statuses. Paraffin-embedded tumor tissues from histologically confirmed

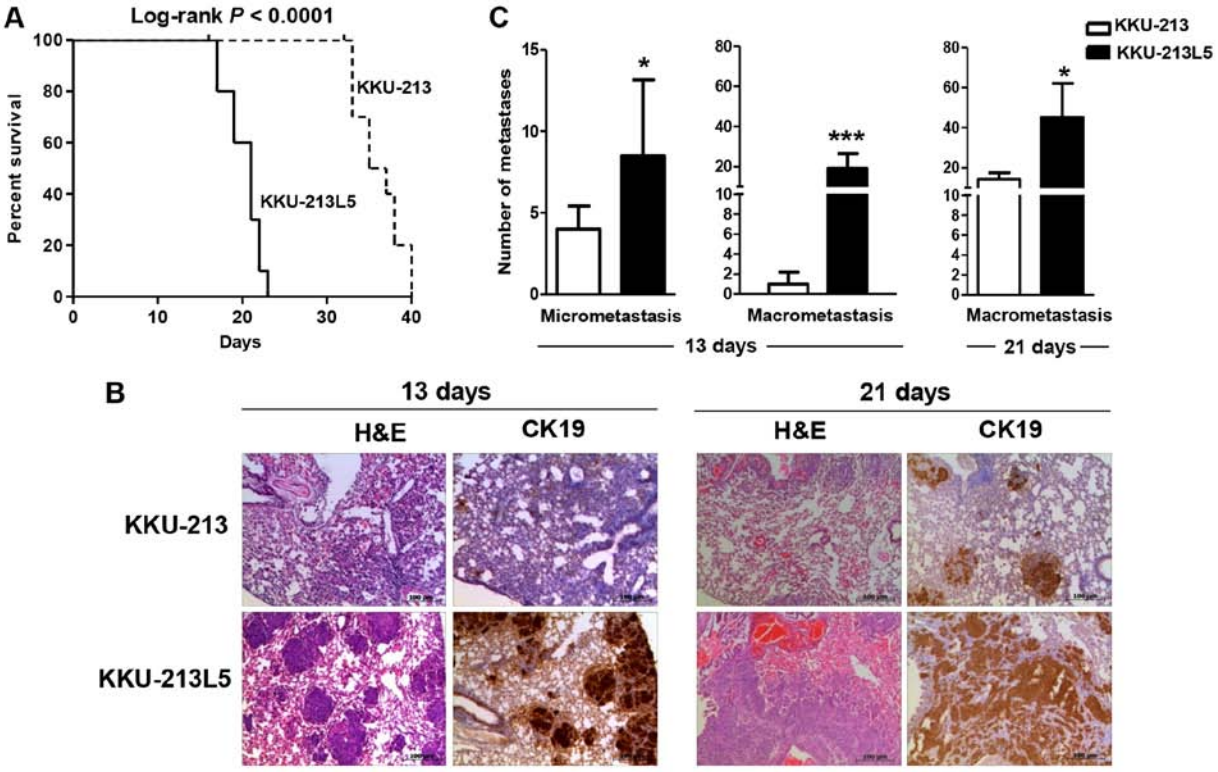


Figure 4. Tumor metastasis *in vivo*. Cells from the KKU-213 and KKU-213L5 cell lines were intravenously inoculated into NOJ mice via the tail vein. Lungs were collected at 13 and 21 days post-injection, and pulmonary micrometastases and macrometastases were counted. (A) Percent survival, (B) histological features of the lung metastatic nodules observed at days 13 and 21, and (C) the numbers of micrometastases and macrometastases obtained at days 13 and 21 post-injection were determined. Data represent mean ± SD of metastases for each group. Scale bar, 100 μm; *P<0.05, ***P<0.001.

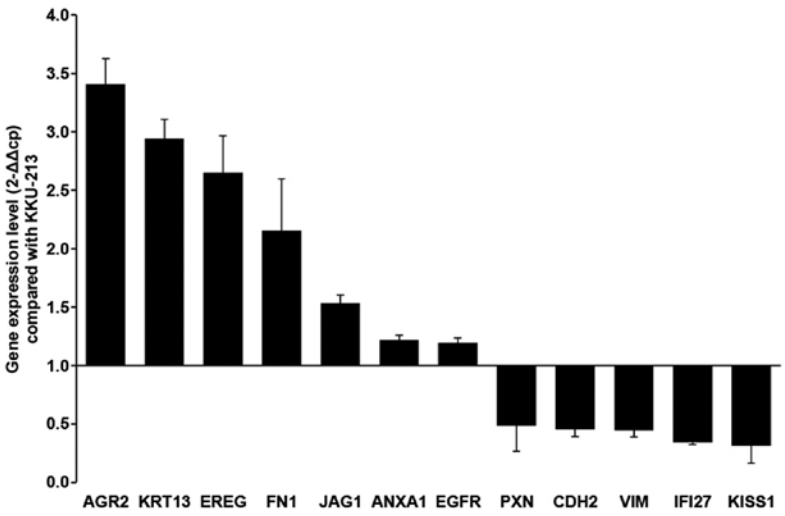


Figure 5. Differential expression of genes in the KKU-213L5 cells. Expression levels of 77 metastatic-associated genes were determined in the KKU-213L5 cells in comparison with the parental KKU-213 cells using real-time PCR. Genes that were upregulated >1.2-fold and downregulated <0.5-fold in the KKU-213L5 cells are shown.

intrahepatic CCA patients with different tumor staging (n=32) were examined for AGR2 and KiSS-1 immunohistochemical analysis. Normal bile duct epithelia from the adjacent non-tumorous tissues were assessed. Normal bile ducts occasionally expressed AGR2, however, it was frequently found in CCA tissues with strong intensity. The expression of AGR2 was significantly higher in the CCA tissues than that in the normal bile ducts (Fig. 6A and B) (P<0.001). Moreover, AGR2 expression was gradually increased with higher stages of tumor development. Expression of AGR2 in the CCA tissues of stage IVB was significantly higher than these levels in stages IVA and III (P<0.05). In contrast to AGR2, KiSS-1 was strongly expressed in normal bile ducts and gradually decreased with increasing tumor stages (Fig. 6A and B) (P<0.05).

Table I. List of 77 genes selected for the metastatic PCR array.

No.	Gene symbol	Gene name	Accession no.
1	ACTN1	Actinin, α1	NM_001102.3
2	AGR2	Anterior gradient 2 homolog (*Xenopus laevis*)	NM_006408.3
3	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	NM_001014431.1
4	ANXA1	Annexin A1	NM_000700.1
5	BSG	Basigin (OK blood group)	NM_001728.3
6	CAV1	Caveolin 1	NM_001172895.1
7	CCND2	Cyclin D2	NM_001759.3
8	CCNE2	Cyclin E2	NM_057749.2
9	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	NM_000610.3
10	CD82	CD82 molecule	NM_001024844.1
11	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	NM_004360.3
12	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	NM_001792.3
13	CFL1	Cofilin 1 (non-muscle)	NM_005507.2
14	CLDN4	Claudin 4	NM_001305.3
15	CLDN7	Claudin 7	NM_001185022.1
16	CST7	Cystatin F (leukocystatin)	NM_003650.3
17	CTBP1	C-terminal binding protein 1	NM_001012614.1
18	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), β1	NM_001904.3
19	DSP	Desmoplakin	NM_001008844.1
20	EGFR	Epidermal growth factor receptor	NM_005228.3
21	EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule	NM_002354.2
22	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene Homolog 3 (avian)	NM_001005915.1
23	EREG	Epiregulin	NM_001432.2
24	FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	NM_002020.4
25	FN1	Fibronectin 1	NM_002026.2
26	FOXC1	Forkhead box C1	NM_001453.2
27	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046.4
28	HOXB7	Homeobox B7	NM_004502.3
29	HSPB2	Heat shock 27 kDa protein 2	NM_001541.3
30	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	NM_000201.2
31	IFI27	Interferon, α-inducible protein 27	NM_001130080.1
32	ILK	Integrin-linked kinase	NM_001014794.1
33	ITGA5	Integrin, α5	NM_002205.2
34	ITGB1	Integrin, β1	NM_002211.3
35	JAG1	Jagged 1	NM_000214.2
36	KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	NM_002256.3
37	KRT13	Keratin 13	NM_002274.3
38	LDHA	Lactate dehydrogenase A	NM_005566.3
39	METAP2	Methionyl aminopeptidase 2	NM_006838.3
40	MMP3	Matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	NM_002422.3
41	MMP7	Matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)	NM_002423.3
42	MMP9	Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase)	NM_004994.2
43	MSN	Moesin	NM_002444.2
44	NF2	Neurofibromin 2 (merlin)	NM_000268.3
45	NME1	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1	NM_000269.2
46	OCLN	Occludin	NM_001205254.1
47	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	NM_000291.3
48	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	NM_001005376.2
49	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	NM_000314.4
50	PTK2	Protein tyrosine kinase 2	NM_001199649.1

Table I. Continued.

No.	Gene symbol	Gene name	Accession no.
51	PXN	Paxillin	NM_001080855.2
52	RAC1	Ras-related C3 botulinumtoxin substrate 1 (Rho family, small GTP binding protein Rac1)	NM_006908.4
53	RAC2	Ras-related C3 botulinumtoxin substrate 2 (Rho family, small GTP binding protein Rac2)	NM_002872.3
54	REG1A	Regenerating islet-derived 1α	NM_002909.4
55	RHO	Rhodopsin	NM_000539.3
56	RHOA	Ras homolog family member A	NM_001664.2
57	RHOB	Ras homolog family member B	NM_004040.2
58	RHOC	Ras homolog family member C	NM_001042678.1
59	ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	NM_005406.2
60	S100P	S100 calcium binding protein P	NM_005980.2
61	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	NM_000602.4
62	SNAI1	Snail family zinc finger 1	NM_005985.3
63	SNAI2	Snail family zinc finger 2	NM_003068.4
64	SPP1	Secreted phosphoprotein 1	NM_001251830
65	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	NM_003150.3
66	TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	NM_002353.2
67	TGFB1	Transforming growth factor, β1	NM_000660.4
68	TIMP1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	NM_003254.2
69	TIMP2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	NM_003255.4
70	TM4SF1	Transmembrane 4 L six family member 1	NM_014220.2
71	TOB1	Transducer of ERBB2, 1	NM_005749
72.	TWIST1	Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1	NM_000474.3
73	VCAN	Versican	NM_004385
74	VCL	Vinculin	NM_003373.3
75	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	NM_001025366.2
76	VIM	Vimentin	NM_003380.3
77	ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1	NM_001128128.2

Table II. Upregulated and downregulated genes in the KKU-213L5 cells compared with the KKU-213 cells.

No.	Gene symbol	Gene name	Fold-change	P-value
Upregulated genes				
1	AGR2	Anterior gradient 2 homolog (*Xenopus laevis*)	3.41	1.00E-08
2	KRT13	Keratin 13	2.94	1.60E-07
3	EREG	Epiregulin	2.65	2.75E-06
4	FN1	Fibronectin 1	2.15	3.72E-02
5	JAG1	Jagged 1	1.53	4.59E-03
6	ANXA1	Annexin A1	1.22	3.34E-05
7	EGFR	Epidermal growth factor receptor	1.20	1.92E-03
Downregulated genes				
1	KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	0.31	3.30E-02
2	IFI27	Interferon, α-inducible protein 27	0.34	9.21E-06
3	VIM	Vimentin	0.45	4.85E-06
4	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	0.46	5.45E-03
5	PXN	Paxillin	0.49	7.97E-03

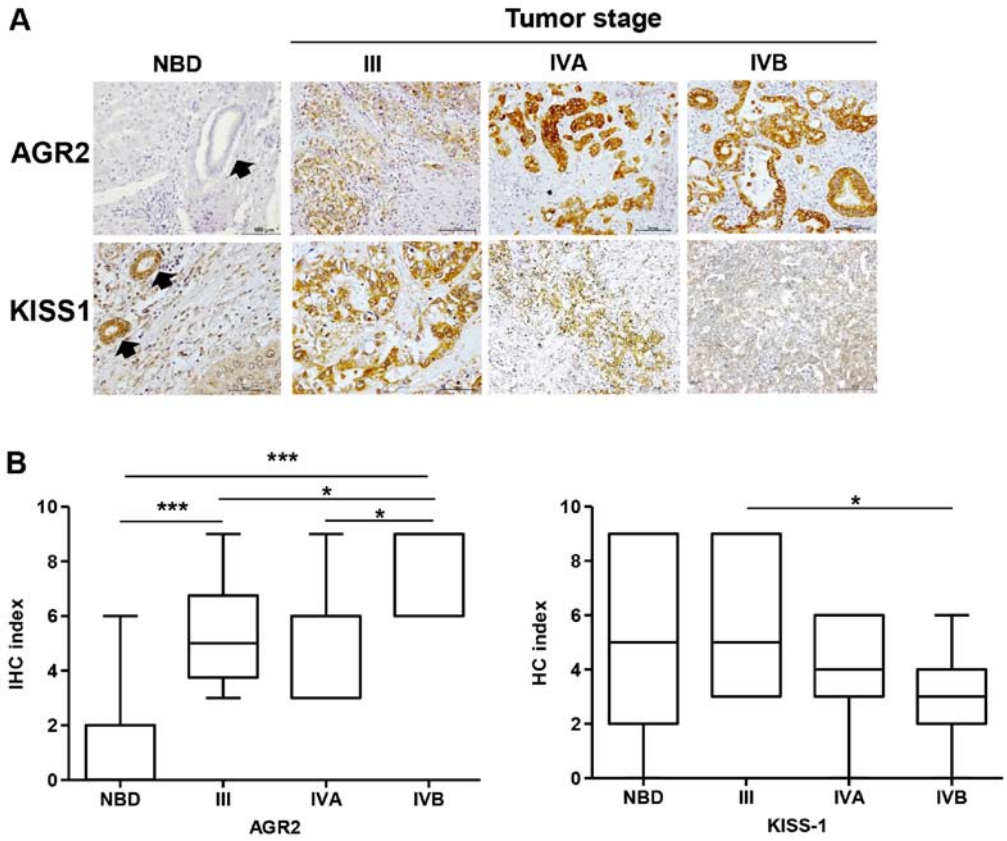


Figure 6. AGR2 and KiSS-1 expression in CCA patient tissues. Immunohistochemistry of AGR2 and KiSS-1 was performed in 32 cases of intrahepatic mass-forming CCA patient tissues with different tumor staging (A). The immunohistochemical (IHC) indices were determined in normal bile duct (NBD, n=30), CCA stage III (n=10), CCA stage IVA (n=11) and CCA stage IVB (n=11). Normal bile duct epithelia from adjacent non-tumorous tissues were assessed. Semi-quantitative analysis of AGR2 and KiSS-1 expression levels presented as IHC indices are shown in (B); *P<0.05, ***P<0.001.

Discussion

Metastasis is the major cause of cancer morbidity and mortality. The complex nature of metastasis dictates the necessity for experimental systems that more closely simulate endogenous contributing factors. In the present study, we report the establishment and comparative characterization of a novel highly metastatic subline, designated KKU-213L5 and its parental, KKU-213 cell line. The cell lines were compared *in vitro* for cell proliferation, stem cell markers, migratory and invasive abilities. The xenografted and tail vein metastatic mouse models were used to compare tumorigenicity and lung metastatic capability. Furthermore, AGR2 and KiSS-1 were first identified and shown to be associated with the metastatic status of the CCA patients.

The present search from 1985-2016 revealed that there were 21 CCA established cell lines from 16 reports, 3 of which were established from Thai CCA patients which were assumed to be associated with liver fluke infections: HuCCA-1 (16), KKU-100 (8) and RMCCA-1 (17). Similar to other solid tumors, CCA is characterized as a highly metastatic cancer, and the lung is the common site for metastasis (18). A greater understanding of the biology of pulmonary metastases is needed to improve treatment outcomes. There are several models of highly metastatic cell lines established in the mouse with varied advantages and disadvantages to each. The present study used the tail-vein metastasis model which involves the injection of tumor cells via tail vein and analysis of their ability to form tumors and/or to colonize at distant sites e.g. lung via hematogenous spread. This model generates lung colonization of CCA without other distant colonization sites. The pitfall of this assay is the lack of measurement of the earlier invasive and angiogenic stages of malignant progression, and therefore may be an incomplete measure of the metastatic process.

Cell morphology of the KKU-213L5 cells was not obviously different from that of the parental cells, however, the KKU-213L5 cells demonstrated a significant increased rate of proliferation, migration and invasion compared to the KKU-213 cells. LM8, a lung metastatic osteosarcoma cell line, obtained from murine Dunn osteosarcoma using a similar mouse protocol also had a higher growth rate than its parental cell line (19). Higher growth rate, migration and invasion than the parental cells seem to be distinct characteristics of highly metastatic cells as shown in the present study and previous studies (19-22). As it is well-known, cancer stem cells which represent a relatively tiny portion of the tumor are responsible for building a cancer mass and enhancing metastatic potential (14). In the present study, cells that possessed the surface stem cell markers were enriched in the KKU-213L5 cells containing considerably more of an apparent CD133-positive subpopulation than the KKU-213 cells. The association of a subgroup of hepatocellular carcinoma cells with $CD133^{+}CD44^{+}$ and hematogenous metastasis was reported (23). In addition, the correlation of high CD133

expression in CCA patient tissues with poor prognosis, with the tubular subtype, a higher tumor stage (T4), and shorter survival of these Thai CCA patients was previously reported (24). It is worth noting that the expression of CD44 appeared to be lower in the KKU-213L5 cells. CD44 is a pleomorphic protein and it has been shown that only specific variants of CD44 promote tumorigenesis (25). Altogether, these data support the hypothesis that the CSC population may confer higher metastatic activities to KKU-213L5.

The aggressiveness of the KKU-213L5 and KKU-213 cells was also demonstrated in the *in vivo* mouse models. The tumorigenicity and metastatic potential of KKU-213L5 were significantly higher than those of the KKU-213 cells as shown in the subcutaneous xenografted and tail-vein metastatic mouse models. The greater aggressiveness of KKU-213L5 was more obvious in the metastatic mouse model, by the fact that spontaneous pulmonary metastasis was significantly observed by determining KKU-213L5 > KKU-213. A few micrometastases were detected in the KKU-213 group 13 days post-injection, whereas at the same time period, a greater number of micrometastasis and macrometastasis (x20-fold) were found in lung tissues of the KKU-213L5-injected mice. The greater pulmonary metastasis of the KKU-213L5 group may be the cause of the significantly shorter survival in all KKU-213L5-injected mice when compared with the KKU-213-injected mice.

Metastasis requires functionally distinct sets of genes that provide metastatic initiation and progression. Cell migration and invasion are essential for early events in the metastatic process (26,27); therefore, attention was focused on a small group of potentially important genes related to cell motility and invasion. The differential expression of 77 selected genes analyzed between KKU-213L5 and KKU-213 revealed significant upregulation of AGR2 and downregulation of KiSS-1. These two genes exhibited the highest differential expression levels between the two cell lines and have never been previously described in CCA metastasis. Since the differences in the expression may or may not account for the highly metastatic potential of KKU-213L5 cells, AGR2 and KiSS-1 were further investigated for their association with metastasis in CCA patient tissues.

The metastasis-associated genes retrieved from the KKU-213L5 cells can reflect the metastasis involvement of these genes in CCA patients. The expression levels of AGR2 and KiSS-1 were verified in CCA patient tissues using immunohistochemistry. The potential relevance of AGR2 and KiSS-1 in metastasis of intrahepatic mass-forming CCA is suggested. AGR2 was rarely expressed in normal bile duct epithelia, but was increased gradually according to the progression of the metastatic stage. The significant increase in AGR2 expression and concomitant tumor stage progression may imply the association of AGR2 in the metastasis of CCA.

AGR2 belongs to a family of protein disulfide isomerases (PDIs). The secreted form of AGR2 has been shown to function at the cell surface and the extracellular matrix (28,29). Overexpression of AGR2 has been reported in various types of cancers and has been intensively studied in breast cancer. Overexpression of AGR2 was found to be related to the increase in cell survival and proliferation, whereas loss of AGR2 leads to a decrease in cell cycle progression and cell death (30-32). In addition, AGR2 was shown to promote metastasis of breast epithelial cells in an *in vivo* metastasis assay (33) and the secreted AGR2 plays roles in cellular adhesion and dissemination of metastatic tumor cells (34). Therefore, inhibition of AGR2 was suggested to be useful in the targeted therapy of breast cancer.

There are only two previous studies on AGR2 in CCA. The expression of AGR2 in normal bile duct epithelia and CCA from these studies is still controversial. Lepreux *et al* (35) observed AGR2 only in the peribiliary glands and the tall epithelial cells of hilar large bile ducts, while Kim *et al* (36) found general expression of AGR2 in the epithelia of intrahepatic and extrahepatic biliary tracts. Moreover, from Lepreux's study, only 21% (3/14) of intrahepatic CCA expressed AGR2, whereas those from Kim's study, 82% (9/11) were positive for AGR2. In the present study, upregulation of AGR2 expression in highly metastatic CCA cells and tissues was noted. Expression of AGR2 in advanced stage CCA was higher than that of earlier stage CCA. The discrepancy of AGR2 expression in CCA is varied among different study cohorts. Determination of AGR2 expression in association with clinicopathological information of patients in a larger sample size should be carefully conducted.

KiSS-1 is a member of the metastatic suppressors which can block metastasis without preventing primary tumor development. KiSS-1 effectively inhibits colonization of tumor cells, the last step of the metastatic cascade. Until the present search, there is no report on KiSS-1 in CCA. The role of KiSS-1 as a metastatic suppressor in CCA is emphasized in the present study by the fact that KiSS-1 expression was downregulated in the highly metastatic KKU-213L5 cells and was also decreased in the advanced stage CCA patient tissues. This observation agreed with clinical observations from various cancer patients. Immunohistochemistry studies of KiSS-1 in ovarian cancer revealed that the positivity of KiSS-1 was individually correlated with favorable prognosis and superior overall survival (37,38). Low KiSS-1 expression was found to be correlated with metastases and poor survival of patients with gastrointestinal (39,40) and pancreatic cancers (41,42). In contrast, the antimetastatic role of KiSS-1 in breast cancer is still controversial. Loss of KiSS-1 expression was found to be related to positive lymph nodes in breast adenocarcinomas (43) and brain metastases (44). Moreover, patients with high KiSS-1 expression exhibited shorter disease-free survival (45).

In conclusion, understanding the molecular mechanisms of CCA progression and metastasis is essential for improving the prevention and ensuring the effective control of the metastasis of CCA. To the best of our knowledge, KKU-213L5 is the first CCA cell line with relatively high metastatic activity, not only *in vitro* but also *in vivo*. The metastasis-associated genes retrieved from KKU-213L5 can reflect the metastasis involvement of these genes in CCA patients. It is likely that differential expression of genes between the parental KKU-213 and the highly metastatic KKU-213L5 cells may be valuable to discover novel genes that control metastasis. This cell line will be an excellent tool for further dissection of the molecular mechanisms underlying the metastasis of CCA as well as an appropriate model for studying inhibitory agents against metastasis and the treatment of CCA.

Acknowledgements

The present study was co-supported by Joint Research Grants from Khon Kaen University, the TRF Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund to S.W. (RTA5780012), the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Health Cluster to S.W. (NRU58-2014), the Khon Kaen University Research Fund to K.V. (KKU59-2403), the Joint Funding through Royal Golden Jubilee Ph.D. Program and Khon Kaen University to K.U. and S.W. (PHD/0211/2550), and Japan Student Services Organization to K.U. and S.O. We would like to acknowledge Professor James A. Will for editing the manuscript via Publication Clinic KKU, Thailand.

References

1. Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer 3: 453-458, 2003.
2. Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev 8: 98-101, 1989.
3. Wakahara T, Tsukamoto T, Kitamura S, Watanabe A, Tsujimura T, Nakamura Y, Toyokawa A, Onishi N, Hamabe Y, Mukai H, *et al*: Metastatic colon cancer from intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Surg 12: 415-418, 2005.
4. Yamamoto M, Takasaki K and Yoshikawa T: Lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma. Jpn J Clin Oncol 29: 147-150, 1999.
5. Kuroki T, Fukuda K, Tajima Y, Matsuzaki S, Kitajima T, Furui J and Kanematsu T: Parapapillary choledochoduodenal fistula associated with cholangiocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Surg 12: 143-146, 2005.
6. Takahashi I, Nakamura Y, Suzuki Y, Mitsuhashi N, Niibe H and Osada J: Case report: Bone metastasis from cholangiocarcinoma showing unusual accumulation on bone scintigraphy and 67Ga scintigraphy. Br J Radiol 67: 303-305, 1994.
7. Li SQ, Liang LJ, Hua YP, Peng BG, He Q, Lu MD and Chen D: Long-term outcome and prognostic factors of intrahepatic cholangiocarcinoma. Chin Med J 122: 2286-2291, 2009.
8. Sripa B, Leungwattanawanit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, Sripa C and Miwa M: Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). World J Gastroenterol 11: 3392-3397, 2005.
9. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T and Suzu S: Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3^{null} mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34^{+} cells. Int J Hematol 88: 476-482, 2008.
10. Patterson MK Jr: Measurement of growth and viability of cells in culture. Methods Enzymol 58: 141-152, 1979.
11. Grenman R, Burk D, Virolainen E, Buick RN, Church J, Schwartz DR and Carey TE: Clonogenic cell assay for anchorage-dependent squamous carcinoma cell lines using limiting dilution. Int J Cancer 44: 131-136, 1989.
12. Uthaisar K, Seubwai W, Srikoon P, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, Okada S and Wongkham S: Cepharanthine suppresses metastatic potential of human cholangiocarcinoma cell lines. Asian Pac J Cancer Prev 13 (Suppl): S149-S154, 2012.
13. Kan J, Thomson S, Argast GM, O'Connor ME, Robinson M, Feng B, Heyer J, Chiu MI and Nicoletti R: Use of EMT gene signatures in cancer drug discovery, diagnostics and treatment. US Patent Application Publication. Pub. No.: US2012/0302572 A1, 2012.
14. Li F, Tiede B, Massagué J and Kang Y: Beyond tumorigenesis: Cancer stem cells in metastasis. Cell Res 17: 3-14, 2007.
15. Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR, Shetty K, Johnson L and Reddy EP: Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. Hepatology 49: 318-329, 2009.
16. Sirisinha S, Tengchaisri T, Boonpucknavig S, Prempracha N, Ratanarapee S and Pausawasdi A: Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line from a Thai patient with intrahepatic bile duct cancer. Asian Pac J Allergy Immunol 9: 153-157, 1991.
17. Rattanasinganchan P, Leelawat K, Treepongkaruna SA, Tocharoentanaphol C, Subwongcharoen S, Suthiphongchai T and Tohtong R: Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient. World J Gastroenterol 12: 6500-6506, 2006.
18. Goodman ZD, Terracciano LM and Wee A: 14 - Tumours and tumour-like lesions of the liver. In: MacSween's Pathology of the Liver. Burt AD, Portmann BC and Ferrell LD (eds). 6th edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp761-851, 2012.
19. Asai T, Ueda T, Itoh K, Yoshioka K, Aoki Y, Mori S and Yoshikawa H: Establishment and characterization of a murine osteosarcoma cell line (LM8) with high metastatic potential to the lung. Int J Cancer 76: 418-422, 1998.
20. Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM and Bao WH: Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. World J Gastroenterol 7: 630-636, 2001.
21. Barroga EF, Kadosawa T, Okumura M and Fujinaga T: Establishment and characterization of the growth and pulmonary metastasis of a highly lung metastasizing cell line from canine osteosarcoma in nude mice. J Vet Med Sci 61: 361-367, 1999.
22. Su Y, Luo X, He BC, Wang Y, Chen L, Zuo GW, Liu B, Bi Y, Huang J, Zhu GH, *et al*: Establishment and characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line. Clin Exp Metastasis 26: 599-610, 2009.
23. Hou Y, Zou Q, Ge R, Shen F and Wang Y: The critical role of CD133^{+}CD44$^{+/high}$ tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. Cell Res 22: 259-272, 2012.
24. Thanan R, Pairojkul C, Pinlaor S, Khuntikeo N, Wongkham C, Sripa B, Ma N, Vaeteewoottacharn K, Furukawa A, Kobayashi H, *et al*: Inflammation-related DNA damage and expression of CD133 and Oct3/4 in cholangiocarcinoma patients with poor prognosis. Free Radic Biol Med 65: 1464-1472, 2013.
25. Guo W and Frenette PS: Alternative CD44 splicing in intestinal stem cells and tumorigenesis. Oncogene 33: 537-538, 2014.
26. Hajra KM and Fearon ER: Cadherin and catenin alterations in human cancer. Genes Chromosomes Cancer 34: 255-268, 2002.
27. Skubitz AP: Adhesion molecules. Cancer Treat Res 107: 305-329, 2002.
28. Adam PJ, Boyd R, Tyson KL, Fletcher GC, Stamps A, Hudson L, Poyser HR, Redpath N, Griffiths M, Steers G, *et al*: Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. J Biol Chem 278: 6482-6489, 2003.
29. Dumartin L, Whiteman HJ, Weeks ME, Hariharan D, Dmitrovic B, Iacobuzio-Donahue CA, Brentnall TA, Bronner MP, Feakins RM, Timms JF, *et al*: AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D. Cancer Res 71: 7091-7102, 2011.
30. Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J and Janatpour MJ: Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-α and survivin. Breast Cancer Res 12: R32, 2010.
31. Park K, Chung YJ, So H, Kim K, Park J, Oh M, Jo M, Choi K, Lee EJ, Choi YL, *et al*: AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration. Exp Mol Med 43: 91-100, 2011.
32. Wang Z, Hao Y and Lowe AW: The adenocarcinoma-associated antigen, *AGR2*, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation. Cancer Res 68: 492-497, 2008.
33. Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A and Barraclough R: Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas. Cancer Res 65: 3796-3805, 2005.
34. Chanda D, Lee JH, Sawant A, Hensel JA, Isayeva T, Reilly SD, Siegal GP, Smith C, Grizzle W, Singh R, *et al*: Anterior gradient protein-2 is a regulator of cellular adhesion in prostate cancer. PLoS One 9: e89940, 2014.
35. Lepreux S, Bioulac-Sage P and Chevet E: Differential expression of the anterior gradient protein-2 is a conserved feature during morphogenesis and carcinogenesis of the biliary tree. Liver Int 31: 322-328, 2011.
36. Kim SJ, Kim DH, Kang D and Kim JH: Expression of anterior gradient 2 is decreased with the progression of human biliary tract cancer. Tohoku J Exp Med 234: 83-88, 2014.
37. Hata K, Dhar DK, Watanabe Y, Nakai H and Hoshiai H: Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer. Eur J Cancer 43: 1452-1459, 2007.

38. Prentice LM, Klausen C, Kalloger S, Köbel M, McKinney S, Santos JL, Kenney C, Mehl E, Gilks CB, Leung P, *et al*: Kisspeptin and GPR54 immunoreactivity in a cohort of 518 patients defines favourable prognosis and clear cell subtype in ovarian carcinoma. BMC Med 5: 33, 2007.
39. Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, Tachibana M, Ono T, Otani H and Nagasue N: Downregulation of *KiSS-1* expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. Int J Cancer 111: 868-872, 2004.
40. Guan-Zhen Y, Ying C, Can-Rong N, Guo-Dong W, Jian-Xin Q and Jie-Jun W: Reduced protein expression of metastasis-related genes (nm23, KISS1, KAI1 and p53) in lymph node and liver metastases of gastric cancer. Int J Exp Pathol 88: 175-183, 2007.
41. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, Ito D, Peiper SC, Broach JR, Oishi S, *et al*: Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 315: 85-92, 2004.
42. Nagai K, Doi R, Katagiri F, Ito T, Kida A, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi Y, Tomita K, Oishi S, *et al*: Prognostic value of metastin expression in human pancreatic cancer. J Exp Clin Cancer Res 28: 9, 2009.
43. Kostadima L, Pentheroudakis G and Pavlidis N: The missing kiss of life: Transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. Anticancer Res 27: 2499-2504, 2007.
44. Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM and Held-Feindt J: Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. J Cancer Res Clin Oncol 131: 191-198, 2005.
45. Marot D, Bieche I, Aumas C, Esselin S, Bouquet C, Vacher S, Lazennec G, Perricaudet M, Kuttenn F, Lidereau R, *et al*: High tumoral levels of *Kiss1* and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors. Endocr Relat Cancer 14: 691-702, 2007.

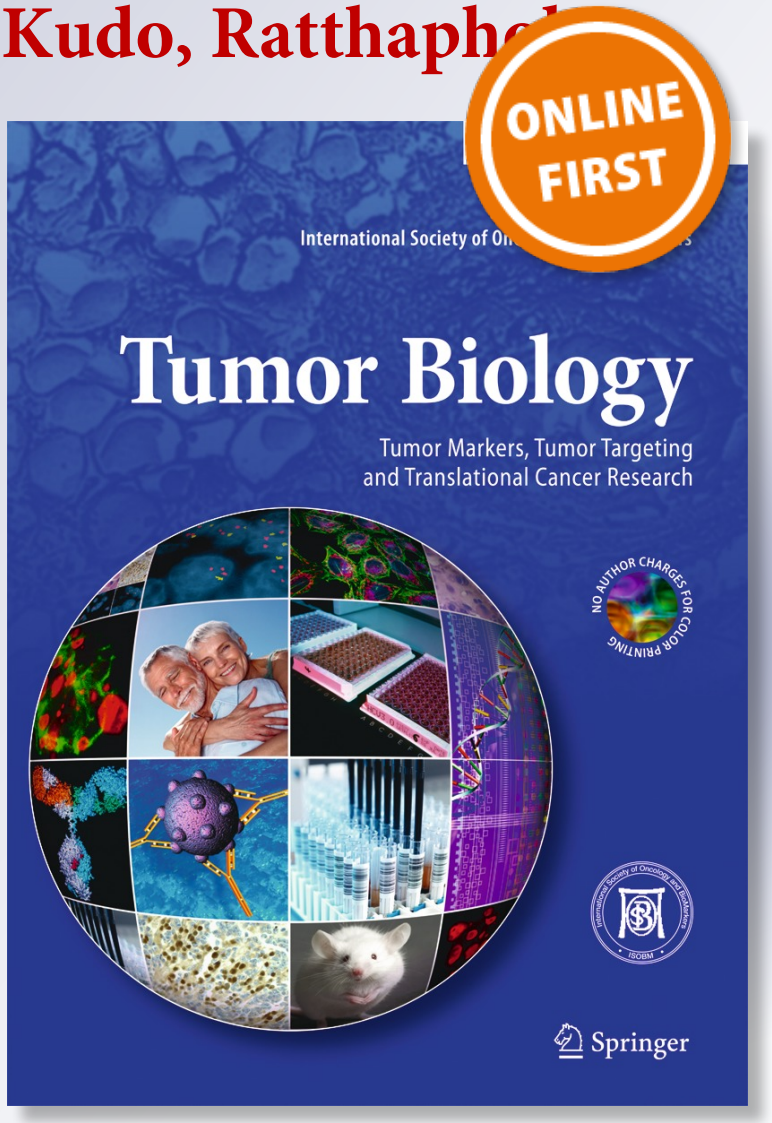
Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma

Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Paweena Dana, Sawako Fujikawa, Kouki Matsuda, Koichi Ohkuma, Eriko Kudo, Ratthaph

Tumor Biology
Tumor Markers, Tumor Targeting and Translational Cancer Research

ISSN 1010-4283

Tumor Biol.
DOI 10.1007/s13277-016-4785-8



Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM). This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Author's personal copy

Tumor Biol.
DOI 10.1007/s13277-016-4785-8

ORIGINAL ARTICLE

Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma

Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2,3] · Ryusho Kariya[1] · Paweena Dana[2,3] · Sawako Fujikawa[1] · Kouki Matsuda[1] · Koichi Ohkuma[1] · Eriko Kudo[1] · Ratthaphol Kraiklang[3,4] · Chaisiri Wongkham[2,3] · Sopit Wongkham[2,3] · Seiji Okada[1]

Received: 4 November 2015 / Accepted: 4 January 2016
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2016

Abstract Cholangiocarcinoma (CCA) is a unique liver cancer subtype with an increasing incidence globally. The lack of specific symptoms and definite diagnostic markers results in a delayed diagnosis and disease progression. Systemic chemotherapy is commonly selected for advanced CCA even though its advantages remain unknown. Targeted therapy, especially anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapy, is promising for CCA; however, improvements in the therapeutic regimen are necessary to overcome subsequent resistance. We demonstrated VEGF expression was higher in CCA cell lines than in other liver cancer cells. Secreted VEGFs played roles in the induction of peri- and intra-tumoral vascularization. VEGF neutralization by bevacizumab effectively reduced tumor growth, mainly through the suppression of angiogenesis; however, increases in the expression of hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α) and HIF1α-responsive genes (such as VEGF, VEGFR1, VEGFR2, carbonic anhydrase (CA) IX and CAXII) indicated the potential for subsequent therapeutic resistance. Supplementation with a carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, enhanced the anti-CCA effects of bevacizumab. Anti-angiogenesis and anti-proliferation were observed with the combination treatment. These results suggested a novel treatment strategy to overcome anti-angiogenesis resistance and the importance of "induced essentiality" in the treatment of CCA.

Keywords Cholangiocarcinoma · Vascular endothelial growth factor · Anti-angiogenic treatment · Carbonic anhydrase · Hypoxia-inducible factor 1α

Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant subtype of liver tumors. It is rare worldwide, but the global incidence is increasing [1]. The prognosis of CCA is poor due to delayed diagnosis and treatment [2]. A curative choice for CCA is complete resection [3]; however, less than 50 % of patients are candidates [4] and the 5-year survival rate of patients who undergo aggressive resection is only 10–40 % [3]. Although postoperative chemotherapeutic outcomes are still inconclusive, the high incidence of local recurrence suggests the requirement of adjuvant therapy [3]. The benefits of palliative combined chemotherapy for unresectable tumors remain controversial; response rates are 21–26 %, and median overall survival is 11–11.7 months [5, 6]. Hence, improved chemotherapeutic regimens are urgently needed.

Molecular targeted therapy has been proposed as an alternative treatment for CCA, but the clinical trial results were not impressive [7]. The overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in more than 50 % of CCA implied its potential use as a therapeutic target [8, 9]; nevertheless,

✉ Seiji Okada
okadas@kumamoto-u.ac.jp

[1] Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan

[2] Department of Biochemistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

[3] Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

[4] Department of Nutrition, Faculty of Public Heath, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Published online: 13 January 2016

Author's personal copy

combined chemotherapy with an anti-angiogenic treatment showed a superior response rate of 40 % and survival benefit of only 1 month longer than chemotherapy alone [10]. The unsatisfactory outcome of combined regimens indicates the molecular adaptation to anti-angiogenic therapy [11, 12], yet the mechanism has never been addressed.

The molecular mechanisms by which cancer becomes resistant to anti-angiogenic therapy are largely related to the adaptive responses to low tissue perfusion and oxygenation, which would induce the expressions of hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α) and hypoxia-responsive genes, such as *vascular endothelial growth factor* (*VEGF*), *vascular endothelial growth factor receptor 1* (*VEGFR1*), *VEGFR2*, *carbonic anhydrase IX* (*CAIX*), *and CAXII* [13, 14]. The induced expression of HIF1α and other hypoxia-inducible proteins represent the main challenges to overcoming anti-angiogenic resistance. The importance of "induced essentiality" as a result of hypoxic adaptation has been established [14–18]. The abrogation of hypoxic adaptation has been proposed as a novel target for cancers with anti-angiogenic resistance.

CCA responses to hypoxic conditions have been demonstrated. Hypoxic CCA acquires (1) the resistance to common chemotherapeutic agents, such as 5-fluorouracil, cisplatin, and doxorubicin, and (2) the increased migration capability [19, 20]. Moreover, the upregulated expression of HIF1α in CCA tissues from patients suggested the existence of unfavorable factors for anti-angiogenic treatments [20, 21]. In the present study, the benefits of anti-angiogenic treatment for CCA, using bevacizumab as a model, were shown. The adaptation of CCA cells to bevacizumab treatment was demonstrated in vivo and the benefits of using acetazolamide, an inhibitor of hypoxia-inducible carbonic anhydrase (CA), in combination with bevacizumab for the treatment of CCA were established as a novel strategy to potentiate anti-angiogenic effects. This approach may be useful for augmenting the efficacy of anti-VEGF therapy in CCA.

Materials and methods

Reagents

Bevacizumab was obtained from Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Acetazolamide was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Cell lines

Five CCA cell lines; KKU100, KKU-M055, KKU-M156, KKU-M213, and KKU-M214, two hepatocellular carcinoma cell lines; HepG2 and Huh7, an immortalized cholangiocyte cell line; MMNK-1, and human umbilical endothelial vein cells (HUVEC), were selected for this study. HepG2 and Huh7 were kindly provided by Prof. Kyoko Tsukiyama-Kohara (Kagoshima University, Japan), MMNK-1 was kindly provided by Dr. Naoya Kobayashi (Okayama University, Japan) [22], and KKU100, KKU-M055, KKU-M156, KKU-M213, and KKU-M214 were kindly provided by Prof. Banchob Sripa (Khon Kaen University, Thailand) [23, 24]. mCherry-expressing KKU-M213 cells were generated as previously described [25]. HUVEC were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wako, Osaka, Japan). All media were supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Inc., UT, USA), 100 U/mL penicillin (Wako), and 100 μg/mL streptomycin (Wako), unless otherwise specified in the protocols. HUVEC was cultured as recommended (ATCC, Manassas, VA, USA). HUVEC was cultured in the EGM bullet kit medium (Lonza, Walkersville, MD) and at passage 4 and 5, cells and conditioned media were collected for further studies. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 atmosphere.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from cells using RNAiso Plus (TaKaRa bio, Otsu, Japan) and was reverse transcribed by the PrimeScript RT master mix (TaKaRa bio) according to the manufacturer's instructions.

Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)

The expression of *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *CAIX*, and *CAXII* was detected using the Fast SYBR Green Master mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) and the StepOne™ real-time PCR system (Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations. The expression of *GADPH* was determined and served as an internal control. Normalized gene expressions were calculated using StepOne™ Software V.2.1 (Applied Biosystems). Gene expression levels were expressed as relative quantities of the specific gene in each sample.

The oligonucleotide primers used in this study were previously reported elsewhere; *hVEGF* [26], *hVEGFR1*, *hVEGFR2* [27], *hCAIX*, *hCAXII* [15], and *GADPH* [28].

VEGF ELISA

VEGF levels in conditioned media obtained from cell lines were quantified by the Human VEGF ELISA kit (Invitrogen, Fredrick, MD, USA) according to the

Author's personal copy

manufacturer's instruction. Absorbance at 450 nm was determined by the iMark microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Immunoprecipitation and Western blot analysis

To analyze the expression of VEGFR1 and VEGFR2, immunoprecipitation was performed to concentrate the protein as described previously [29]. In brief, a total cell lysate was incubated with 2 μg of anti-VEGFR1 (C-17), anti-VEGFR2 (A-3) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), or control IgG. The antibody was immobilized using protein G Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), which were then washed, eluted, and subjected to SDS-PAGE and immunodetection.

In vivo assay

In vivo angiogenesis

To determine the in vivo effects of cell line-secreted products on tumor angiogenesis, $2x10^6$ cells of five CCA cell lines were subcutaneously injected into both flanks of Rag-2 and Jak3 double deficient Balb/c nude mice (Nude-R/J mice) [30] (2 injection sites/mouse, $n = 2–3$ mice/group). Tumors were removed at 2 weeks, fixed and then paraffin-embedded tissues were prepared.

In vivo effects of the bevacizumab treatment alone or in combination with acetazolamide

mCherry-expressing KKU-M213 (1×10^6 cells) were subcutaneously injected into both flanks of the enhanced green fluorescent protein (EGFP)-expressing Nude-R/J mice (Nude-R/J-EGFP) [25] ($n = 7–8$/group). The treatment was started at day 3 when the injected tumors were detectable. The bevacizumab was administered intraperitoneally at 0.1 mg/mouse every third day [26]. Tumor sizes were measured and volume was calculated [31]. On day 14, the fluorescent intensities emitted from tumors were quantified by the CRi Maestro™ in vivo imaging system (Cambridge Research & Instrumentation, MA, USA). The fluorescent signals were expressed as signal count per second. Tumors were then removed, weighed, and divided into two parts as follows: (1) RNA extraction and (2) cryopreservation in OCT media (Leica Microsystems, Tokyo, Japan). In the combination treatment, acetazolamide (Sigma-Aldrich) was simultaneously injected intraperitoneally at 20 mg/kg/mouse every day [32].

Mice were housed and monitored in the animal research facility according to institutional guidelines. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Kumamoto University, Japan.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as standard protocol. Signals were enhanced using the Vectastain Elite ABC standard kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Detection was performed using the Histofine® DAB substrate kit (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan). For double staining, the immunostaining signals were developed using DAB substrate kit, followed by the Histofine® Simple Stain TM AEC solution (Nichirei Bioscience).

The sources of antibodies were as follows: anti-CK19 (0.8 μg/mL, HPA002465, a bile duct marker) was from Sigma-Aldrich, anti-HIF1α (2 μg/mL, H-206) was from Santa Cruz Biotechnology, anti-CD31 (16 μg/mL, MEC13.3, an endothelial marker) was from Biolegend (San Diego, CA, USA), anti-Ki-67 (0.4 μg/mL, MIB-1) was from Dako (Glostrup, Denmark), and biotinylated goat anti-mouse IgG (7.5 μg/mL) and biotinylated goat anti-rabbit IgG (7.5 μg/mL) were from Vector Laboratories.

The immunostained signals were determined from 6 to 10 fields (×200 magnification) by the BZ-8100 Biozero fluorescent microscope (Keyence, Osaka, Japan) and were quantified using BZ-II Analyzer (Keyence). Data were presented as the percentage of the stained area for CK19 and CD31 and as the percentage of stained nuclei for HIF1α and Ki-67.

Statistical analysis

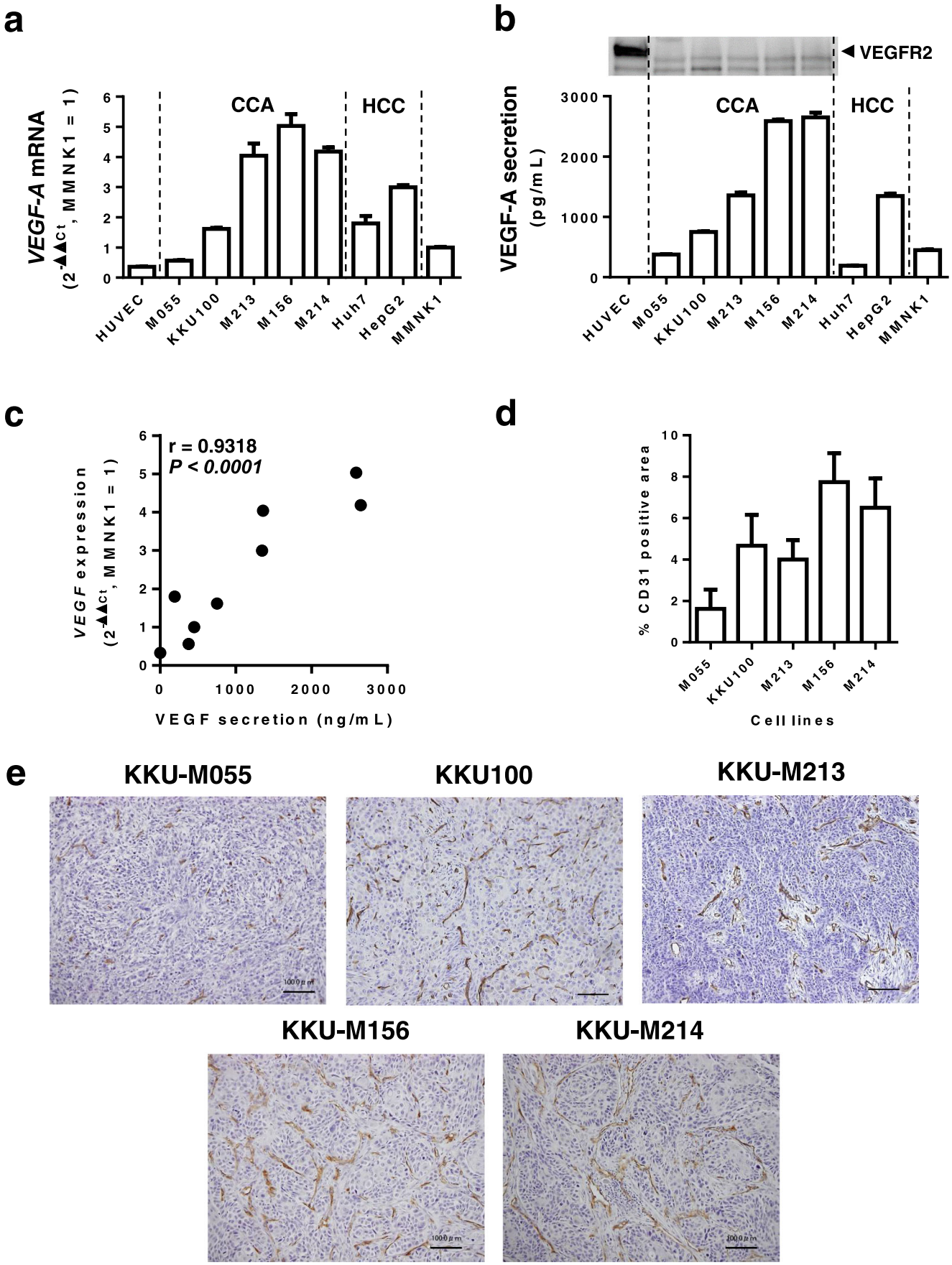
The significance of the differences observed between experimental groups was determined by the Mann-Whitney test using GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). $p < 0.05$ was considered significant. In the correlation study, Pearson's correlation coefficient (r) was calculated.

Results

VEGF expression in CCA cell lines and its role in tumor angiogenesis in vivo

VEGF messenger RNAs (mRNAs) and the secreted proteins in the cell culture supernatants of five CCA cell lines (KKU-100, KKU-M055, KKU-M156, KKU-M213, and KKU-M214), two hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2 and Huh7), an immortalized cholangiocyte cell line (MMNK-1), and human umbilical vein cells (HUVEC) were analyzed. High VEGF mRNAs and proteins were detected in KKU-M156 and KKU-M214 (Fig. 1a, b). The moderate expressions in KKU-100 and KKU-M213 were similar to that in HepG2 while the expressions were lower in KKU-M055 and Huh7. The

Author's personal copy



Author's personal copy

◀ **Fig. 1** VEGF expression in CCA cell lines and its role in tumor angiogenesis. VEGF mRNA (**a**) and secreted protein levels (**b**) were examined in five CCA cell lines, two hepatoma cell lines, an immortalized cholangiocyte cell line, and HUVEC. mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR and secreted VEGF was determined by ELISA. The expression of VEGFR2 in CCA cell lines and HUVEC was compared by immunoprecipitation and immunodetection (**b**, *small inset*). **c** The relationship between VEGF mRNA and its secreted protein was demonstrated by Pearson's correlation coefficient (r). **e** The effects of tumor-secreted VEGF on tumor angiogenesis were determined in xenograft-transplanted tumor tissues. The percentage of CD31-positive areas, endothelial areas, were determined from paraffin embedded tissues and were presented in (**d**)

VEGF expressions in MMNK-1 and HUVEC cells were very low or undetectable. The expressions of VEGF mRNAs and proteins (demonstrated in Fig. 1a, b) were correlated well (Fig. 1c, Pearson's $r = 0.9318$, $p < 0.0001$).

The function of VEGF in cancer cells was previously reported to be exerted through vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) and VEGFR2 [33]. The expression of both of these receptors was determined in cholangiocarcinoma cell lines; however, neither VEGFR1 nor VEGFR2 was detected in any CCA cell line, as determined by conventional immunodetection. We performed immunoprecipitation to enrich receptor concentrations. Representative data was presented for VEGFR2 expression (Fig. 1b, small inset). Similar results were obtained from the detection of VEGFR1 (data not shown). Neither VEGFR1 nor VEGFR2 was detected in CCA cell lines.

Therefore, secreted VEGF was proposed to target the tumor microenvironment, especially endothelial cells. The effects of VEGF from CCA cells were evaluated in an in vivo xenograft model. CCA cell lines were subcutaneously injected into Nude-R/J mice (four injected sites/cell lines). The tumor masses were removed 2 weeks after transplantation, and the levels of angiogenesis in the tumor mass were evaluated by the immunohistochemical staining of CD31, a marker of endothelial cells (Fig. 1d, e). The xenograft tumors obtained from KKU-M156 and KKU-M214 had the highest percentages of CD31-positive areas while the lowest was observed in the tumors from KKU-M055. CD31-positive areas in KKU-100 and KKU-M213 tumors were higher than those of KKU-M055. The correlation between VEGF protein secretion and CD31-positive area were determined. CD31-positive area was correlated well with the level of secreted VEGF (Pearson's $r = 0.9071$, $p = 0.033$). These results indicated that the function of secreted VEGF from CCA cells was partly through the induction of angiogenesis.

Antitumor effects of bevacizumab on CCA growth

A role of CCA VEGF on tumor angiogenesis prompted us to determine its functional significance on tumor growth. Bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody, was selected for VEGF neutralization. We did not observe the effects of bevacizumab on CCA cell proliferation in vitro (data not shown); therefore, the effects of bevacizumab on CCA growth were examined in vivo. KKU-M213 was selected as a representative CCA cell line because of its moderate secretion of VEGF than other CCA cell lines. mCherry-expressing KKU-M213 were injected subcutaneously into both flanks of the Nude-R/J-EGFP mouse and the bevacizumab was injected every 3 days for three times. The results showed bevacizumab effectively inhibited tumor growth, as demonstrated by tumor volumes, tumor weights, and the fluorescent intensities emitted from the tumor cells (Fig. 2a–b, e). The representative mice from the control (left) and bevacizumab-treated groups (right) were shown in Fig. 2d. No significant differences were observed in body weight changes between bevacizumab-treated mice and control mice, which suggested that the treatment has no serious effects (Fig. 2c). The correlation of tumor weights and fluorescent signals was shown in Fig. 2f (Pearson's $r = 0.8609$, $p < 0.0001$).

Effects of bevacizumab on tumor angiogenesis and tissue hypoxia

The effects of bevacizumab on tumor angiogenesis were observed grossly (Fig. 3a, b) and microscopically (Fig. 3c, d). Few blood vessels were observed in the peri- and intra-tumoral areas of the bevacizumab-treated group. The percentage of the CD31-positive area was smaller in bevacizumab-treated tumors (Fig. 3d, 8.45 ± 2.14 % in the bevacizumab-treated group vs. 14.78 ± 2.15 % in the control group, $p < 0.0001$). A compromised tumor blood supply has been directly correlated with tumor hypoxia, thereby leading to hypoxic adaptation [14]. This finding prompted us to investigate the expression of hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α) in tumor masses. Representative double staining; HIF1α (red) and CD31 (brown), pictures of tumor masses obtained from the control group (left) and bevacizumab-treated group (right) were shown in Fig. 3e. The down-regulated expression of CD31 and upregulated expression of HIF-1α were observed in tumor masses from the bevacizumab-treated group.

Effects of bevacizumab on HIF1α and HIF1α-responsive genes

The effects of bevacizumab on HIF1α expression were shown in Fig. 4a, c. The higher HIF1α-positive nuclei were detected in the bevacizumab-treated group than in control (14.22 ± 15.80 % vs. 1.42 ± 2.28 %, $p = 0.001$).

Author's personal copy

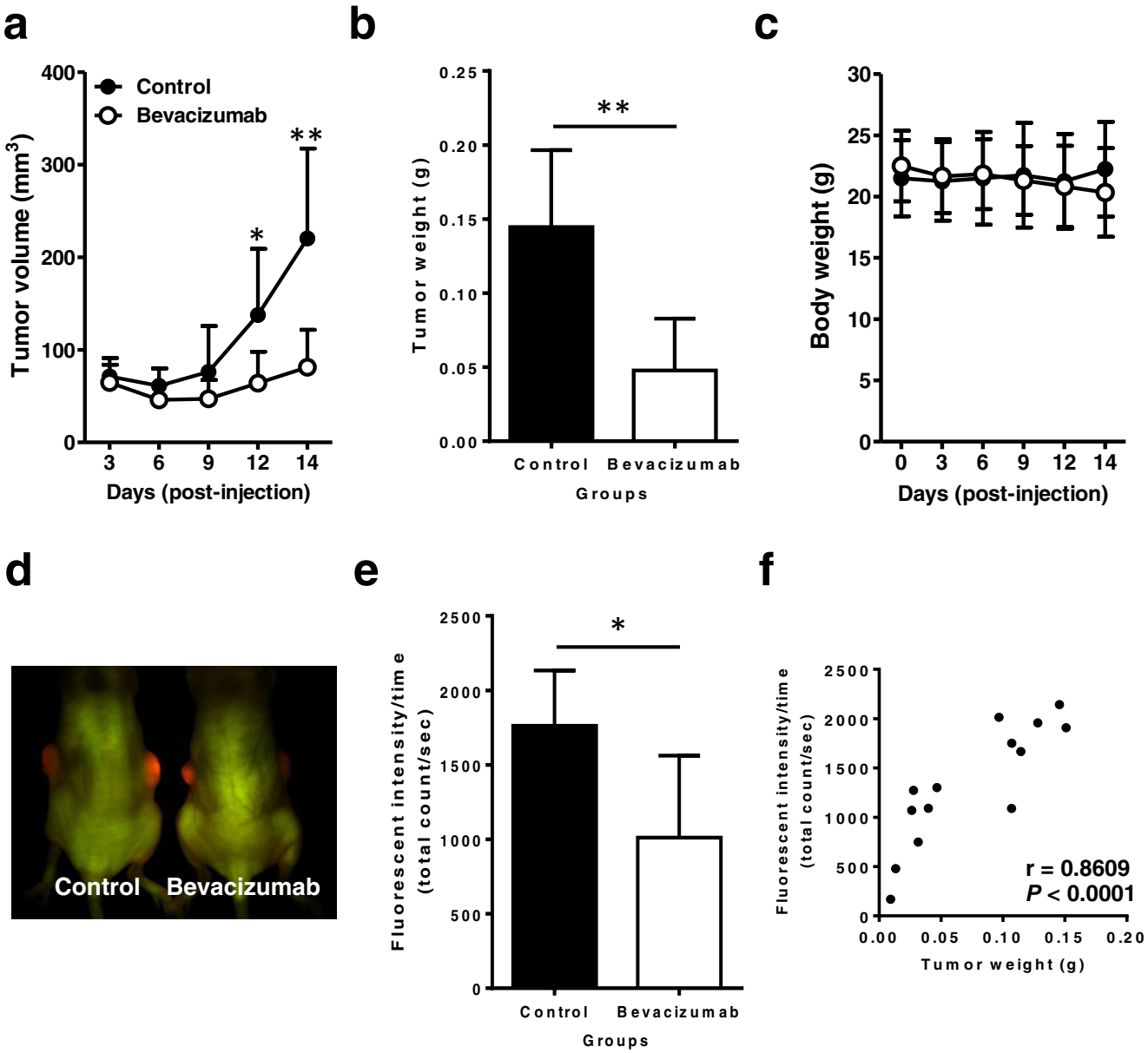
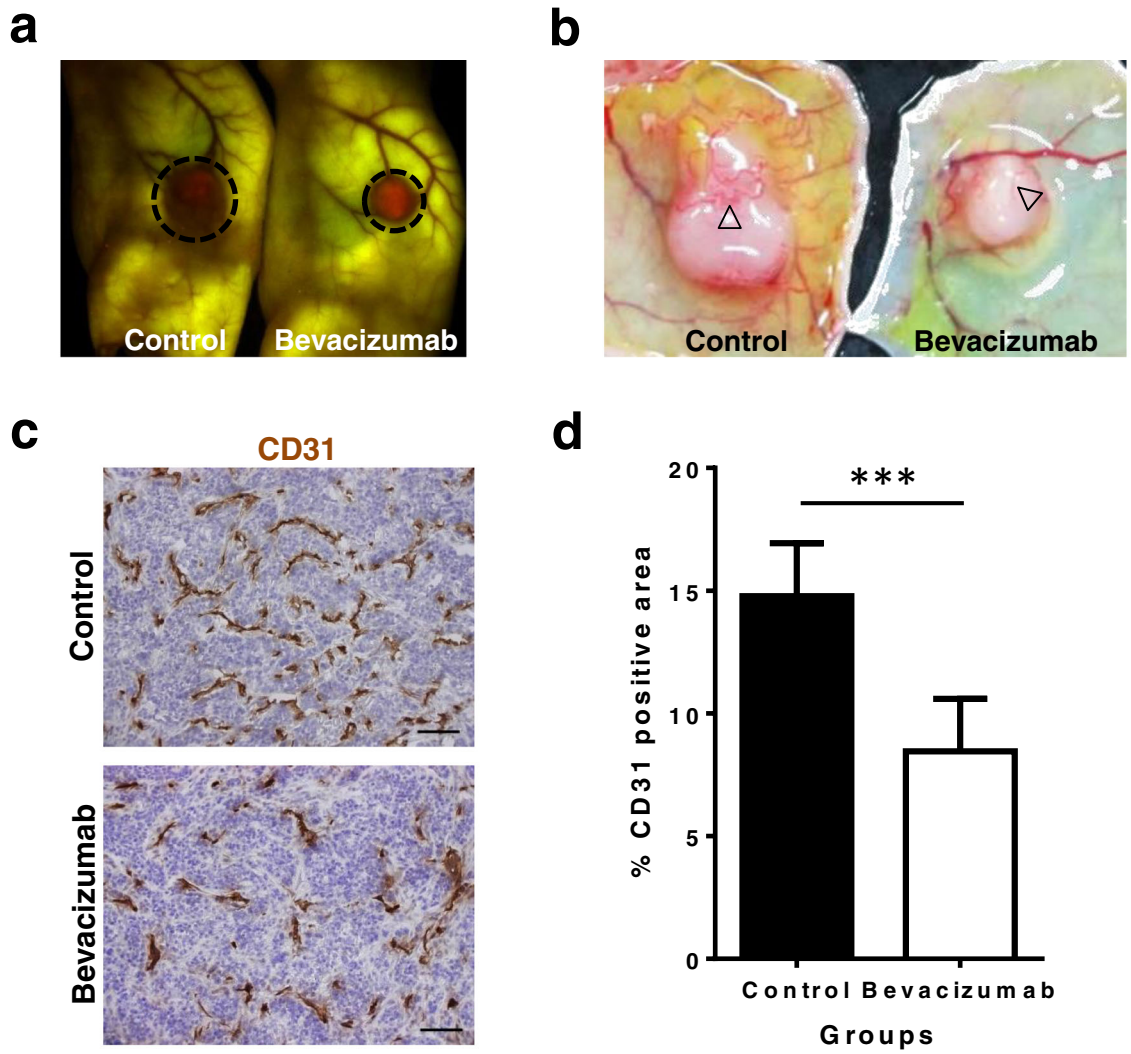


Fig. 2 The anti-VEGF antibody, bevacizumab, suppressed mCherry-expressing KKU-M213 CCA xenograft tumor growth. **a** Tumor volumes, **b** tumor weights, **c** body weights, and **e** fluorescent intensities emitted per second from CCA cells in control and bevacizumab-treated groups ($n = 7$ mice/group). **d** A fluorescent picture representing the red fluorescent signals emitted from CCA cells on Nude-R/J-EGFP mice. **f** The relationship between the fluorescent intensities emitted from tumors per second and tumor weights was demonstrated by Pearson's correlation coefficient (r). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$

This result was consistent with the increased expressions of HIF1α-responsive genes; *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR*, *CAIX*, and *CAXII* (Fig. 4e and f). Higher CCA densities were observed in tumors obtained from the bevacizumab-treated group, as demonstrated by the percentage of cytokeratin-19 (CK19)-positive area (78.13 ± 5.89 % vs. 70.13 ± 4.35 %, $P = 0.0005$). No significant differences were observed in the percentage of Ki-67-positive nuclei (Fig. 4d, 18.80 ± 7.04 % vs. 16.08 ± 13.06 %, $p = 0.9145$).

Fig. 3 Bevacizumab suppressed mCherry-expressing KKU-M213 CCA-induced angiogenesis. **a** A fluorescent picture and **b** photograph picture showing peri-tumoral angiogenesis. **c** Intra-tumoral microvascular density was demonstrated by CD31 staining. Bar = 100 μm. **d** The percentages of CD31-positive areas in fresh frozen tissues of control and bevacizumab-treated groups were quantitated. **e** The overall expression of intra-tumoral HIF1α and CD31 in representative tumors from the control and bevacizumab-treated groups were shown. Bar = 3000 μm. ***$p < 0.0001$

Author's personal copy



Author's personal copy

Combined effects of bevacizumab and the carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide

The significant induction of the expression of *CAIX* and *CAXII* mRNA in bevacizumab-treated tumors (Fig. 4f) guided us to examine the effect of combined anti-carbonic anhydrase. Acetazolamide, a carbonic anhydrase inhibitor, was selected. Tumor-bearing mice were divided into four groups as follows: control, acetazolamide-treated, bevacizumab-treated, and combined-treatment groups. All treatments were started on day 3 and mice were sacrificed on day 14 after tumor transplantation. Tumors were collected and weighed. The results showed the combination treatment inhibited tumor growth more effectively than bevacizumab treatment alone (Fig. 5a, b) and had similar effects on tumor angiogenesis (Fig. 5c–e). The CD31-positive area was 14.69 ± 4.99 % in control, 7.55 ± 3.12 % in bevacizumab and 7.30 ± 2.88 % in combination treatment groups. The CD31-positive areas in acetazolamide-treated tumors (16.56 ± 5.03 %) were comparable to those of control. However, when tumor cell proliferation was evaluated by Ki-67 staining, the results showed the percentage of Ki-67-positive nuclei was significantly lower in the combination treatment than in the bevacizumab treatment (5.00 ± 0.87 % vs. 11.89 ± 1.76 %, $p < 0.0001$). The similar anti-proliferative result was observed with the acetazolamide treatment alone (4.44 ± 0.53 %). Hence, the effects observed in the combination treatment were the combined effects of bevacizumab anti-angiogenesis and acetazolamide anti-proliferation.

Discussion

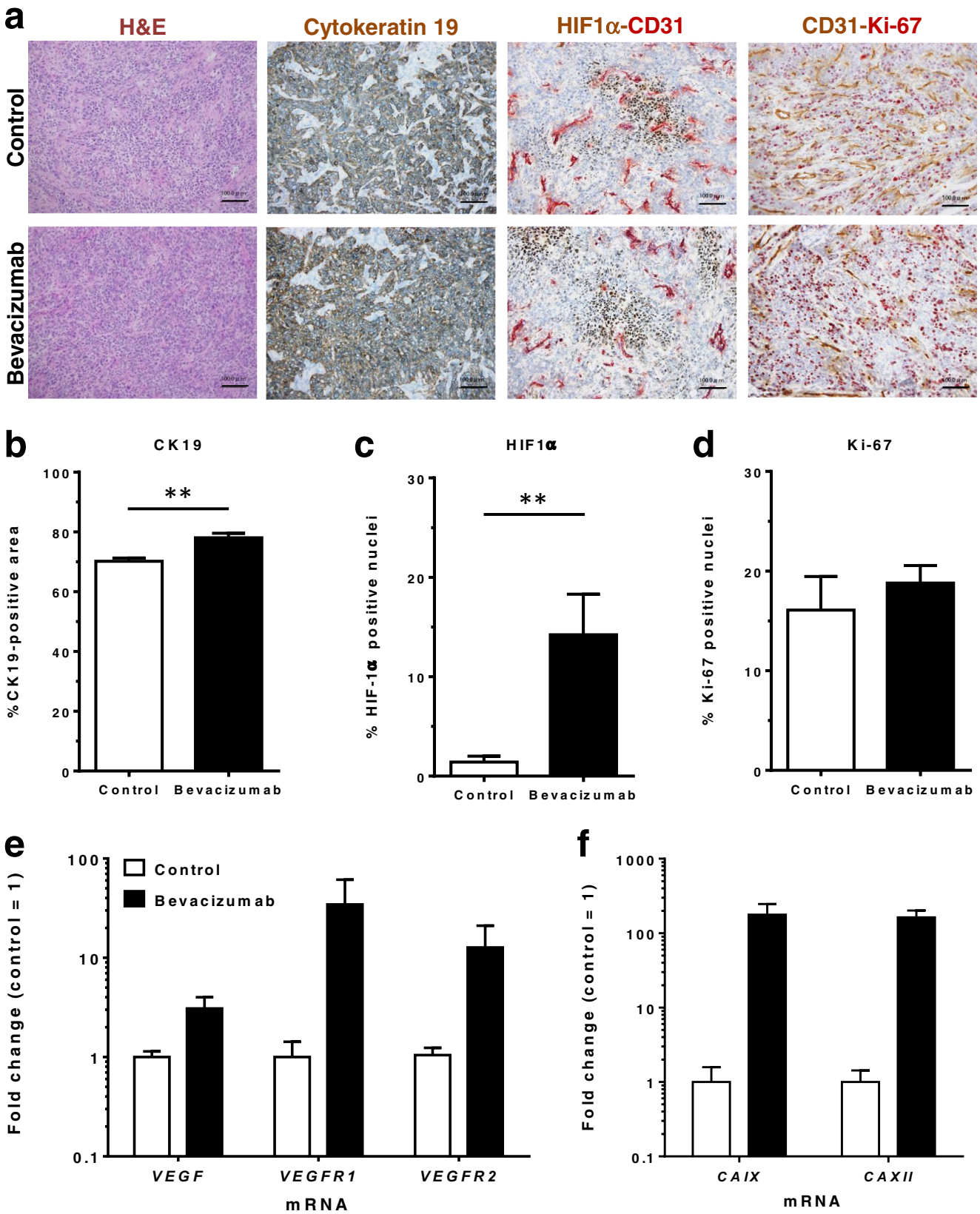
CCA is a rare liver cancer subtype [1] that is highly prevalent in Asia, especially in Northeastern Thailand [34]. The gold standard treatment for CCA patients is curative resection at an early stage [3]; however, most patients are not candidates due to a delayed diagnosis [35]. Systemic chemotherapy is commonly used even though its advantage is still controversial [3]. Although there have been several attempts to use molecular targeted therapy for the treatment of CCA, the outcomes achieved in clinical trials remain unsatisfactory [7]. This has been attributed to the limited number of pre-clinical studies. VEGF is one promising target. The overexpression of VEGF was detected in more than 50 % of CCA patients [8, 9]. The outcome of combined GEMOX and bevacizumab showed a higher response rate over that of GEMOX alone but did not improve the overall survival of patients [10]. The unsatisfactory outcome achieved by the combined treatment may be due to the development of cancer cell adaptation to limited blood supply and hypoxic environment [11, 12]. The mechanism by which CCA adapted to the bevacizumab treatment was partially clarified by the current study, and we demonstrated the advantage of combining acetazolamide with bevacizumab to overcome anti-angiogenic treatment resistance.

The high expressions of VEGF mRNA and secreted protein were detected in CCA cell lines, which were consistent with previous findings on CCA tissues from patients [8]. The higher expression of VEGF by CCA cell lines than by highly vascularized hepatoma cell lines [36] suggested the requirement of VEGF in the biology of CCA. However, the very low or absent expression of VEGFR was observed in CCA cell lines. This suggested secreted VEGF from CCA cell lines might play a role in non-CCA cells. The results obtained from a CCA xenograft mouse model revealed enhanced angiogenesis, which correlated well with the level of secreted VEGF, implied the VEGF function was the induction of angiogenesis. However, the mechanism underlying the induction of VEGF in CCA cells has not yet been elucidated. It can be partly explained by the DNA copy number alteration in CCA. The gain of chromosome 6p12 was previously identified in 38 % of CCA tissues [37].

The functional significance of secreted VEGF in CCA cell lines was further emphasized by using the anti-VEGF, bevacizumab. Bevacizumab effectively inhibited CCA growth with no serious effects on the general well-being of mice. Reductions in the tumor vasculature were demonstrated peri- and intra-tumorally. Concomitantly, the increased expressions of HIF1α and HIF1α-responsive genes implied the potential of subsequent treatment failure or aggression after the

Fig. 4 The bevacizumab treatment induced the expression of HIF1α and HIF1α-responsive genes. **a** Representative pictures of hematoxylin and eosin (H&E), CK19, HIF1α, CD31, and Ki-67 staining from control and bevacizumab-treated KKU-M213 groups were presented. The character colors represented the immunostaining colors of the target proteins. Bar = 100 μm. The percentages of CK19- (**b**), HIF1α- (**c**), and Ki-67- (**d**) positive areas or nuclei determined in control and bevacizumab-treated tumors were presented. Fold changes in the expression of *VEGF*, *VEGFR1*, and *VEGFR2* mRNA were presented in (**e**) while those of *CAIX* and *CAXII* were presented in (**f**). The expression of *GADPH* in each sample was determined and served as an internal control for normalization $^{**}p < 0.01$

Author's personal copy



Author's personal copy

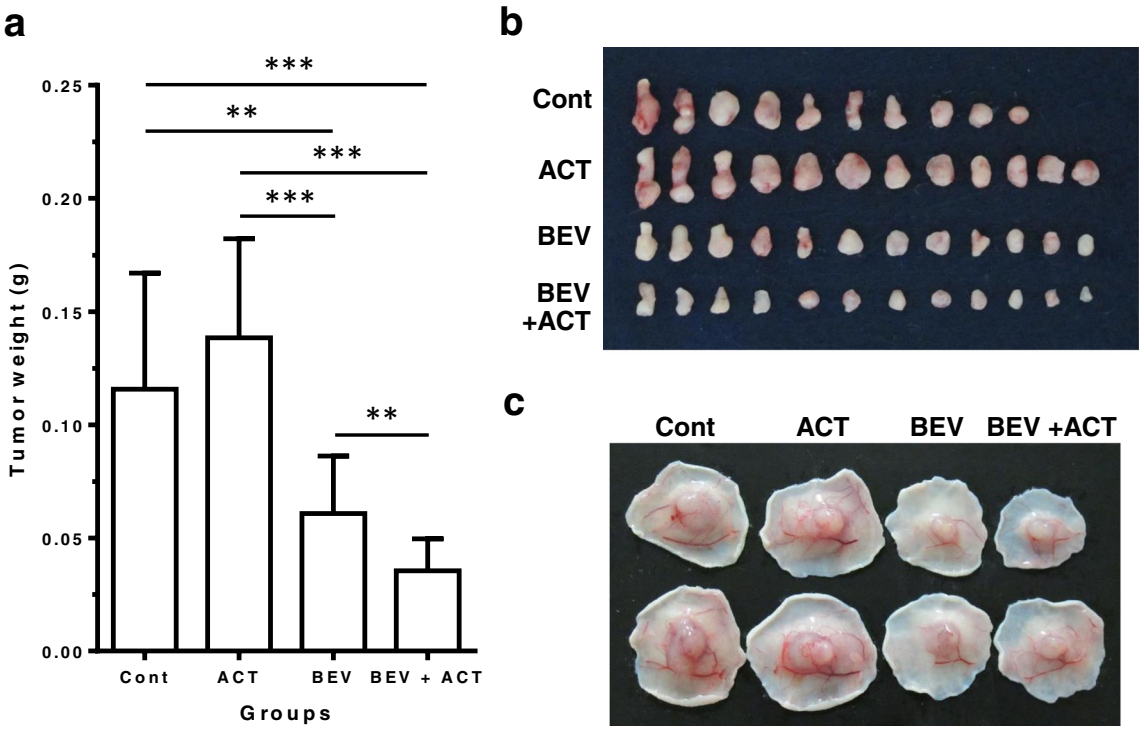


Fig. 5 The carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, potentiated the KKU-M213 CCA growth inhibitory effect of bevacizumab. **a** The weights of control (Cont), acetazolamide-treated (ACT), bevacizumab-treated (BEV), and combined BEV and ACT-treated tumors (BEV+ACT) were presented ($n = 10–12$ tumors/group). A photograph of all tumor masses **b** and representative peri-tumoral blood supply **c** were presented. **d** Representative pictures of hematoxylin and eosin (H&E), CK19, CD31, and Ki-67 staining from Cont, ACT, BEV, and combination treatment groups were presented. Bar = 100 μm. The percentages of CD31- (**e**), and Ki-67- (**f**) positive areas or nuclei were determined and demonstrated $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.0001$

withdrawal of bevacizumab [11–13]. The roles of HIF1α, CAIX, and CAXII in the induction of cancer cell proliferation were previously revealed [15, 17]. The upregulated expressions of hypoxia-inducible CAIX and CAXII were previously shown to rescue tumor cells from the acidic microenvironment and later promote tumor [15]. This may explain why no significant differences were observed in the Ki-67 staining of tumors from the bevacizumab-treated group, in which higher expression levels of CAIX were acquired, and from the control group. Moreover, tumor density was increased in the bevacizumab-treated group and it appeared to be disadvantage factor. Taken together, these results may explain the modest outcome of combined GEMOX and bevacizumab, which resulted in a high response rate, but did not improve the progression-free survival or overall survival of CCA patients [10].

Since solid tumors usually have a hypoxic area, an anti-angiogenic treatment will induce a greater dependence on hypoxic adaptation [14]. The upregulated expressions of CAIX and CAXII are common responses to the anti-angiogenic treatment, which provide an opportunity for combination treatment [15]. This finding prompted us to examine the effects of the combined treatment of bevacizumab and CA inhibitor, acetazolamide, on CCA. The combination of bevacizumab and acetazolamide exert stronger suppressive effects on tumor growth. Hence, the effects observed in the combination treatment were the combined effects of bevacizumab anti-angiogenesis and acetazolamide anti-proliferation. Nonetheless, the additional investigations are required prior to the implementation of combination therapy to investigate the effects of acetazolamide and reduced Ki-67 staining and tumor growth.

In conclusion, the function of secreted VEGF from CCA cells on tumor angiogenesis was demonstrated for the first time in this study. Our results supported the usefulness of anti-VEGF therapy in CCA; however, the adaptation of CCA cells to the bevacizumab treatment in vivo suggested the benefit of a combined CA inhibitor. This has proven the benefits of the induction of essentiality blockage for the treatment of CCA.

Author's personal copy

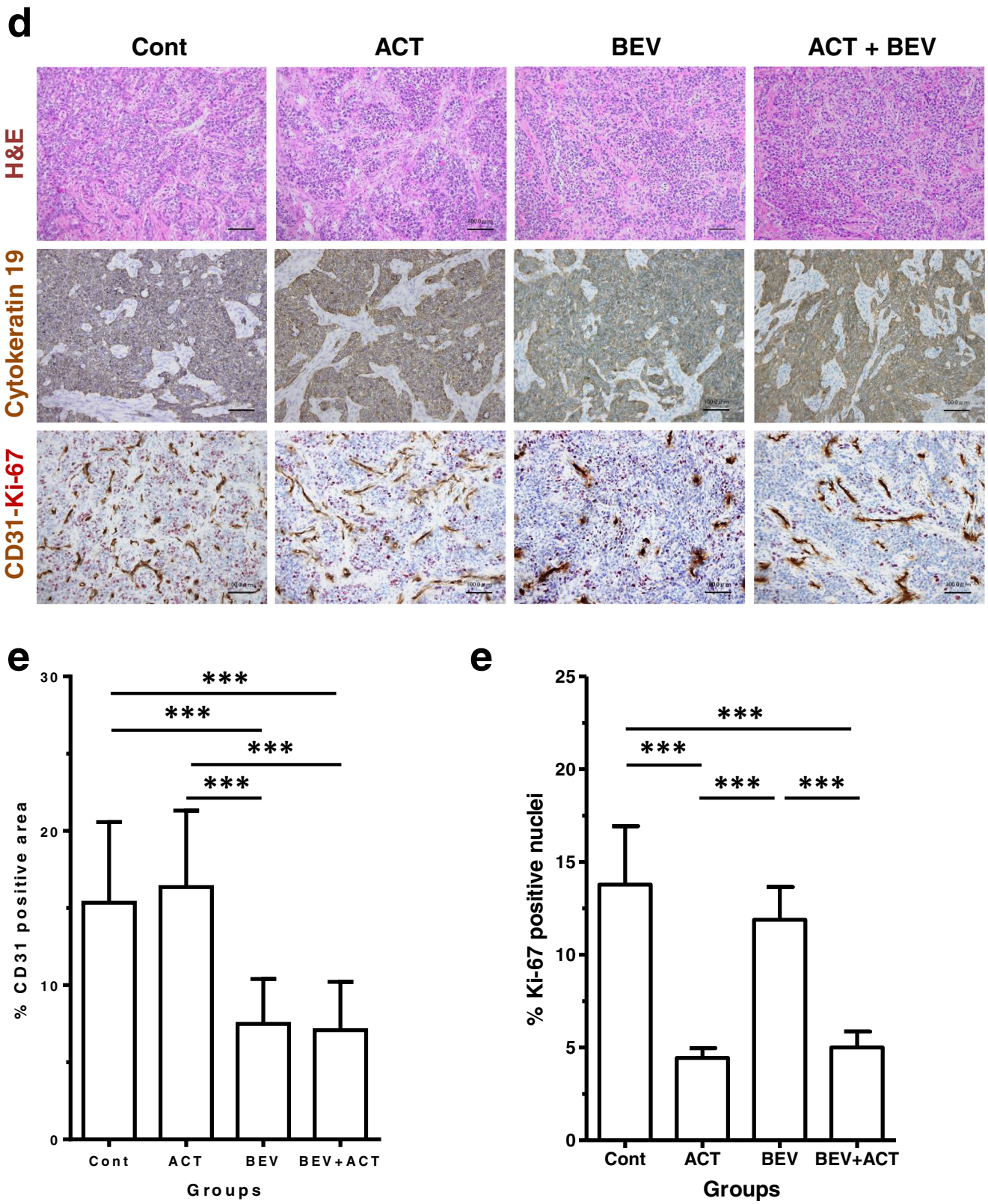


Fig. 5 (continued.)

Author's personal copy

Acknowledgments We thank Mrs. I. Suzu for her technical assistance and Ms. Y. Endo for her secretarial work. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research in Innovation Areas from the Ministry of Education, Culture, Sport Science and Technology (MEXT) of Japan (Grant No. 25460499), the Tokyo Biochemical Research Foundation, Japan (to SO and KV), the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham (RTA5780012), and the National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University (to KV, NRU572012).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest None

References

1. Endo I, Gonen M, Yopp AC, Dalal KM, Zhou Q, Klimstra D, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. Ann Surg. 2008;248(1):84–96. doi:10.1097/SLA.0b013e318176c4d3.
2. Wongkham S, Silsirivanit A. State of serum markers for detection of cholangiocarcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(Suppl):17–27.
3. Eckel F, Brunner T, Jelic S, Group EGW. Biliary cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol / ESMO. 2010;21 Suppl 5:v65–69. doi:10.1093/annonc/mdq167.
4. Nagakawa T, Kayahara M, Ikeda S, Futakawa S, Kakita A, Kawarada H, et al. Biliary tract cancer treatment: results from the biliary tract cancer statistics registry in Japan. J Hepato-Biliary-Pancreat Surg. 2002;9(5):569–75. doi:10.1007/s005340200076.
5. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. N Engl J Med. 2010;362(14):1273–81. doi:10.1056/NEJMoa0908721.
6. Andre T, Reyes-Vidal JM, Fartoux L, Ross P, Leslie M, Rosmorduc O, et al. Gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract carcinoma: a phase II study. Br J Cancer. 2008;99(6):862–7. doi:10.1038/sj.bjc.6604628.
7. Furuse J, Okusaka T. Targeted therapy for biliary tract cancer. Cancer. 2011;3(2):2243–54. doi:10.3390/cancers3022243.
8. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. Br J Cancer. 2008;98(2):418–25. doi:10.1038/sj.bjc.6604129.
9. Guedj N, Zhan Q, Perigny M, Rautou PE, Degos F, Belghiti J, et al. Comparative protein expression profiles of hilar and peripheral hepatic cholangiocarcinomas. J Hepatol. 2009;51(1):93–101. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.017.
10. Zhu AX, Meyerhardt JA, Blaszkowsky LS, Kambadakone AR, Muzikansky A, Zheng H, et al. Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in advanced biliary-tract cancers and correlation of changes in 18-fluorodeoxyglucose PET with clinical outcome: a phase 2 study. Lancet Oncol. 2010;11(1):48–54. doi:10.1016/S1470-2045(09)70333-X.
11. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Rev Cancer. 2008;8(8):592–603. doi:10.1038/nrc2442.
12. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. J Clin Invest. 2013;123(8):3190–200. doi:10.1172/JCI70212.
13. Favaro E, Lord S, Harris AL, Buffa FM. Gene expression and hypoxia in breast cancer. Genome Med. 2011;3(8):55. doi:10.1186/gm271.
14. McIntyre A, Harris AL (2015) Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality. EMBO molecular medicine. doi:10.15252/emmm.201404271
15. McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, Li JL, Ledaki I, Turley H, et al. Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. Clin Cancer Res. 2012;18(11):3100–11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1877.
16. Rapisarda A, Hollingshead M, Uranchimeg B, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, et al. Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. Mol Cancer Ther. 2009;8(7):1867–77. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0274.
17. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. Cancer Res. 2012;72(7):1773–83. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3831.
18. Kim YJ, Lee HJ, Kim TM, Eisinger-Mathason TS, Zhang AY, Schmidt B, et al. Overcoming evasive resistance from vascular endothelial growth factor a inhibition in sarcomas by genetic or pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factor 1α. Int J Cancer. 2013;132(1):29–41. doi:10.1002/ijc.27666.
19. Seubwai W, Kraiklang R, Wongkham C, Wongkham S. Hypoxia enhances aggressiveness of cholangiocarcinoma cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(Suppl):53–8.
20. Thongchot S, Yongvanit P, Loilome W, Seubwai W, Phunicom K, Tassaneeyakul W, et al. High expression of HIF-1α, BNIP3 and PI3KC3: hypoxia-induced autophagy predicts cholangiocarcinoma survival and metastasis. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(14):5873–8.
21. Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, Mori H, et al. Hypoxia inducible factor expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepato-Gastroenterology. 2011;58(110–111):1439–44. doi:10.5754/hge11156.
22. Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, et al. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. Transplantation. 2004;77(3):446–51. doi:10.1097/01.TP.0000110292.73873.25.
23. Sripa B, Leungwattanawanit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, et al. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). World J Gastroenterol. 2005;11(22):3392–7.
24. Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Hiyoshi M, Suzu S, Puapairoj A, Wongkham C, et al. Cepharanthine exerts antitumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF-kappaB. Cancer Sci. 2010;101(7):1590–5. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01572.x.
25. Gotoh K, Kariya R, Matsuda K, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, Okada S. A novel EGFP-expressing nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells to study tumor-host interactions. Biosci Trends. 2014;8(4):202–5.
26. Goto H, Kudo E, Kariya R, Taura M, Katano H, Okada S. Targeting VEGF and interleukin-6 for controlling malignant effusion of primary effusion lymphoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2015;141(3):465–74. doi:10.1007/s00432-014-1842-9.
27. Robinson GS, Ju M, Shih SC, Xu X, McMahon G, Caldwell RB, et al. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. FASEB J. 2001;15(7):1215–7.
28. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, et al. Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. Free Radic Biol Med. 2013;65:778–88. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.161.

Author's personal copy

29. Taura M, Kudo E, Kariya R, Goto H, Matsuda K, Hattori S, et al. COMMD1/Murr1 reinforces HIV-1 latent infection through IκB-α stabilization. J Virol. 2015;89(5):2643–58. doi:10.1128/JVI.03105-14.
30. Kariya R, Matsuda K, Gotoh K, Vaeteewoottacharn K, Hattori S, Okada S. Establishment of nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells and application for in vivo bio-imaging. In Vivo. 2014;28(5):779–84.
31. Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Matsuda K, Taura M, Wongkham C, Wongkham S, et al. Perturbation of proteasome function by bortezomib leading to ER stress-induced apoptotic cell death in cholangiocarcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139(9):1551–62. doi:10.1007/s00432-013-1473-6.
32. Mokhtari RB, Kumar S, Islam SS, Yazdanpanah M, Adeli K, Cutz E, et al. Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines. BMC Cancer. 2013;13:378. doi:10.1186/1471-2407-13-378.
33. Chatterjee S, Heukamp LC, Siobal M, Schottle J, Wieczorek C, Peifer M, et al. Tumor VEGF: VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. J Clin Invest. 2013;123(4):1732–40. doi:10.1172/JCI65385.
34. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. Curr Opin Gastroenterol. 2008;24(3):349–56. doi:10.1097/MOG.0b013e3282fbf9b3.
35. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, Rosenberg WM, Tait P, Taylor-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Wasan H, British Society of G. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. Gut. 2012;61(12):1657–69. doi:10.1136/gutjnl-2011-301748.
36. von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. Gut. 2001;48(1):87–96.
37. McKay SC, Unger K, Pericleous S, Stamp G, Thomas G, Hutchins RR, et al. Array comparative genomic hybridization identifies novel potential therapeutic targets in cholangiocarcinoma. HPB Off J Int Hepato Pancreato Biliary Assoc. 2011;13(5):309–19. doi:10.1111/j.1477-2574.2010.00286.x.

Histol Histopathol (2017) 32: 503-510

http://www.hh.um.es

Histology and Histopathology

From Cell Biology to Tissue Engineering

Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis

Unchalee Thonsri[1,5]*, Wunchana Seubwai[2,5]*, Sakda Waraasawapati[3], Kanlayanee Sawanyawisuth[1,5], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,5], Thidarat Boonmars[4,5] and Ubon Cha'on[1,5]

[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Forensic Medicine, [3]Department of Pathology, [4]Department of Parasitology and [5]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

*Equal contributors

Summary. Lactate dehydrogenase A (LDHA), a key metabolic enzyme, plays a crucial role in the final step of anaerobic glycolysis. Overexpression of LDHA is observed in many human malignancies in association with tumor progression. The purpose of this study was to investigate LDHA expression pattern during carcinogenesis, its clinico-pathological association, and evaluate the prognostic value of LDHA in CCA patients. LDHA expression was investigated using immunohistochemistry technique in both hamster- (n=60) and human-CCA tissues (n=82). Plasma LDH from healthy control (n=40) and CCA patients (n=29) were determined using an enzymatic based assay. The association of LDHA expression with clinicopathological findings and prognostic value were evaluated by statistical analysis. In the CCA hamster model, an increase of LDHA expression was associated with the progression of CCA-genesis. Higher LDHA overexpression was associated with shorter survival of CCA patients. Multivariate analysis indicated that LDHA expression including histological type were independent prognostic risk factor of patient's survival. However, there was no difference in plasma LDH level between CCA patients and healthy controls. LDHA expression is involved in cholangio-carcinogenesis. Overexpression of LDHA can be a marker of poor prognosis in CCA patients and it might be a potential target for CCA treatment.

Offprint requests to: Ubon Cha'on, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand. e-mail: ubocha@kku.ac.th

DOI: 10.14670/HH-819

Key words: Cholangiocarcinoma, Lactate dehydrogenase A, Carcinogenesis, Cancer metabolism, Poor prognosis

Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA), a cancer of bile duct epithelium, is a rare malignancy worldwide. However, CCA has its highest incidence and is a leading cause of morbidity and mortality in Southeast Asian countries, especially in Thailand (Sripa and Pairojkul, 2008). This cancer is still a major public health problem in Northeastern Thailand (Andrews et al., 2008). Epidemiological (Haswell-Elkins et al., 1994) and experimental animal studies (Thamavit et al., 1978) indicated that a liver fluke, *Opisthorchis viverrini* (Ov) infection is the major risk factor for CCA development in this area.

The difficulty of dealing with CCA is the availability of early diagnosis and effective treatment (Sirica, 2005). So far there is no specific tumor marker for early detection of CCA. Surgical resection is still the only curative treatment for CCA (Khan et al., 2012). However, the majority of CCA-patients are unresectable due to the late stage of detection (Blechacz and Gores, 2008). Moreover, this tumor is often resistant to conventional chemo- and radio-therapy resulting in poor prognosis (Rizvi and Gores, 2013). Therefore, identification of a specific tumor marker and development of effective treatment for CCA are still urgently required.

Metabolic alteration is one of the ten cancer

hallmarks as described by Hanahan and Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). Preferential anaerobic glycolysis, named Warburg effect, usually occurs in cancers (Warburg, 1956). This is not only for energy generation but also for production of intermediates in macromolecule biosynthesis such as protein, lipid and nucleotide synthesis to support rapid growth and proliferation of cancer cells (Gatenby and Gillies, 2004). Thereby, glucose transporters and key enzymes in the glycolytic pathway such as hexokinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase are found up-regulated in several cancers (Miao et al., 2013). These three key enzymes are intensively studied as potential biomarker and target molecules for cancer treatment. Since LDH plays an important role in carcinogenesis (Le et al., 2010), we attempted to explore its role in CCA.

LDH enzymes are encoded by two genes, *LDHA* and *LDHB*, which generate two types of subunits, M and H. Since active LDH enzymes are the tetramers of various combination of M and H, there are 5 LDH isoforms; LDH-1 (4H), LDH-2 (3H, 1M), LDH-3 (2H, 2M), LDH-4 (1H, 3M), and LDH-5 (4M) (Maekawa and Sugano, 1998). LDH5 is also called LDHA which preferentially converts pyruvate to lactate in the final step of glycolysis. Overexpression of LDHA has been reported in several cancers such as gastric-, colorectal-, lung-, and pancreatic cancers (Miao et al., 2013; Rong et al., 2013). Association of LDHA expression level with tumor stage, tumor size, histological grade and survival has been reported in renal and gastric cancer patients (Girgis et al., 2014; Kim et al., 2014).

In the present study, the possible involvement of LDHA in carcinogenesis was investigated in the Ov-induced CCA hamster model. In addition, the clinical implication of LDHA expression as a prognostic marker was investigated in CCA patients.

Materials and methods

Tissue samples

Animal tissues

Formalin-fixed paraffin embedded samples were obtained from Ov-induced CCA-hamster model. Syrian golden hamsters (n=60) were divided into 4 groups based on the treatments as follows; untreated normal control group, Ov-infected group, N-nitrosodimethylamine (NDMA)-treated group and Ov-NDMA treated group in which 5 animals each were sacrificed at 1, 3, and 6 months (Boonmars et al., 2009). The protocol of the study was approved by the Ethics committee for Animal Research of Khon Kaen University (AEMDKKU1/2558).

Human specimen

Formalin-fixed paraffin embedded samples (n=82) and tissue-unmatched-plasma (n=69) were obtained from the specimen bank of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand. Written informed consent was obtained from each subject and the protocol has been reviewed and approved by the Ethics Committee for Human Research of Khon Kaen University (HE571283 and HE531320) based on the Declaration of Helsinki and ICH-Good Clinical Practice Guidelines. All tissues were histologically proven to be CCA. Clinico-pathological data of CCA patients were retrieved from clinical and pathological records, including age, gender, histological types of CCA, tumor size, tumor staging, and survival.

LDHA immunohistochemistry

The immunohistochemistry was performed according to the standard protocol (Taylor, 2006). The tissue slides were incubated with 1:1600 diluted sheep anti-LDHA polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, USA; cat. no. ab9002) at room temperature overnight. Then, tissue sections were incubated with 1:100 diluted HRP-conjugated rabbit polyclonal antibody to sheep IgG (Abcam; cat. no. ab6747) for 1 hour at room temperature. The peroxidase activity was developed using diaminobenzidine tetrahydroxychloride solution (DAB; Dako, Glostrup, Denmark) as the substrate and counterstained with hematoxylin.

LDHA expression levels were evaluated using an immunostaining score. The frequency score of LDHA expression was graded according to the percentage of positively stained tumor cells: (<10%=0, 10-25%=1; 26-50%=2; and >50%=3). The intensity of LDHA expression was scored as: negative=0, weak=1, moderate=2 and strong=3. The immunohistochemistry indices of LDHA expression (frequency X intensity) were categorized using the cut-off point=6, into low (<6) and high (≥6) expression.

Plasma LDH levels in CCA patients

Blood samples were collected in a tube containing anticoagulant, 3.2% sodium citrate. After centrifugation at 1000x g, 4°C, for 20 minutes, plasma samples were collected and kept at -20°C before analysis. Plasma LDHA level was determined using the enzymatic assay auto-machine (SYNCHRON LX20PRO, BECKMAN COULTER, USA) according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS Statistic 17.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL). Chi-square (χ^2) test was used to investigate association between LDHA expression and clinico-pathological findings. Survival analysis was conducted using Kaplan-Meier curves (Log-rank test). Multivariate analysis was performed by Cox regression to estimate the prognosis significant

independent factors. P value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

LDHA expression was up-regulated during cholangiocarcinogenesis in Ov-induced CCA-hamster model

The relationship between LDHA expression and cholangiocarcinogenesis was investigated in the Ov-associated CCA hamster tissues. LDHA was not expressed in normal bile duct of untreated control group (Fig. 1A) and NDMA group (Fig. 1C) at any time point examined. Marginal to low LDHA expression was observed in the bile duct hyperplasia of the untreated group at 3 and 6 monthsand in the NDMA group at 1 and 3 months. The strikingly high expression of LDHA was seen in Ov infected group (Fig. 1B), mostly in the bile duct hyperplasia. As was expected, the highest expression of LDHA was observed in CCA tissues of the Ov plus NDMA-treated group (Fig. 1D). The results in Fig. 1 showed that LDHA expression was increased with carcinogenesis steps, from normal to hyperplasia towards cancer. The percentage of positive LDHA expression and histological classification in these 4 groups of treatment are summarized in Table 1. Almost all hyperplasia of each group and 100% of cancer area of the Ov plus NDMA group showed LDHA expression. When the data at 1, 3, and 6 months of the cancer group, Ov plus NDMA-treated group, were analyzed based on histological classification, the level of LDHA expression was increased significantly from normal bile duct to

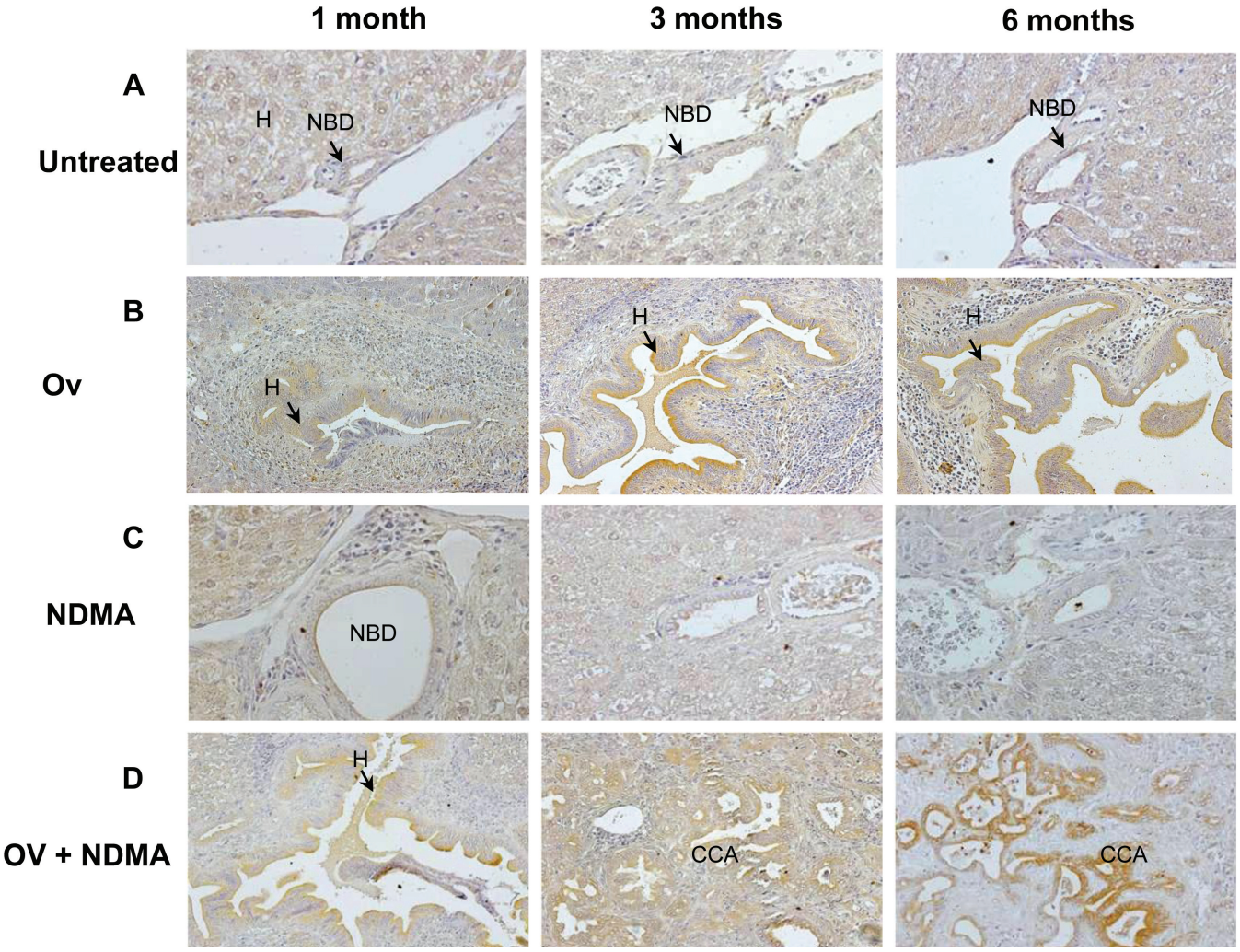


Fig. 1. Immunohistochemistry staining for LDHA expression in hamster-CCA tissues (**A-D**). LDHA expression is related to carcinogenesis of CCA. **A.** Untreated group, no staining of LDHA expression in normal bile duct (NBD). **B.** Ov infected group, high expression of LDHA in bile duct hyperplasia (HD). **C.** NDMA treated group, staining of LDHA expression in normal bile duct. **D.** Ov + NDMA group, highest LDHA expression in tumor area at 3 and 6 months. x 200.

hyperplasia towards cancer (Fig. 2).

LDHA expression was associated with a shorter overall survival of CCA patients

The association of immunohistochemical expression level of LDHA and clinico-pathological findings were examined using 82 CCA tissues with clinical data of the patients. LDHA was expressed in both cytoplasm and nuclei of the cancer cells. In most cases, cytoplasmic reactivity was stronger than the nuclear staining. Higher LDHA expression was observed in CCA area compared to normal bile duct in the adjacent tissues of the same case. The percentage of LDHA expression was 90% (75/82) in CCA areas and 10.5% (8/76) in adjacent tissues containing normal bile duct. The representative immunohistochemical staining of LDHA in the normal bile duct, bile duct hyperplasia, and CCA of humans are illustrated in Fig. 3.

According to the immunohistochemistry index, LDHA expression levels were categorized into two groups, low (<6) and high (≥6) expression. The results of univariate analysis of LDHA expression and clinico-pathological findings of CCA patients were shown in Table 2. The patients with a survival time of less than 30 days and those with incomplete information of pathology were excluded from the analysis. No significant differences among the variables tested with LDHA expression were found.

Survival analysis performed according to the Kaplan-Meier analysis method showed a significant correlation between LDHA expression levels and survival (P=0.019) (Fig. 4). Univariate analysis indicated

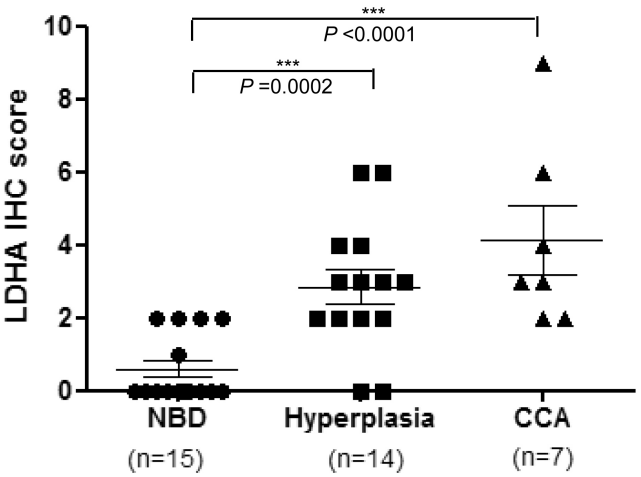


Fig. 2. LDHA expression based on histological classification; normal bile duct, hyperplasia, and CCA in Ov-associated CCA hamster tissues.

Table 2. LDHA expression and clinico-pathological findings of CCA patients.

Clinical characteristics		LDHA expression		
	No. of patients	Low n (%)	High n (%)	P-value
Age (y) (n=82)				0.280
<56	40	17 (42.5)	23 (57.5)	
≥56	42	23 (54.8)	19 (45.2)	
Gender (n=82)				0.482
Male	55	25 (45.5)	30 (54.5)	
Female	27	15 (55.6)	12 (44.4)	
Histological type (n=82)				1.000
Non papillary	55	27 (49.0)	28 (50.9)	
Papillary	27	13 (48.1)	14 (51.9)	
T stage(n=82)				0.104
T1	6	4(66.6)	2 (33.4)	
T2	10	7 (70.0)	3 (30.0)	
T3	33	18 (54.5)	15 (45.5)	
T4	33	11 (33.3)	22 (66.7)	
N stage(n=72)				0.098
N0	38	23 (68.4)	15 (46)	
N1	34	13 (39)	21 (61)	
M stage (n=75)				0.516
M0	65	34 (52.3)	31 (47.7)	
M1	10	4 (40.0)	6 (60.0)	
Tumor stage (n=82)				0.112
I+II	11	8 (72.7)	3 (27.3)	
III+IV	71	32 (45.1)	39(54.9)	
Tumor size (cm) (n=82)				0.278
<7	38	16 (42.1)	22 (57.9)	
≥7	44	24 (54.5)	20 (45.5)	

The association between LDHA expression and clinico-pathological findings were analyzed using Chi-square (χ^2) test. * P<0.05.

Table 1. LDHA expression and histological classification in hamster liver tissues.

Group of experiments	1M			3M			6M		
	NBD	Hyper	CCA	NBD	Hyper	CCA	NBD	Hyper	CCA
Untreated	0/5 (0)	-	-	0/5 (0)	1/1 (100)	-	0/5 (0)	2/2 (100)	-
Ov	1/5 (20)	4/4 (100)	-	1/5 (20)	5/5 (100)	-	2/5 (40)	5/5 (100)	-
NDMA	0/5 (0)	2/3 (67)	-	0/5 (0)	1/4 (25)	-	0/5 (0)	0/3 (0)	-
Ov+ NDMA	2/5 (40)	4/5 (80)	-	2/5 (40)	5/5 (100)	3/3 (100)	0/5 (0)	3/5 (60)	4/4 (100)

All data are expressed as n/N (%), n=number of positive cases of LDHA expression, N=total cases with the presence of histological classification. NBD: Normal bile duct, Hyper: Hyperplasia, CCA: Cholangiocarcinoma.

that histological type, M stage,and LDHA expression levels were dependent factors of survival (Table 3). Multivariate analysis indicated that histological type, and LDHA expression were independent risk factors to poor prognosis of CCA (Table 3).

Plasma LDH levels in healthy control and CCA patients

Plasma LDH levels from healthy controls (n=40) and CCA patients (n=29) were measured using an automated enzymatic assay. There was no statistically significant difference in plasma LDH levels between healthy controls (136.9±56.0 U/L) and CCA patients (142.4±73.1 U/L) as shown in Fig. 5.

Discussion

In the present study, we first investigated whether LDHA expression is associated with CCA-genesis using an Ov-induced CCA hamster model. The results clearly showed that immunohistochemical LDHA expression

Table 3. Univariate and multivariate analysis of LDHA expression and clinico-pathological findings in CCA patients (n=82).

Characteristics	Groups	HR (95% CI)	P -value
Univariate analysis			
Age (y)	≥56 vs.<56	1.05 (0.68-1.63)	0.831
Gender	Male vs. Female	0.93 (0.58-1.48)	0.743
Histological type	Non papillary vs. Papillary	2.23 (1.34-3.73)	0.002*
T stage	T_4 vs. $T_1/T_2/T_3$	1.06 (0.85-1.31)	0.635
N stage (n=72)	N_1 vs. N_0	1.05 (0.77-2.03)	0.362
M stage (n=75)	M_1 vs. M_0	2.57 (1.29-5.12)	0.007*
Tumor stage	III+IV vs. I+II	1.29 (0.68-2.46)	0.436
Tumor size (cm)	≥7 vs.<7	1.24 (0.80-1.94)	0.341
LDHA	High ≥6 vs. Low <6	1.69 (1.08-2.62)	0.020*
Multivariate analysis			
Histological type	Non papillary vs. Papillary	2.20 (1.17-4.14)	0.014*
LDHA	High ≥6 vs. Low <6	2.05 (1.05-3.99)	0.036*

Univariate and Multivariate analysis was performed by Cox regression. *: P value <0.05. All parameters are included in multivariate analysis, but only parameters that reach statistical significant are illustrated.

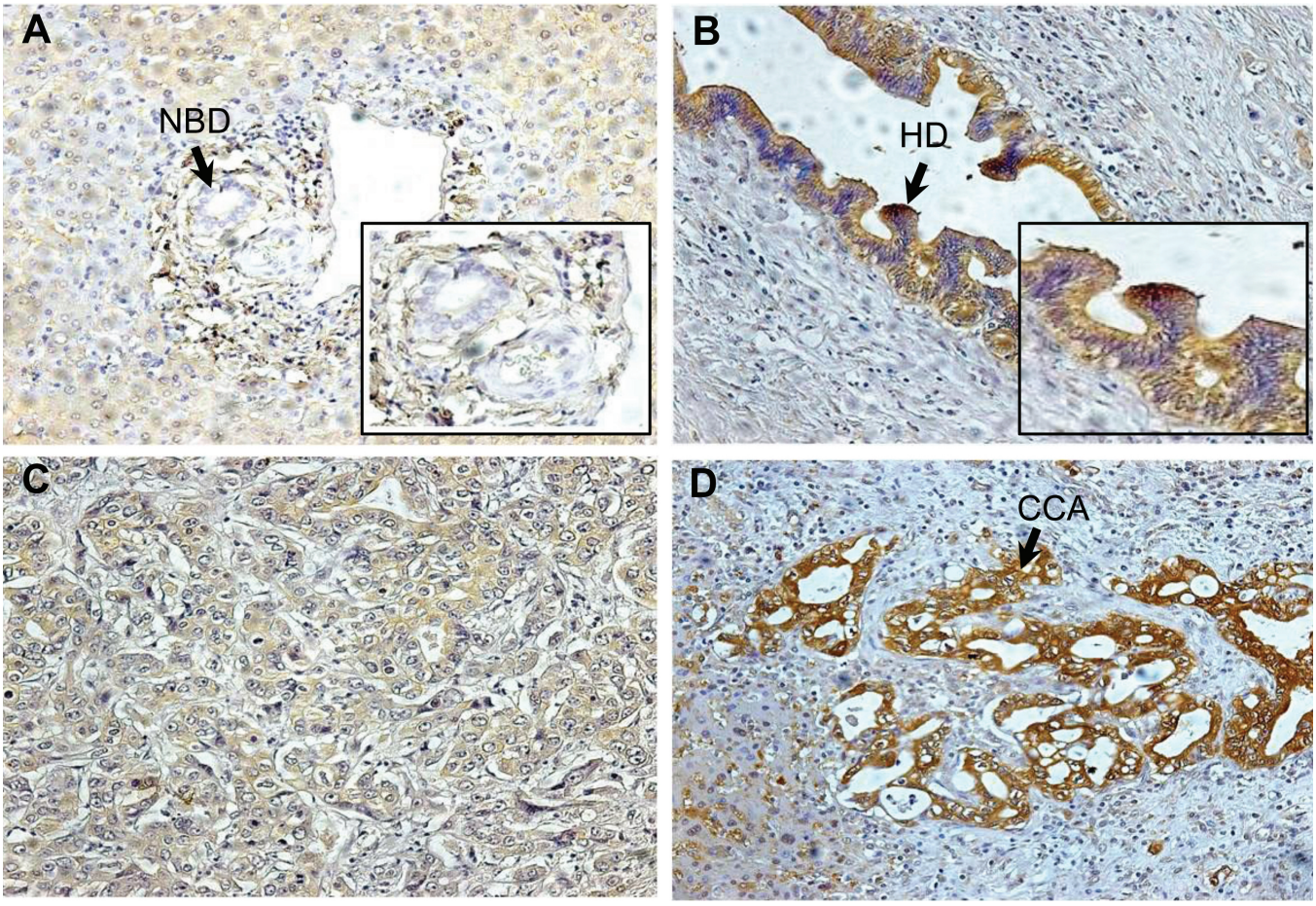


Fig. 3. Immunohistochemistry staining of LDHA expression in human-CCA tissues (n=82). **A.** Low LDHA expression in normal bile duct. **B.** High LDHA expression in bile duct hyperplasia. **C.** Low LDHA expression in tumor area. **D.** High LDHA expression in tumor area. x 200.

became detectable as early as 1 month of experimental CCA induction and its level was associated with CCA development. Then, we examined LDHA expression in human CCA tissues and found that the majority (90%) of human CCA tissues exhibited aberrant expression of LDHA. The higher level of LDHA expression was significantly associated with shorter survival of the patients.

In the hamster model experiments, the normal bile duct epithelium did not express LDHA. LDHA expression was initially observed in the bile duct epithelial cells of hyperplasia lesion, which was especially prominent in the Ov infected group. CCA development after administration of hepatocarcinogen, NDMA, to Ov-infected hamsters was observed at 3 and 6 months post-treatment. The highest expression of LDHA was spotted in these CCA tissues. These findings indicate that LDHA expression increased along with the CCA-genesis. The involvement of LDHA in tumor initiation and progression was demonstrated previously in lymphoma and pancreatic cancer (Le et al., 2010; Rong et al., 2013), suggesting that LDHA expression in carcinogenesis is a common event of various cancers.

It should be noted that Ov infection caused injury/inflammation, which induced cell proliferation of the bile duct epithelium. Ov adult worms produce both physical and chemical stimuli to induce the host's immune/inflammatory response (Sripa et al., 2012). Growth factors and cytokines produced by immune/inflammatory cells activate LDHA gene transcription (Matrisian et al., 1985) which might result in LDHA expression. In the present study, increased LDHA expression was observed in bile duct hyperplasia and CCA areas and the immunoreactivity signal of LDHA expression was seen in both cytoplasmic and nuclear compartments, supporting that of previous studies in prostate and gastric cancers (Kim et al., 2014; Koukourakis et al., 2014). Overexpression of LDHA was reported in other cancers such as colon cancer (Koukourakis et al., 2005), pancreatic cancer (Rong et al., 2013) and even cholangiocarcinoma of Ov-non-endemic area (Yu et al., 2014). Thus, LDHA overexpression is a common feature of many tumors and may be important for cancer development.

In the present study, a high level of LDHA expression was associated with shorter survival of CCA-patients. The association of LDHA overexpression with shorter survival was reported in prostate (Giatromanolaki et al., 2006), lung (Koukourakis et al., 2014), colon (Koukourakis et al., 2003), and stomach (Zhao et al., 2015) cancers. This may suggest that aggressive cancer requires a high level of LDHA activity. The functional role of LDHA in promoting cell growth was reported in CCA cell lines. Inhibition of LDHA gene expression using shRNA induced apoptosis and suppressed tumor growth (Yu et al., 2014). Furthermore, LDHA inhibitors such as FX11, oxamate, galloflavin could reduce tumor cell proliferation *in vitro* (Rong et al., 2013; Zhao et al., 2015; Han et al., 2015) and suppress tumor volume *in vivo* (Koukourakis et al., 2005).

To determine whether LDHA expression can be used for diagnosis and prognosis for CCA, plasma LDH levels of CCA-patients and healthy controls were investigated. The results show that the plasma LDH level of CCA patients was not significantly different from that of healthy controls. Our result agreed with that of the previous study in hepatobiliary cancer (Wulaningsih et al., 2015). In contrast, elevated serum LDH level was observed in patients with breast cancer (Brown et al., 2012) and ovarian cancer (Koukourakis et al., 2009). Moreover, serum LDH has been reported to be a prognostic and predictive value in patients with

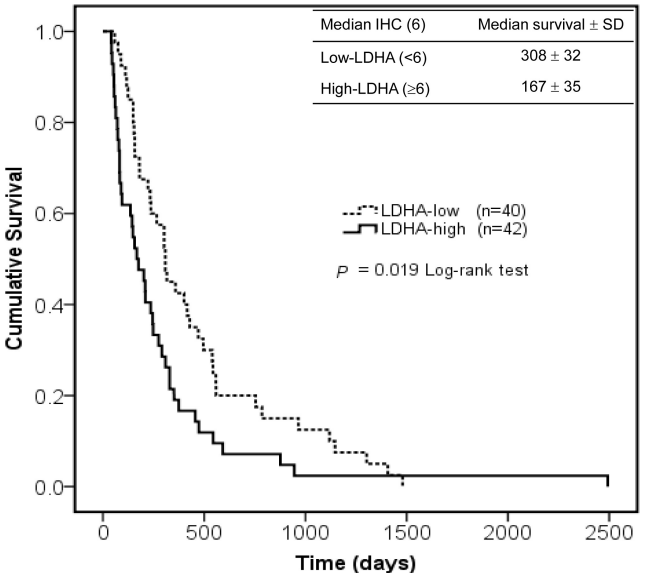


Fig. 4. Relationship between LDHA expression and overall survival. Dashed line: low LDHA expression; simple line; high LDHA expression.

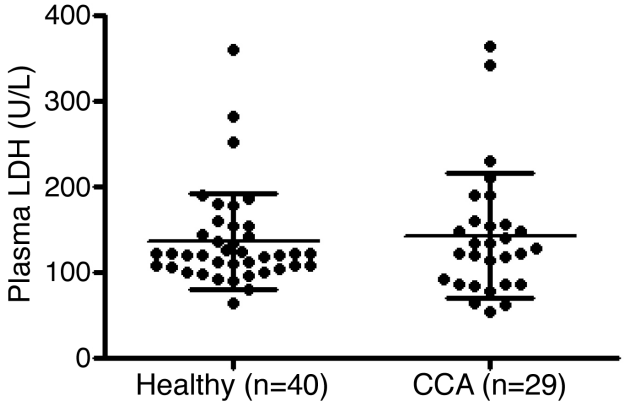


Fig. 5. Plasma LDH levels: No significant differences in LDH levels between healthy controls and CCA patients (P=0.72).

renal cell carcinoma (Armstrong et al., 2012), melanoma (Weide et al., 2013), and lymphoma (Endrizzi et al., 1982). More intensive study with a greater number of CCA patients is still a challenging task to determine the diagnostic value of plasma LDH levels.

Conclusion

Our findings indicated that LDHA is aberrantly expressed in bile duct epithelia with hyperplasia and CCA cells. LDHA expression was associated with CCA-genesis. Patients with CCA of high LDHA expression had a shorter survival than those with low expression, which can probably be used as a prognostic marker for poor patient outcome. As LDHA is highly expressed in CCA but not normal bile duct cells, reduction of LDHA expression and/or suppression of its activity in combination with currently used drugs might be an alternative choice of treatment for CCA-patients with high LDHA expression.

Acknowledgements. This work was supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund/KKU (RTA5780012), Thailand Research Fund (TRG5780188), Khon Kaen University (KKU580604), Faculty of Medicine (IN58208), and LFCRC Scholarships to UT. Thanks to Professor Sopit Wongkham for constructive comments on manuscript preparation. We would like to thank Professor Yukifumi Nawa for editing the MS via the Publication Clinic KKU, Thailand.

References

Andrews R.H., Sithithaworn P. and Petney T.N. (2008). Opisthorchis viverrini: An underestimated parasite in world health. Trends Parasitol. 24, 497-501.

Armstrong A.J., George D.J. and Halabi S. (2012). Serum lactate dehydrogenase predicts for overall survival benefit in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with inhibition of mammalian target of rapamycin. J. Clin. Oncol. 30, 3402-3407.

Blechacz B. and Gores G.J. (2008). Cholangiocarcinoma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. Hepatology 48, 308-321.

Boonmars T., Boonjaraspinyo S. and Kaewsamut B. (2009). Animal models for opisthorchis viverrini infection. Parasitol. Res. 104, 701-703.

Brown J.E., Cook R.J., Lipton A. and Coleman R.E. (2012). Serum lactate dehydrogenase is prognostic for survival in patients with bone metastases from breast cancer: A retrospective analysis in bisphosphonate-treated patients. Clin. Cancer Res. 18, 6348-6355.

Endrizzi L., Fiorentino M.V., Salvagno L., Segati R., Pappagallo G.L. and Fosser V. (1982). Serum lactate dehydrogenase (LDH) as a prognostic index for non-hodgkin's lymphoma. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 945-949.

Gatenby R.A. and Gillies R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat. Rev. Cancer 4, 891-899.

Giatromanolaki A., Sivridis E., Gatter K.C., Turley H., Harris A.L. and Koukourakis M.I. (2006). Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2(KDR) pathway and prognosis. Gynecol. Oncol. 103, 912-918.

Girgis H., Masui O., White N.M., Scorilas A., Rotondo F., Seivwright A., Gabril M., Filter E.R., Girgis A.H., Bjarnason G.A., Jewett M.A., Evans A., Al-Haddad S., Siu K.M. and Yousef G.M. (2014). Lactate dehydrogenase a is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. Mol. Cancer 13, 101.

Han X., Sheng X., Jones H.M., Jackson A.L., Kilgore J., Stine J.E., Schointuch M.N., Zhou C. and Bae-Jump V.L. (2015). Evaluation of the anti-tumor effects of lactate dehydrogenase inhibitor galloflavin in endometrial cancer cells. J. Hematol. Oncol. 8, 2.

Hanahan D. and Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 144, 646-674.

Haswell-Elkins M.R., Mairiang E., Mairiang P., Chaiyakum J., Chamadol N., Loapaiboon V., Sithithaworn P. and Elkins D.B. (1994). Cross-sectional study of opisthorchis viverrini infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast thailand. Int. J. Cancer 59, 505-509.

Khan S.A., Davidson B.R., Goldin R.D., Heaton N., Karani J., Pereira S.P., Rosenberg W.M., Tait P., Taylor-Robinson S.D., Thillainayagam A.V., Thomas H.C. and Wasan H. (2012). Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: An update. Gut 61, 1657-1669.

Kim H.S., Lee H.E., Yang H.K. and Kim W.H. (2014). High lactate dehydrogenase 5 expression correlates with high tumoral and stromal vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. Pathobiology 81, 78-85.

Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Bougioukas G., Didilis V., Gatter K.C. and Harris A.L. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. Br. J .Cancer 89, 877-885.

Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Simopoulos C., Polychronidis A. and Sivridis E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. Clin. Exp. Metast. 22, 25-30.

Koukourakis M.I., Kontomanolis E., Giatromanolaki A., Sivridis E. and Liberis V. (2009). Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. Gynecol. Obstet. Invest. 67, 162-168.

Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Panteliadou M., Pouliliou S.E., Chondrou P.S., Mavropoulou S. and Sivridis E. (2014). Lactate dehydrogenase 5 isoenzyme overexpression defines resistance of prostate cancer to radiotherapy. Br. J. Cancer 110, 2217-2223.

Le A., Cooper C.R., Gouw A.M., Dinavahi R., Maitra A., Deck L.M., Royer R.E., Vander Jagt D.L., Semenza G.L. and Dang C.V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase a induces oxidative stress and inhibits tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 2037-2042.

Maekawa M. and Sugano K. (1998). Quantification of relative expression of genes with homologous sequences using fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis--application to lactate dehydrogenase and cyclooxygenase isozymes. Clin. Chem. Lab. Med. 36, 577-582.

Matrisian L.M., Rautmann G., Magun B.E. and Breathnach R. (1985). Epidermal growth factor or serum stimulation of rat fibroblasts induces an elevation in mrna levels for lactate dehydrogenase and other glycolytic enzymes. Nucleic Acids Res. 13, 711-726.

Miao P., Sheng S., Sun X., Liu J. and Huang G. (2013). Lactate dehydrogenase a in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. IUBMB life 65, 904-910.

Rizvi S. and Gores G.J. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. Gastroenterology 145, 1215-1229.

Rong Y., Wu W., Ni X., Kuang T., Jin D., Wang D. and Lou W. (2013). Lactate dehydrogenase a is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. Tumour Biol. 34, 1523-1530.

Sirica A.E. (2005). Cholangiocarcinoma: Molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. Hepatology 41, 5-15.

Sripa B. and Pairojkul C. (2008). Cholangiocarcinoma: Lessons from thailand. Curr. Opin. Gastroenterol. 24, 349-356.

Sripa B., Thinkhamrop B., Mairiang E., Laha T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Periago M.V., Bhudhisawasdi V., Yonglitthipagon P., Mulvenna J., Brindley P.J., Loukas A. and Bethony J.M. (2012). Elevated plasma il-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by opisthorchis viverrini. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1654.

Taylor C.R. (2006). Quantifiable internal reference standards for immunohistochemistry: The measurement of quantity by weight. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 14, 253-259.

Thamavit W., Bhamarapravati N., Sahaphong S., Vajrasthira S. and Angsubhakorn S. (1978). Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in opisthorchis viverrini-infected syrian golden hamsters. Cancer Res. 38, 4634-4639.

Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. Science 123, 309-314.

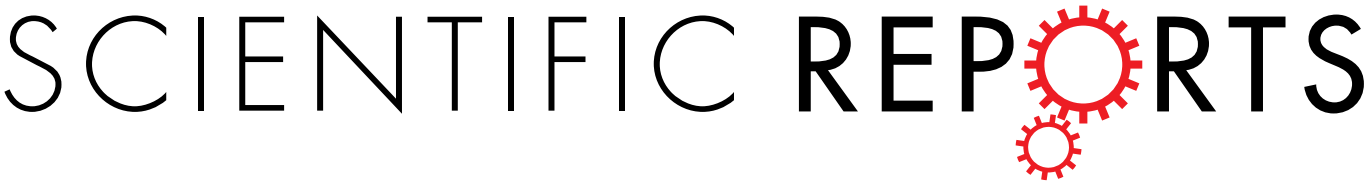
Weide B., Richter S., Buttner P., Leiter U., Forschner A., Bauer J., Held L., Eigentler T.K., Meier F. and Garbe C. (2013). Serum s100b, lactate dehydrogenase and brain metastasis are prognostic factors in patients with distant melanoma metastasis and systemic therapy. PLoS One 8, e81624.

Wulaningsih W., Holmberg L., Garmo H., Malmstrom H., Lambe M., Hammar N., Walldius G., Jungner I., Ng T. and Van Hemelrijck M. (2015). Serum lactate dehydrogenase and survival following cancer diagnosis. Br. J. Cancer 113, 1389-1396.

Yu Y., Liao M., Liu R., Chen J., Feng H. and Fu Z. (2014). Overexpression of lactate dehydrogenase-a in human intrahepatic cholangiocarcinoma: Its implication for treatment. World J. Surg. Oncol. 12, 78.

Zhao Z., Han F., Yang S., Wu J. and Zhan W. (2015). Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: Involvement of the akt-mtor signaling pathway. Cancer Lett. 358, 17-26.

Accepted September 6, 2016



OPEN

High glucose levels boost the aggressiveness of highly metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation

Received: 23 September 2016
Accepted: 30 January 2017
Published: 06 March 2017

Chatchai Phoomak[1,2], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2], Atit Silsirivanit[1,2], Charupong Saengboonmee[1,2], Wunchana Seubwai[2,3], Kanlayanee Sawanyawisuth[1,2], Chaisiri Wongkham[1,2] & Sopit Wongkham[1,2]

Increased glucose utilization is a feature of cancer cells to support cell survival, proliferation, and metastasis. An association between diabetes mellitus and cancer progression was previously demonstrated in cancers including cholangiocarcinoma (CCA). This study was aimed to determine the effects of high glucose on protein O-GlcNAcylation and metastatic potentials of CCA cells. Two pairs each of the parental low metastatic and highly metastatic CCA sublines were cultured in normal (5.6 mM) or high (25 mM) glucose media. The migration and invasion abilities were determined and underlying mechanisms were explored. Results revealed that high glucose promoted migration and invasion of CCA cells that were more pronounced in the highly metastatic sublines. Concomitantly, high glucose increased global O-GlcNAcylated proteins, the expressions of vimentin, hexokinase, glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) and O-GlcNAc transferase of CCA cells. The glucose level that promoted migration/invasion was shown to be potentiated by the induction of GFAT, O-GlcNAcylation and an increase of O-GlcNAcylated vimentin and vimentin expression. Treatment with a GFAT inhibitor reduced global O-GlcNAcylated proteins, vimentin expression, and alleviated cell migration. Altogether, these results suggested the role of high glucose enhanced CCA metastasis via modulation of O-GlcNAcylation, through the expressions of GFAT and vimentin.

Cancer cells require high glucose uptake for energy and metabolic intermediate production to support cell survival, growth and metastasis. As a consequence, a high glucose condition has been shown to promote progression in many cancer cells[1], e.g., colon, breast, prostate, and bladder[2–4]. Many preclinical studies have indicated positive correlations between migration/invasion abilities of cancer cells and glucose levels as demonstrated in colon[5] and lung cancer cells[6]. These observations may reflect the shorter survival of cancer patients with diabetes mellitus than those without diabetes[7,8].

Cholangiocarcinoma (CCA) is a rare tumor worldwide but highly prevalent in Northeast Thailand. CCA is slow growing but highly metastatic, therefore, most of the patients present in an advanced stage with poor prognosis[9,10]. The positive linkage between diabetes mellitus and CCA in Northeast Thailand was suggested by mortality surveys[11]. Recently, the effects of high glucose in promoting cell proliferation, adhesion, migration, and invasion were demonstrated in CCA cell lines. The mechanism is partly explained by the increases of STAT3 phosphorylation and nuclear translocation, the up-regulations of cyclin D1, vimentin, and matrix metalloproteinase 2 (MMP2)[12].

O-GlcNAcylation is a post-translational modification of protein by adding a single N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine or threonine by O-GlcNAc transferase (OGT). This process can be reversed by O-GlcNAcase (OGA)[13]. Normally, the majority of intracellular glucose is shunted to the glycolysis pathway and only 2–5% glucose enters the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) to produce uridine diphospho-N-acetylglucosamine

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [2]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [3]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.V. (email: kulthidava@kku.ac.th) or S.W. (email: sopit@kku.ac.th)

(UDP-GlcNAc), a substrate for glycosylation, e.g., O-GlcNAcylation. The rate of HBP can be regulated by the concentrations of the substrates, such as glucose and GlcNAc, or controlled by an expression of the rate limiting enzyme; glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransfrase (GFAT)[14,15]. Increasing glucose uptake may promote glucose flux through HBP and subsequently increase O-GlcNAcylation. The association between an elevation of global O-GlcNAcylated proteins and tumor progression has been reported[16]. The present authors previously showed that OGT is over-expressed in CCA tissues and increased OGT is correlated with shorter survival of CCA patients[17]. Moreover, knockdown of OGT alleviates the migration/invasion of CCA cells via suppression of NF-κB nuclear translocation[18]. Nevertheless, the mechanisms by which glucose promotes O-GlcNAcylation and CCA progression remain unclear.

The present study was designed to test the crucial role of high glucose in promoting CCA cell migration/invasion, which, in fact, was found to be more pronounced in the highly metastatic cells. The tests in this study were further designed to indicate if the association between high glucose and HBP activation in CCA cells does occur, which would then subsequently increase O-GlcNAcylation and expression of vimentin, leading to the increased motility of cells. Taken together, the present study shows for the first time in the results, the implications of high glucose on HBP-modulated O-GlcNAcylation and aggressiveness of CCA cells. The findings from this study, not only fulfill the understanding of hyperglycemic conditions promoting CCA progression, but also suggest the possible use of GFAT as a new therapeutic target for CCA treatment.

Results

High glucose promoted migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of CCA cell lines. Two pairs of CCA cells with different metastatic potentials, the parental low metastatic cells, KKU-213 and KKU-214, and the highly metastatic cells designated as L5, KKU-213L5 and KKU-214L5, cultured in normal and high glucose DMEM, were used to investigate the migration and invasion abilities using the Boyden chamber assay. As shown in Fig. 1A, the migrated cell numbers of L5 of both cell lines were significantly higher than those of their parental cells in both normal and high glucose conditions. In addition, high glucose potentiated the migration ability of both parental and L5 cells. High glucose, however, had a more pronounced effect on the L5 cells; approximately 2–3 fold for the L5 cells and 1.5 fold for the parental cells. Similar results were observed for the invasion abilities (Fig. 1B).

Since the effect of high glucose was more obvious for the migration, therefore, the expressions of EMT markers were elucidated. As shown in Fig. 1C, by giving the expression of EMT markers from the parental cells in normal glucose reference as 1, the expressions of epithelial marker, E-cadherin, and the mesenchymal marker, slug, of the parental and L5 cells seemed to be unaltered in the high glucose condition. The expression levels of mesenchymal markers, β-catenin and vimentin, of KKU-213, KKU-214, and their L5 sublines, however, were increased in the high glucose condition. The expression levels of vimentin were of interest because these corresponded with the glucose levels and were consistently observed in both cell lines. Vimentin was increased, 2 fold in KKU-213L5 and 1.6 fold in KKU-214L5.

High glucose increased O-GlcNAcylation in L5 cells more than in the parental cells. To reveal the effect of glucose on O-GlcNAcylation, the O-GlcNAcylated protein levels of the parental and L5 cells cultured in the normal and high glucose conditions were examined. The global O-GlcNAcylated proteins of the L5 cells were higher than those of the corresponding parental cells in both normal and high glucose conditions (Fig. 2A,B). Moreover, the effect of glucose-promoting O-GlcNAcylation was more prominent in the L5 cells than the parental cells; 2.5 fold in KKU-213L5 and 1.5 fold in KKU-214L5 (Fig. 2B).

High glucose increased O-GlcNAcylated vimentin and vimentin stability. As expressions of vimentin and O-GlcNAcylation were obviously elevated in L5 cells cultured in the high glucose, the linkage between vimentin and O-GlcNAcylation was investigated next. Cell lysates of L5 cells cultured in the normal and high glucose media were subjected to immunoprecipitation using anti-O-GlcNAcylated protein. As shown in Fig. 3A (upper panel), O-GlcNAcylated vimentin was increased in L5 cells cultured in high glucose. The similar results were obtained in the reversed-immunoprecipitation using anti-vimentin (Fig. 3A, lower panel). To ensure the O-GlcNAcylation of vimentin, the succinylated wheat germ agglutinin (sWGA) lectin pull-down assay was performed as previously described[19] in KKU-213L5. The result showed that O-GlcNAcylated vimentin was increased in high glucose treated cells. The specific interaction of O-GlcNAcylated vimentin and sWGA were assured by the neutralization of sWGA with GlcNAc (Supplementary Fig. S1). The signals of O-GlcNAcylated vimentin, sWGA-conjugated proteins and O-GlcNAcylated proteins were diminished in the presence of GlcNAc. These results affirmed the increased O-GlcNAcylated vimentin in high glucose treated cells. Since stability of protein can be modulated via O-GlcNAcylation, therefore, whether the increase of O-GlcNAcylated vimentin in L5 under high glucose conditions was due to the increases of vimentin stability was determined. The L5 cells were treated with cycloheximide (CHX) at different time points and vimentin expressions were measured. As shown in Fig. 3B, the levels of vimentin of both L5 sublines cultured in high glucose were reduced at a slower rate than those cultured in normal glucose.

Glucose enhanced HK-II, GFAT, and OGT expressions in L5 cells. As O-GlcNAcylation can be modulated by glycolysis, HBP, and O-GlcNAc cycling, the effects of glucose on the expressions of the regulatory enzymes in glycolysis (hexokinase-II; HK-II, phosphofructokinase-1; PFK-1), HBP (GFAT) and O-GlcNAc cycling (OGT and OGA) in L5 cells were examined. As shown in Fig. 4, by giving the enzyme expressions of the parental cells in normal glucose as 1, KKU-213L5 in normal glucose had higher levels of OGT than the parental cells, whereas, levels of HK-II, PFK-1, and GFAT were similar. High glucose induced expressions of HK-II, PFK-1, and GFAT enzymes in KKU-213L5 cells but not in the parental cells. In contrast, KKU-214L5 in normal

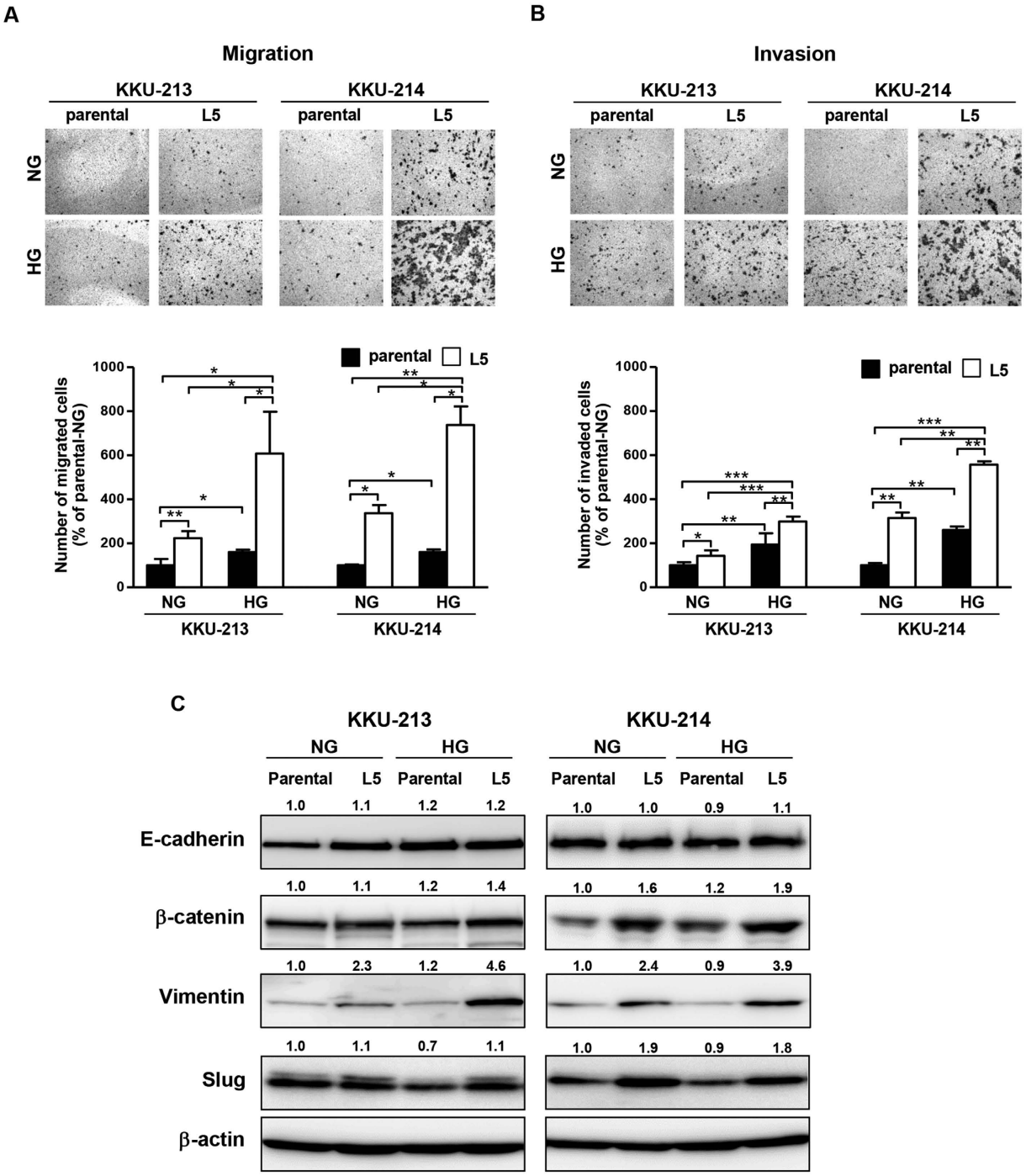


Figure 1. Glucose enhanced migration, invasion, and vimentin expression of highly metastatic CCA cells. The parental CCA cells (KKU-213 and KKU-214) and the highly metastatic L5 counterpart cells were cultured in normal glucose (NG) or high glucose (HG) DMEM. (**A**) migrations and (**B**) invasions were tested by the Boyden chamber assay. Numbers of migrated and invaded cells were quantitated as the percentages of the parental cells in NG. The results (mean ± SD) were the averages from two independent experiments; (**C**) The expressions of EMT markers (E-cadherin, β-catenin, vimentin, and slug) were investigated using western blotting. The intensity of each protein band was normalized by β-actin. The numbers on top of the western blot represent the relative expressions of each protein band by giving that of the parental-NG as 1. The data represent one of two independent experiments. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. Full length blots of 1C are presented in Supplementary Figure S2.

glucose had higher expressions of HK-II, PFK-1, GFAT and OGT than its parental cells. KKU-214 cells cultured in high glucose increased expressions of these enzymes in both L5 and parental cells when compared with the

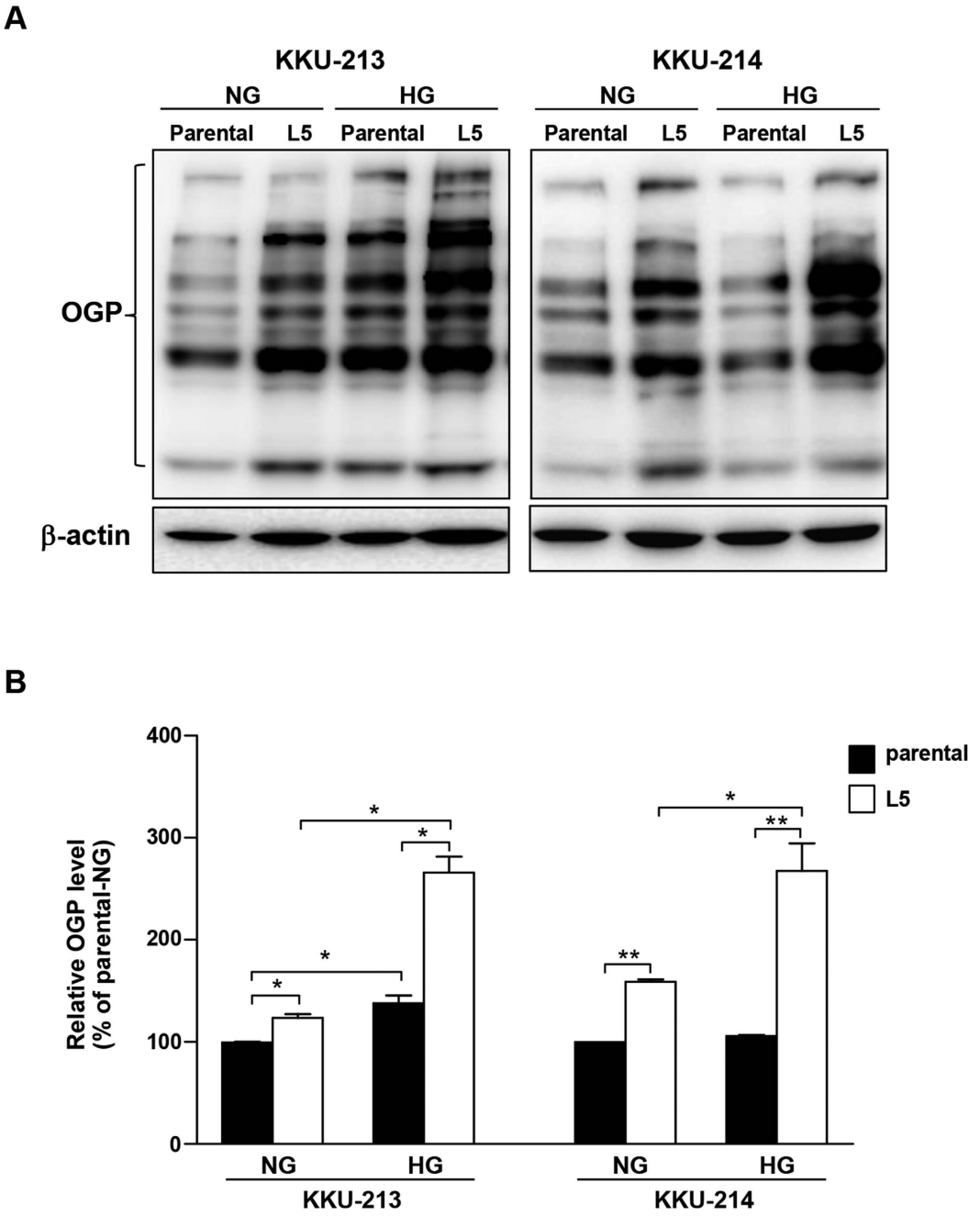


Figure 2. High glucose induced global O-GlcNAcylation of CCA cells. The O-GlcNAcylated protein (OGP) levels were determined using western blotting; (**A**) OGP western blot; (**B**) quantitative analyses of OGP normalized by β-actin and giving that of parental cells cultured in normal glucose (NG) as 1. The data represent one of two independent experiments. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$. HG = high glucose. Full length blots of 2A are presented in Supplementary Figure S3.

corresponding cells in normal glucose. Increased expression of OGA, however, was observed only in the parental cells of both cell lines when cultured in high glucose. In summary, under the high glucose conditions, increased levels of HK-II, GFAT, and OGT were observed in the highly metastatic L5 cells while increases of OGA were found only in the parental cells.

The GFAT inhibitor and si-OGT treatment suppressed glucose-induced O-GlcNAcylation, cell migration, and vimentin expression in L5 cells. As the increased expression of GFAT by high glucose was consistently observed in L5 of both cell lines, the significances of GFAT in mediating O-GlcNAcylation and migration of L5 cells were next examined. GFAT is a key enzyme involved in the synthesis of UDP-GlcNAc, a substrate of O-GlcNAcylation; alteration of GFAT activity might affect cellular O-GlcNAcylation and the migration

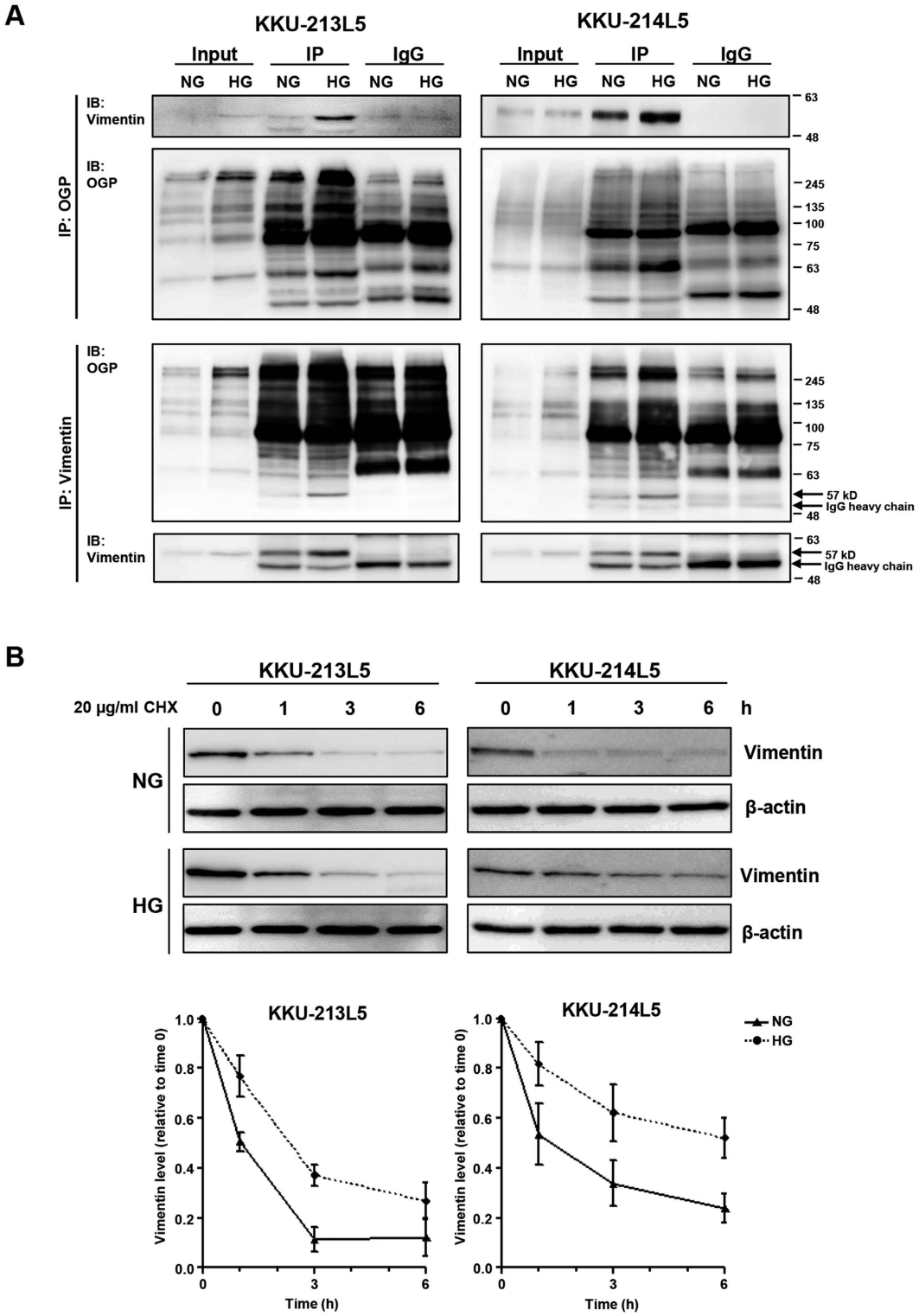


Figure 3. Glucose increased O-GlcNAcylation and stability of vimentin. (**A**) Cell lysates were immunoprecipitated with anti-O-GlcNAcylated proteins (OGP) or anti-vimentin followed by western blotting of vimentin and OGP. (**B**) L5 cells in normal glucose (NG) or high glucose (HG) were treated with 20 μM of CHX for 0, 1, 3, and 6 h, and vimentin levels were compared between L5 cells in NG and HG. The levels of vimentin were quantitated by assigning those at 0 time as 1. The data are presented as mean ± SEM from two independent experiments. Full length blots of 3A and 3B are presented in Supplementary Figures S4 and S5.

of CCA cells. To test this, 6-diazo-5-oxo-l-norleucine (DON), a competitive inhibitor of GFAT was applied. Using L5 in normal glucose without DON as the reference, 50 μM DON treated L5 cells in high glucose reduced

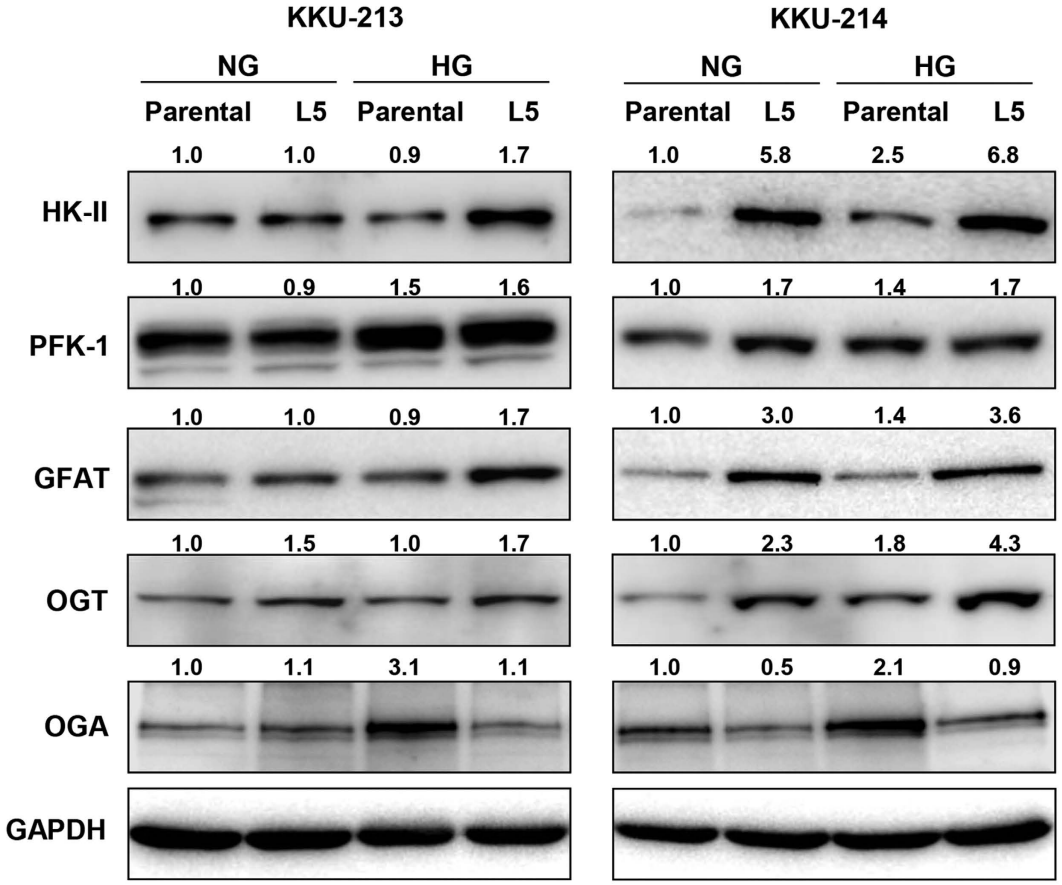


Figure 4. High glucose induced expressions of key regulatory enzymes involved in O-GlcNAcylation. The expressions of HK-II, PFK-1, GFAT, OGT and OGA of the parental and highly metastatic L5 cells cultured in normal glucose (NG) and high glucose (HG) were compared using western blotting. The intensity of each protein band was normalized by GAPDH. The numbers on top of the western blot represent the relative expressions of each protein by giving the parental-NG as 1. The data represent one of two independent experiments. Full length blots are presented in Supplementary Figure S6.

O-GlcNAcylated proteins to the basal levels of L5 cultured in normal glucose (Fig. 5A). The results were consistently observed in both L5 cells. Suppression of GFAT activity by DON also significantly decreased the motility of both L5 cells in high glucose, by 50% in KKU-213L5 and by 85% in KKU-214L5 (Fig. 5B). Treated cells with DON significantly suppressed the expression of vimentin but not those of E-cadherin and β-catenin (Fig. 5C). Moreover, the association of O-GlcNAcylation and vimentin expression was investigated in si-OGT treated L5 cells in high glucose condition. As shown in Fig. 5D, decreased OGT lessened the amount of O-GlcNAcylated proteins and vimentin expression in both L5 cells. The result supported the association of O-GlcNAcylation and vimentin protein stability regardless of high glucose in the cultured media.

GFAT expression in CCA tissues of patients was correlated with O-GlcNAcylated protein level. Because GFAT expression had a positive relationship with the O-GlcNAcylated protein level of CCA cells, whether or not this association existed in CCA tissues of the patients was next examined. The levels of GFAT and O-GlcNAcylated proteins were investigated in CCA tissues using immunohistochemistry (IHC) and quantitated as IHC scores. Expressions of GFAT and O-GlcNAcylated proteins were divided into low- and high-expressed groups using the median IHC scores. The positive correlations between GFAT expression and O-GlcNAcylated protein levels were observed (Fig. 6A and B, Fisher's Exact test, $P = 0.009$). CCA patients (37.7%), who had high GFAT expression in tumor tissues, also had high O-GlcNAcylated protein levels and patients (40%), whose tissues had low GFAT expression, also had low levels of O-GlcNAcylated protein. In addition, expression levels of GFAT from the patients with low O-GlcNAcylated proteins were significantly lower than those with high O-GlcNAcylated proteins (Fig. 6C, Mann-Whitney test, $P = 0.0085$).

Discussion

EMT is an important step in cancer metastasis. Several studies reported the significance of glucose in promoting EMT and metastasis of cancer. Currently, the linkage of high glucose enhancing metastasis of CCA has been emphasized[12]. In this study, it was demonstrated for the first time that high glucose had a more pronounced effect on the highly metastatic CCA cells than the low metastatic counterparts. The molecular mechanism was shown to

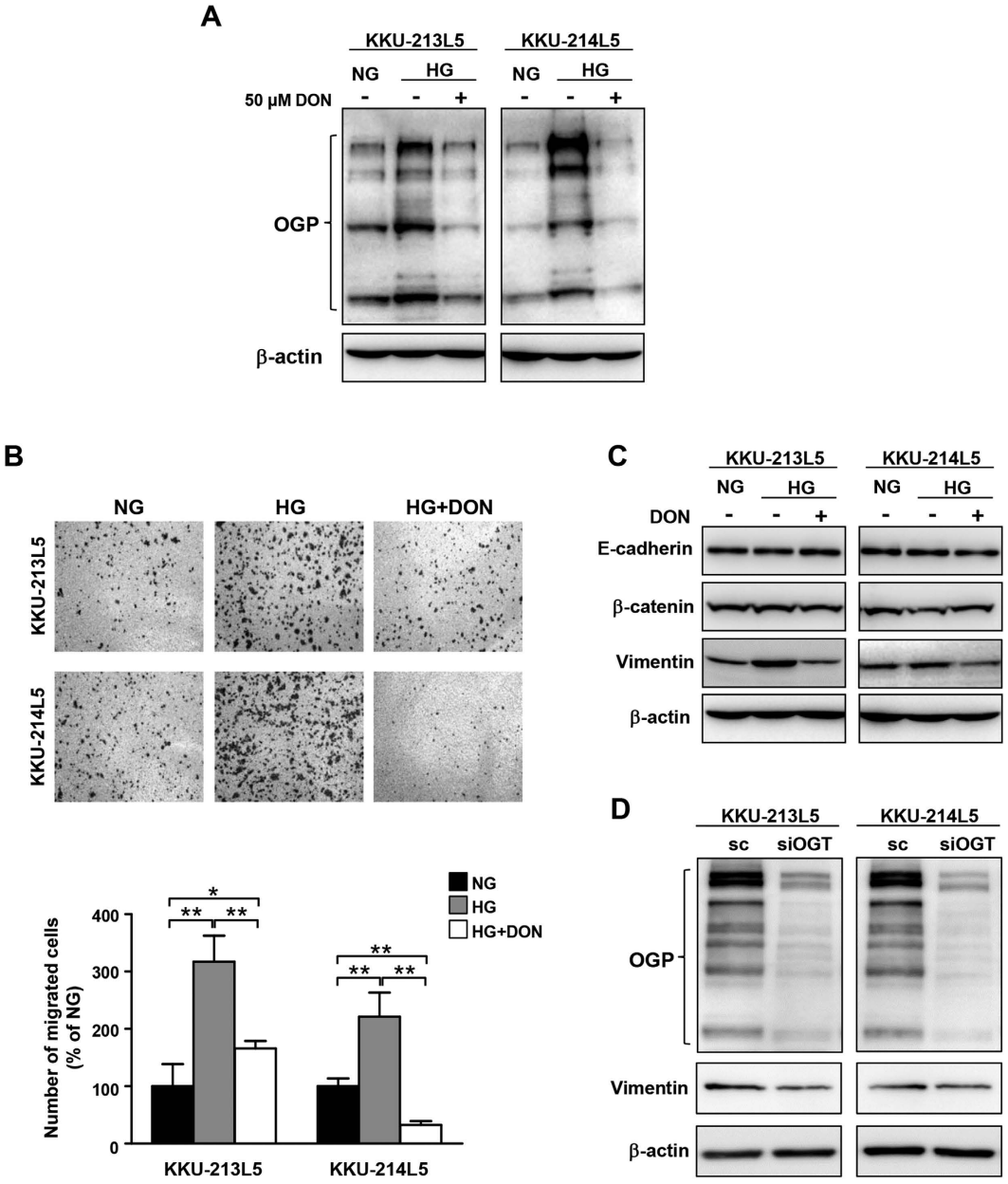
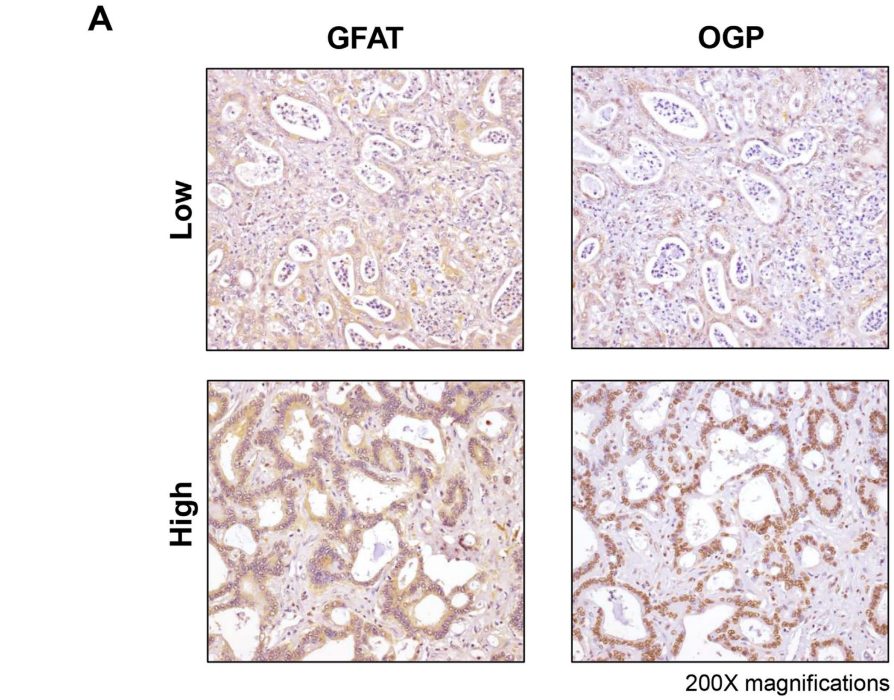


Figure 5. The GFAT inhibitor and si-OGT treatment suppressed glucose-induced O-GlcNAcylation, cell migration, and vimentin expression in L5 cells. L5 cells in high glucose (HG) were treated with DON, a GFAT inhibitor, for 24 h before subjecting to the migration assay and western blotting. L5 cells in normal glucose (NG) were used as references. (**A**) O-GlcNAcylated protein (OGP) levels, (**B**) cell migration and (**C**) vimentin expressions were determined. (**D**) L5 cells were treated with siOGT for 48 h and then were used for OGP and vimentin determination. β-actin was used as a protein loading control. Numbers of migrated cells were quantitated as the percentage of the parental cells in NG. The data represent one of two independent experiments. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$. Full length blots of 5A, 5C, 5D are presented in Supplementary Figure S7.

be via the up-regulation of GFAT in the HBP which in turn increased the O-GlcNAcylation of proteins, especially vimentin. O-GlcNAcylation of vimentin may increase vimentin stability and consequently promote migration and invasion of CCA cells. The impact of GFAT on O-GlcNAcylation in CCA was emphasized by the positive correlation between the expression of GFAT and O-GlcNAcylated protein levels found in the tumor tissues of CCA patients. These findings indicate the significance of high glucose on promoting O-GlcNAcylation and cancer aggressiveness, especially of the highly metastatic CCA cells. Hence, GFAT might be a potential target for CCA treatment, particularly in patients with hyperglycemia or diabetes mellitus.

Several cancer cells increase glucose uptake to provide energy and metabolic intermediates to support cell survival, proliferation, and metastasis[1]. In this study, high glucose induced metastatic phenotypes of the parental and the highly metastatic derivatives, L5 cells. The highly metastatic cells seemed to respond to high glucose more aggressively than the lower metastatic parental cells. This observation was concomitant with higher



B

		GFAT level		P
		Low	High	
OGP level	Low	12 (40.0%)	4 (13.3%)	0.009
	High	3 (10.0%)	11 (37.7%)	

Fisher's Exact Test (two-tailed)

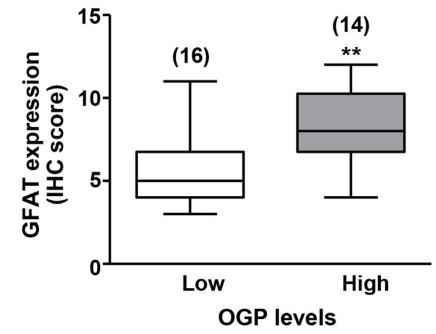


Figure 6. GFAT expressions in CCA tissues from patients correlated with O-GlcNAcylated protein (OGP) levels. (**A**) IHC staining of GFAT and OGP in two representative pairs of CCA tissues. (**B**) The correlations between GFAT and OGP expressions were analyzed by Fisher's Exact test (N = 30). (**C**) Mean expression of GFAT of the low OGP group was significantly lower than that of the high OGP group (**$P < 0.01$; Mann Whitney test). The numbers of samples in each group are indicated.

O-GlcNAcylation found in the L5 cells. The connection between O-GlcNAcylation and aggressive phenotypes under the stimulation of glucose have been reported in many cancers[14,20–23], however, the obvious effect of glucose on highly metastatic cells was first observed in this study.

Addition or removal of O-GlcNAc modulates protein functions in many ways, e.g., regulating protein phosphorylation, altering the stability/localization of proteins, and modulating protein-protein interactions[15,24]. In the present study, promoting cell migration of the highly metastatic L5 cells by high glucose was concomitantly observed with the induction of vimentin O-GlcNAcylation and with a slower decline of vimentin level in the presence of cycloheximide. Hence, the O-GlcNAcylation of vimentin may promote protein stability and consequently stimulate cell migration. Under high glucose stimulation, over-expression of vimentin was observed in the L5 cells. High glucose promoted O-GlcNAcylation and the stability of vimentin was demonstrated by this study. The significance of O-GlcNAcylation on the stability of proteins, for instance, c-Myc and FOXM1, has been reported[25,26]. In the present study, the stability of vimentin in L5 cells under high glucose was prolonged when compares to those under normal glucose. The O-GlcNAcylation of vimentin was previously reported using mass spectrometry[27] and immunoprecipitation[28], however, the effects of glucose on O-GlcNAcylation and stability of vimentin were reported for the first time in this study.

Glycolysis, HBP and O-GlcNAc cycling directly and indirectly modulate protein O-GlcNAcylation (Fig. 7). The molecular linkage between high glucose and the expressions of key enzymes in these pathways in CCA cells

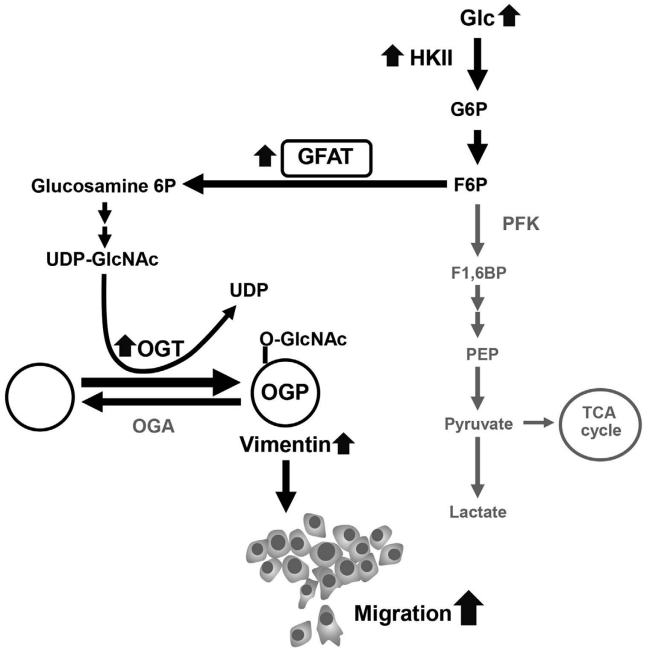


Figure 7. Schematic diagram represents the mechanism of high glucose promoting cell migration via O-GlcNAcylation. High glucose induces high expressions of HK-II, GFAT, and OGT. HK-II catalyzes glucose to glucose-6-phosphate (G6P) and then fructose-6-phosphate (F6P) which can be fluxed into HBP via GFAT action. Elevations of OGT and UDP-GlcNAc, GFAT product, promote cellular O-GlcNAcylation. As a result, vimentin is O-GlcNAcylated. Consequently, O-GlcNAcylated vimentin may increase its stability and promotes CCA cell motility.

were explored. The interplay between these pathways to support higher O-GlcNAcylation of L5 was obvious in KKU-214L5 when compared to KKU-214 in normal glucose. The increases of HK-II, PFK-1, GFAT and OGT with decreased OGA were observed in KKU-214L5 compared to those of the parental cells. In contrast, the parental cells, KKU-213, in normal glucose possessed high levels of HK-II, PFK-1 and GFAT, and hence, the expression of these enzymes did not increase in the L5 cells. In the normal glucose condition, the level of OGT seemed to be responsible for the higher O-GlcNAcylation in L5 cells of both CCA cell lines. Under the high glucose condition, high glucose stimulated the expression of all enzymes tested in KKU-213L5, KKU-214 and KKU-214L5. High glucose could stimulate only the expressions of PFK-1 and OGA of the parental KKU-213. Altogether, high glucose could promote O-GlcNAcylation in L5 cells via up-regulation of the key enzymes involved in O-GlcNAcylation, namely, HK-II, GFAT and OGT, whereas OGA, the enzyme that removes O-GlcNAc was unaltered. Consistent with the current study, the increased global protein O-GlcNAcylation by shunting glucose to HBP was reported in TGF-β-stimulated A549, lung cancer cells[29]. The increased UDP-GlcNAc production drives the O-GlcNAcylations of proteins through the up-regulation of OGT and the induction of EMT process thereafter. The glucose bypassing is modulated by the activation of GFAT expression. Even though there are differences in the stimulants (TGF-β vs. high glucose in this study), the commonality of GFAT promoting protein O-GlcNAcylation and EMT stimulation is evidence.

It is worth mentioning here that high glucose stimulated the expression of OGA in the parental cells of both cell lines. Under the stress of high glucose, the parental cells could possibly respond to reduce the O-GlcNAcylation by increasing OGA; in contrast, the highly metastatic cells were prone to increase O-GlcNAcylation by increasing the expressions of GFAT and OGT. The molecular mechanism by which the parental cells and the highly metastatic cells regulate cellular O-GlcNAcylation is of interest but it is, however, beyond the scope of this study.

The association of OGT and migration of CCA cells was reported previously[18]. In the present study, the role of GFAT in the increase of O-GlcNAcylation and migration in L5 cells under high glucose condition was shown to be significant. Suppression of GFAT action using DON, a GFAT inhibitor, significantly reduced O-GlcNAcylation and migration of L5 cells in both CCA cell lines. As a consequence, vimentin was remarkably reduced in DON treated cells. The use of DON for cancer treatment has been reported in a series of experiments. DON could inhibit cancer growth and systemic metastasis in the VM-M3 murine model[30]. In breast (MCF7) and colorectal (HT29) cancer cell lines, DON and azaserine treatments reduced cell proliferation via the inhibition of O-GlcNAcylation and the reduced stability of β-catenin[31]. Similar effects were reported in endometrial cancer cells, AN3CA and HEC-1-B[32]. Nonetheless, the effect of glucose induced β-catenin expression was not observed in CCA cells in the current study. The association of GFAT and O-GlcNAcylation in CCA patients' tissues was further highlighted herein. High expression of GFAT was correlated with high O-GlcNAcylated protein levels in tumor tissues of CCA patients. All the evidence in the preclinical studies suggested GFAT is a potential target for CCA treatment. Both DON and azaserine, however, have been evaluated in clinical trials and showed adverse effects with variable degrees of gastrointestinal toxicity, myelo-suppression, and neurotoxicity[33,34]. A new potent

GFAT inhibitor with less toxicity is challenging for cancer therapy. The *in vivo* studies using a GFAT inhibitor on growth and metastasis of CCA should be explored.

As summarized in Fig. 7, high glucose induced progression of CCA cells was prominent in the highly metastatic cells. The mechanism was demonstrated partly via the increase of cellular O-GlcNAcylation. GFAT was demonstrated to play a significant role in high glucose induced O-GlcNAcylation and cell migration particularly in the highly metastatic L5 cells. Vimentin was one glucose induced protein in which the stability of this protein may be prolonged, perhaps via GFAT and O-GlcNAcylation. These processes might finally potentiate EMT change and increase cell motility. The association of GFAT and O-GlcNAcylated protein was emphasized not only in the *in vitro* study but also in the tumor tissues of CCA patients. Altogether, the adverse effects of high glucose on aggressiveness of CCA cells, especially on the highly metastatic cells, was emphasized. The potential role of GFAT as a new therapeutic target, especially for advanced CCA, is suggested. Attempts to control blood glucose and/or reducing GFAT action in CCA patients may minimize the effects of high glucose on the aggressiveness of CCA and may be of benefit in the treatment of CCA patients with diabetes mellitus. The research for a new GFAT inhibitor with safer implications requires urgent attention.

Materials and Methods

Reagents and antibodies. DON, O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidenamino) N-phenylcarbamate (PUGNAc), and cycloheximide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Antibodies were purchased from various sources: anti-β-catenin (14) and anti-E-caherin (36) from BD biosciences; anti-slug (C19G7) and anti-vimentin (D21H3, for western blot) from Cell Signaling (Danvers, MA); anti-O-GlcNAc (RL-2) from Pierce Biotechnology (IL, USA); anti-GFAT (H-49), anti-HK-II (C-14), anti-OGT (F-12), and anti-PFK-1 (H-55) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-OGA and control IgG for immunoprecipitation from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); anti-vimentin (RV202) for immunoprecipitation from Abcam (Cambridge, UK). Detail of all antibodies are listed in Supplementary Table S1.

Cell culture. CCA cell lines (KKU-213 and KKU-214), were established from primary tumors of Thai CCA patients by Prof. B. Sripa (Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand) as previously described[35]. Cells were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, Osaka, Japan. The highly metastatic CCA sublines; KKU-213L5 and KKU-214L5 were established from the parental cells, KKU-213 and KKU-214, as described elsewhere[36].

All cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY) containing either normal (5.6 mM glucose) or high glucose (25 mM glucose), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco), for at least 10 passages. The cultures were maintained at 37 °C, 5% CO_2.

CCA tissues. The 30 formalin-fixed paraffin-embed CCA tissues were obtained from the specimen bank of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine Khon Kaen University. The study protocol was approved by the Ethics Committee for Human Research, Khon Kaen University (HE581369). All cancer tissues were histologically proven as intrahepatic CCA.

Cycloheximide treatment. Cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor, was used to determine the protein stability. CCA cells (3×10^5 cells/well) were plated into a 6-well plate and incubated for 24 h and then treated with 20 μg/ml of CHX for the indicated time.

DON treatment. DON, the competitive GFAT inhibitor, was used to determine the functional significance of GFAT. Cells were cultured in high glucose DMEM with or without 50 μM DON for 24 h before further experiments.

Suppression of OGT expression by specific-siRNA. Specific si-OGT was used to evaluate the functional significance of vimentin O-GlcNAcylation in CCA cells. CCA cells (2×10^5 cells/well) were cultured in a 6-well plate for 24 h and then cells were treated with Lipofectamine 2000 (2 μg/ml) containing 100 pmole of siOGT (Invitrogen, NY) according to the manufacturer recommendation. At 6 h after transfection, media was replaced by DMEM containing 10% FBS and cells were cultured for 48 h prior protein lysate preparation for western blotting. Control experiments were performed simultaneously; cells were treated with siControl (Negative Control siRNA, 1027310, Qiagen). The sequences of si-OGT were reported elsewhere[37].

Cell migration and invasion. CCA cells (3×10^4 cells) were added into an upper chamber of an 8.0 μm pore size transwell (Corning Incorporated, Corning, NY) and incubated for 9 h for KKU-213/KKU-213L5 cells and 24 h for KKU-214/KKU-214L5 cells. The migrated cells were stained by 0.4% sulforhodamine B in 0.1% acetic acid. The migrated cell numbers were determined from at least 5 microscopic fields (100× magnification). For the invasion assay, the transwell was coated with 0.4 mg/ml Matrigel™ (BD biosciences) and the experiment was performed as before for the migration assay. All samples were done in duplicate.

Immunoprecipitation. Immunoprecipitation was performed as previously described[18]. Briefly, total cell lysates were incubated with anti-O-GlcNAc, anti-vimentin, or control IgG. The antibody was immobilized using protein-G sepharose beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). After centrifugation, precipitated-beads were washed, eluted, and subjected to SDS-PAGE and western blotting.

Western blot. CCA cells were lysed in NP-40 lysis buffer[18]. Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-rad laboratories, Hercules, CA). Protein lysate was separated on SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. The immunoreactivity was detected using the ECL™ Prime Western Blotting

Detection System (GE Healthcare). The signals were captured by the ImageQuant™ LAS 4000 mini-image analyzer and the signal intensities were analyzed by ImageQuant™ TL analysis software (GE Healthcare).

Immunohistochemistry of GFAT and O-GlcNAcylated proteins. Expressions of GFAT and O-GlcNAcylated proteins were determined using immunohistochemistry (IHC) staining as the standard protocol. The signals were amplified using the EnVision-system-HRP (Dako, Glostrup, Denmark). The immunoreactivity signals were developed using diaminobenzidine (Sigma-Aldrich). The IHC score was determined using Fromowitz standard as described previously[17]. The positive frequencies were scored as 0 = 0–5%; 1+ = 6–25%; 2+ = 26–50%; 3+ = 51–75%; 4+ = 75%; the positive signal intensities: 0 = no staining; 1 = light yellow; 2 = brown; 3 = dark brown; and IHC score = frequency score plus intensity score. Two independent assessors assessed IHC score without knowing information of the clinical parameters.

Statistical analysis. The statistical significance was determined by Student's *t*-test using GraphPad Prism® 5.0 software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA). The correlation between the expression levels of GFAT and O-GlcNAcylated proteins in CCA tissues was analyzed using Fisher's Exact test and Mann-Whitney test, IBM SPSS Statistics 22 software (SPSS, Chicago, IL). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

References

1. Duan, W. *et al.* Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *Biomed Res Int* **2014,** 461917 (2014).
2. Chen, J. *et al.* Gain of glucose-independent growth upon metastasis of breast cancer cells to the brain. *Cancer Res* **75,** 554–565 (2015).
3. Masur, K. *et al.* Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer* **104,** 345–352 (2011).
4. Takatani-Nakase, T., Matsui, C., Maeda, S., Kawahara, S. & Takahashi, K. High glucose level promotes migration behavior of breast cancer cells through zinc and its transporters. *PLoS One* **9,** e90136 (2014).
5. Lin, C. Y. *et al.* Impact of high glucose on metastasis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* **21,** 2047–2057 (2015).
6. Kang, X. *et al.* High glucose promotes tumor invasion and increases metastasis-associated protein expression in human lung epithelial cells by upregulating heme oxygenase-1 via reactive oxygen species or the TGF-beta1/PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* **35,** 1008–1022 (2015).
7. Coughlin, S. S., Calle, E. E., Teras, L. R., Petrelli, J. & Thun, M. J. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol* **159,** 1160–1167 (2004).
8. Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G. & Vigneri, R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* **16,** 1103–1123 (2009).
9. Uttaravichien, T., Bhudhisawasdi, V., Pairojkul, C. & Pugkhem, A. Intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **6,** 128–135 (1999).
10. Zografos, G. N., Farfaras, A., Zagouri, F., Chrysikos, D. & Karaliotas, K. Cholangiocarcinoma: principles and current trends. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **10,** 10–20 (2011).
11. Saengboonmee, C., Seubwai, W., Wongkham, C. & Wongkham, S. Diabetes mellitus: Possible risk and promoting factors of cholangiocarcinoma: Association of diabetes mellitus and cholangiocarcinoma. *Cancer Epidemiol* **39,** 274–278 (2015).
12. Saengboonmee, C., Seubwai, W., Pairojkul, C. & Wongkham, S. High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells via STAT3 activation. *Sci Rep* **6,** 18995 (2016).
13. Hart, G. W., Housley, M. P. & Slawson, C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446,** 1017–1022 (2007).
14. Butkinaree, C., Park, K. & Hart, G. W. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* **1800,** 96–106 (2010).
15. Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G. & Lagerlof, O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* **80,** 825–858 (2011).
16. de Queiroz, R. M., Carvalho, E. & Dias, W. B. O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front Oncol* **4,** 132 (2014).
17. Phoomak, C. *et al.* Overexpression of O-GlcNAc-transferase associates with aggressiveness of mass-forming cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* **13** Suppl, 101–105 (2012).
18. Phoomak, C. *et al.* Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kappaB. *Sci Rep* **6,** 27853 (2016).
19. Kang, J. G. *et al.* O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem* **284,** 34777–34784 (2009).
20. Alisson-Silva, F. *et al.* Increase of O-glycosylated oncofetal fibronectin in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human epithelial cells. *PLoS One* **8,** e60471 (2013).
21. Olivier-Van Stichelen, S. *et al.* O-GlcNAcylation stabilizes beta-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *Faseb J* **28,** 3325–3338 (2014).
22. Onodera, Y., Nam, J. M. & Bissell, M. J. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J Clin Invest* **124,** 367–384 (2014).
23. Yang, W. H. *et al.* NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **105,** 17345–17350 (2008).
24. Zachara, N. E. & Hart, G. W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta* **1761,** 599–617 (2006).
25. Itkonen, H. M. *et al.* O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **73,** 5277–5287 (2013).
26. Lynch, T. P. *et al.* Critical role of O-Linked beta-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* **287,** 11070–11081 (2012).
27. Wang, Z., Pandey, A. & Hart, G. W. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **6,** 1365–1379 (2007).
28. Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S. & Hart, G. W. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell* **19,** 4130–4140 (2008).
29. Lucena, M. C. *et al.* Epithelial Mesenchymal Transition Induces Aberrant Glycosylation through Hexosamine Biosynthetic Pathway Activation. *J Biol Chem* **291,** 12917–12929 (2016).
30. Shelton, L. M., Huysentruyt, L. C. & Seyfried, T. N. Glutamine targeting inhibits systemic metastasis in the VM-M3 murine tumor model. *Int J Cancer* **127,** 2478–2485 (2010).
31. Olivier-Van Stichelen, S. *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of beta-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302,** E417–424 (2012).

32. Zhou, F. *et al.* Elevated glucose levels impair the WNT/beta-catenin pathway via the activation of the hexosamine biosynthesis pathway in endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **159,** 19–25 (2016).
33. Ahluwalia, G. S., Grem, J. L., Hao, Z. & Cooney, D. A. Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents. *Pharmacol Ther* **46,** 243–271 (1990).
34. Hensley, C. T., Wasti, A. T. & DeBerardinis, R. J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* **123,** 3678–3684 (2013).
35. Sripa, B. *et al.* Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). *World J Gastroenterol* **11,** 3392–3397 (2005).
36. Uthaisar, K. *et al.* Establishment and characterization of a novel human cholangiocarcinoma cell line with high metastatic activity. *Oncol Rep* **36,** 1435–1446 (2016).
37. Zhu, Q. *et al.* O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* **29,** 985–993 (2012).

Acknowledgements

This project was co-supported by the TRF Senior Research Scholar Grant and Khon Kaen University to S.W. (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS, Khon Kaen University (NRU582010) to K.V. and the RGJ-PhD Program, TRF (PHD/0016/2556) to C.P. and S.W. The authors would like to thank Prof. James A Will for editing this manuscript via the Faculty of Medicine Publication Clinic, KKU.

Author Contributions

C.P., K.V., A.S., C.W., S.W. conceived and designed experiments; C.P., K.V. performed experiments; C.P., K.V. prepared the figures; C.P., K.V., A.S., C.S., W.S., K.S., C.W., S.W. analyzed data; C.P., K.V., S.W. wrote the manuscript. All authors participated in the interpretation of the studies and analysis of the data and review of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Phoomak, C. *et al.* High glucose levels boost the aggressiveness of highly metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation. *Sci. Rep.* **7**, 43842; doi: 10.1038/srep43842 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017

Oncology Research, Vol. 25, pp. 1047–1059
Printed in the USA. All rights reserved.
Copyright © 2017 Cognizant, LLC.

0965-0407/17 $90.00 + .00
DOI: https://doi.org/10.3727/096504016X14813899000565
E-ISSN 1555-3906
www.cognizantcommunication.com

Upregulation of CD147 Promotes Metastasis of Cholangiocarcinoma by Modulating the Epithelial-to-Mesenchymal Transitional Process

Paweena Dana,*†‡ Ryusho Kariya,‡ Kulthida Vaeteewoottacharn,*† Kanlayanee Sawanyawisuth,*† Wunchana Seubwai,†§ Kouki Matsuda,‡ Seiji Okada,‡ and Sopit Wongkham*†

*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
†Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
‡Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan
§Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

CD147 is a transmembrane protein that can induce the expression and activity of matrix metalloproteinases (MMPs). Expression of CD147 has been shown to potentiate cell migration, invasion, and metastasis of cancer. In this study, the critical role of CD147 in metastasis was elucidated using CD147-overexpressing cholangiocarcinoma (CCA) cells in vitro and in vivo. The molecular mechanism, demonstrated herein, supported the hypothesis that metastasis increased in CD147-overexpressing cells. Five CD147-overexpressing clones (Ex-CD147) were established from a low CD147-expressing CCA cell line, KKU-055, using lentivirus containing pReceiver-Lenti-CD147. The metastatic capability was determined using the tail vein injection mouse model and an in vitro 3D invasion assay. Liver colonization was assessed using anti-HLA class I immunohistochemistry. Adhesion abilities, cytoskeletal arrangements, MMP activities, the expressions of adhesion molecules, and epithelial–mesenchymal transitional markers were analyzed. All Ex-CD147 clones exhibited a high CD147 expression and high liver colonization in the tail vein-injected mouse model, whereas parental cells lacked this ability. Ex-CD147 clones exhibited metastatic phenotypes (i.e., an increase in F-actin rearrangement) and cell invasion and a decrease in cell adhesion. The molecular mechanisms were shown to be via the induction of MMP-2 activity and enhancement of epithelial–mesenchymal transitions. An increase in mesenchymal markers Slug, vimentin, and N-cadherin, and a decrease in epithelial markers E-cadherin and claudin-1, together with suppression of the adhesion molecule ICAM-1, were observed in the Ex-CD147 clones. Moreover, suppression of CD147 expression using siCD147 in two CCA cell lines with high CD147 expression significantly decreased cell migration and invasion of these CCA cells. These findings emphasize the essential role of CD147 in CCA metastasis and suggest CD147 as a promising target for the effective treatment of CCA.

Key words: Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN); Cell invasion; Metastasis; Epithelial–mesenchymal transition (EMT); Matrix metalloproteinase (MMP)

INTRODUCTION

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of the bile duct epithelium. It is a rare cancer worldwide, but the incidence is high in Southeast Asia, especially in northeast Thailand[1]. Infection with liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, is one of the known risk factors in this area[2]. CCA is a slow-growing but highly metastatic tumor. It is difficult to diagnose CCA in an early stage as it has no specific symptoms, and hence the majority of patients are diagnosed at an advanced stage with a poor prognosis. Similar to many cancers, most CCA patients die of cancer metastasis. Thus, understanding the molecular mechanism of metastasis in CCA might provide an innovative strategy for better treatment of CCA.

The molecular mechanism associated with the metastasis of CCA has been studied intensively in the past decade. Methionine aminopeptidase-2 and its substrate cyclophilin A were found to be increased in CCA tissues and are related to the shorter survival of patients[3,4]. Suppression of cyclophilin A expression inhibited the growth of CCA cells in vitro and in vivo. In addition, neutralizing CD147, a known receptor of cyclophilin A

Address correspondence to Professor Seiji Okada, Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan. Tel: +81-96-373-6522; Fax: +81-96-373-6523; E-mail: okadas@kumamoto-u.ac.jp *or* Professor Sopit Wongkham, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 123 Mittapap Road, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel: +66-4334-8386; Fax: +66-4334-8386; E-mail: sopit@kku.ac.th

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

with a specific antibody, could diminish the proliferation-promoting action of cyclophilin A in CCA cell lines[5]. This collective evidence suggested the significant roles of CD147 in CCA progression.

CD147, or extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), is an integral membrane glycoprotein of an immunoglobulin superfamily that normally expresses on the cell surfaces of epithelial cells, fibroblasts, and T lymphocytes[6,7]. In physiological conditions, CD147 plays a role in immune response and tissue remodeling[8,9] with a well-known function of inducing matrix metalloproteinase (MMP) expression[10,11]. An increase in CD147 expression was observed and correlated with lymph node metastases and shorter survival of cancer patients[12,13].

However, information regarding CD147 in CCA is limited. The expression of CD147 was increased in CCA tissues and is related to a shorter survival of patients[11]. Data from serial analysis of gene expression (SAGE) indicated the higher expression of CD147 in patient CCA tissues than that of normal adjacent tissues[14] (http://www.cgap.nci.nih.gov/sage). The role of CD147 in CCA progression at the molecular mechanism level, however, remains unknown. This study aimed to reveal the role of CD147 on tumor progression of CCA in vitro and in vivo. Overexpression of CD147 in low CD147-expressing CCA cells promotes aggressive phenotypes with high metastatic activity. The downstream signals underlying CD147 action were revealed. In addition, suppression of CD147 expression in the high CD147-expressing CCA cells significantly decreased their migration and invasion abilities. These findings, for the first time, demonstrate the essential role of CD147 in CCA metastasis and suggest CD147 as a promising target for an effective treatment of CCA.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Four CCA cell lines, KKU-055, KKU-100, KKU-213, and KKU-214, were established as previously described[15]. Cells were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, Osaka, Japan. All cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako, Osaka, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2.

Establishment of CD147-Overexpressing Cells

pReceiver-CD147-Lv122 containing the full-length open reading frame (ORF) of CD147 was purchased from GeneCopoeia (Rockville, MD, USA). pReceiver-CD147-Lv122 was cotransfected with pCMVR8.74 and pMD2.G into 293T cells[16]. pCMVR8.74 (Addgene plasmid #22036) and pMD2.G (Addgene plasmid #12259) were gifts from Professor Didier Trono, School of Life Sciences, Swiss Institutes of Technology, Lausanne, Switzerland. Viral supernatants were collected, centrifuged at $2{,}000\times g$ at 4°C for 5 min, and transduced to the KKU-055 cells using polybrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). CD147-overexpressing cells (Ex-CD147) were selected using 0.5 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich). Single clones were selected using a sterile clonal cylinder[17]. The levels of CD147 expression were monitored using flow cytometry analysis and Western blotting analysis.

In Vivo Mouse Model for Analysis of Metastatic Capability

CCA cells (5×10^5 cells/100 µl of complete medium) were intravenously injected via the tail vein of Balb/c Rag-2/Jak3 double deficient (Balb/c RJ) mice as previously described[18,19]. Mice were housed in the animal research facility according to institutional guidelines, with 12-h light and food and water ad libitum. All experimental procedures and protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Kumamoto University. Mouse behavior was observed every day, and body weights were monitored twice a week. Mice were euthanized on day 24 after cancer cell injection, and lungs and livers were removed. Liver nodules were counted by gross inspection. Tissues were fixed and embedded in paraffin according to the standard procedures. Anti-HLA class I A, B, C (Hokudo, Suporo, Hokaido, Japan) was used for immunohistochemistry staining as the standard marker for human cells.

Immunofluorescence Staining of F-Actin

Cells (3×10^4 cells) were cultured on a sterile coverslip and fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min at room temperature (RT) and washed once with PBS. After cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min at RT and washed twice with PBS, cells were incubated with 100 nM rhodamine phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) for 30 min in the dark at RT. The nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The fluorescent signals were analyzed under a fluorescence microscope (Bio-Zero BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan).

Cell Adhesion Assay

The adhesion assay was performed as previously reported[20]. Briefly, cells at a density of 1×10^5 cells/ml were incubated in a 96-well plate for 12 h. The unbound cells were then discarded, and the adhered cells were washed once with PBS and cultured further in 100 µl of DMEM and 0.5 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich).

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

After 3 h of incubation, 100 µl of acidified isopropanol was added to dissolve the crystals. Absorption values at 595 nm were determined with an ELISA plate reader (Multiskan; Thermo Electron Vantaa, Finland).

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted using RNAiso Plus reagent (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan), and cDNA was prepared using the PrimeScript RT-PCR kit (Takara Bio Inc.). Quantitative RT-PCR analysis was performed using the Applied Biosystems Step One Real-Time PCR System (Life Technologies, Foster City, CA, USA). The mRNA level of ICAM-1 and E-cadherin were normalized with Ct of GAPDH and calculated as ($\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{GAPDH}$), and $2^{-\Delta\Delta}Ct$ was used to calculate the fold change. The oligonucleotide primers of E-cadherin, ICAM-1, and GADPH used were previously reported[21].

Flow Cytometry Analysis

Cells (1.5×10^5) were stained with indicated antibodies purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA); CD147 conjugated with allophycocyanin (APC; clone HIM6), E-cadherin (CD324) conjugated with APC (clone 67A4), ICAM-1 (CD54) conjugated with phycoerythrin (PE; clone31625X), or the corresponding isotype control antibodies for 30 min, on ice in the dark. Cells were analyzed using an LSR II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were analyzed using FlowJo software version 9.7.6 (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

3D Invasion Assay

The three-dimensional (3D) invasion assay, or Matrigel evasion assay, was performed as previously described[22]. Briefly, cells (1×10^4 cells) were suspended in 6 mg/ml Matrigel (Corning Inc., Corning, NY, USA) in a serum-free DMEM, dropped into a six-well plate, and maintained for 1 h at 37°C. The complete medium was then added into the well. Evasion ability was determined on day 6 after dropping the Matrigel into the wells and then measuring the distance of cell movement from the drops (two drops/cell). Images were taken using a microscope (Bio-Zero BZ-8000; Keyence). Two independent experiments were performed.

Gelatin Zymography Assay

Conditioned medium was collected from cells cultured in serum-free DMEM for 24 h. Debris cells were removed by centrifugation at $2{,}000\times g$, 4°C for 5 min, and supernatant was collected. MMP-2 and MMP-9 activities were determined using the gelatin zymography assay as described previously[23]. Gels were stained with 0.5% Coomassie brilliant blue G-250 for 30 min and rehydrated in 2% acetic acid overnight at RT. The stained bands were scanned using Image Quant LAS 400 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and analyzed by Image Quant TL (GE healthcare).

Protein Extraction and Western Blot Analysis

Cell lysate, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and Western blots were performed as previously described[24]. The sources of antibodies were as indicated: CD147 (ab666; Abcam, Cambridge, UK) and HSP70/HSC73 (1B5; ENZO Life Science, Plymouth Meeting, PA, USA). The following antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA): vimentin (D21H3), N-cadherin (D4R1H) XP, claudin-1 (D5H1D) XP, Slug (C19G7), E-cadherin (24E10), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG, and HRP-conjugated anti-mouse IgG.

Suppression of CD147 Expression Using Specific siRNA

Suppression of CD147 in KKU-213 and KKU-214 cell lines was performed using si-RNA specific to CD147. Sequences of siCD147 were 5′-GUC GUC AGA ACA CAU CAA C-3′ (sense) and 5′-GUU GAU GUG UUC UGA CGA C-3′ (antisense) (Integrated DNA Technologies Pte. Ltd., Singapore). CCA cell lines (2×10^5 cells/well) were cultured in a six-well plate for 24 h and then transfected with 100 pmol of siCD147 using 2 µg/ml of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) according to the recommendations of the manufacturer. Six hours later, medium was removed and cells were cultured in 10% FBS in DMEM for the subsequent experiments. Cells treated with siControl (Negative Control siRNA; 1027310; Qiagen, Valencia, CA, USA) were used as the experimental control.

Cell Proliferation, Migration, and Invasion Assays

Cell proliferation was measured using the MTT proliferation assay (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's guidelines. Migration and invasion were analyzed using the Boyden chamber assay with Transwell cell culture inserts (8.0-µm pore size; Corning Inc.) as previously described[25]. siCD147-treated or control cells (4×10^4 cells/well) were allowed to migrate or invade for 9 h for KKU-213 and 24 h for KKU-214. Experiments were performed in duplicate, and at least two independent experiments were done.

Statistical Analyses

The results are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) as indicated in the figure legends. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test. A value of $p<0.05$ was set as the level of statistical significance. All of the statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA).

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

RESULTS

Establishment of Stably Overexpressed CD147 KKU-055 Cells

Endogenous CD147 expression in four CCA cell lines, KKU-055, KKU-100, KKU-213, and KKU-214, was first determined (Fig. 1A). CCA cell lines expressed different levels of CD147 in both high (HG) and low glycosylated (LG) forms. KKU-213 and KKU-214 had high CD147 expression, whereas KKU-055 and KKU-100 had low expression. Therefore, KKU-055 was selected to be established as the CD147-overexpressing cells.

To create the CD147-overexpressing cell line, KKU-055 was transduced with lentivirus containing pReceiver-Lenti-CD147. Transduced cells were selected using 0.5 μg/ml puromycin. Single clones were selected using sterile clonal cylinders. Fifteen clones were randomly selected, and the expression of CD147 was determined using flow cytometry and Western blotting. Five CD147-overexpressing clones that possessed high levels of CD147 expression compared to their parental KKU-055 (Fig. 1B) were selected and designated as Ex-CD147 #3, #8, #12, #14, and #15. These five clones were used for further study.

CD147-Overexpressing Clones Exhibited High Metastatic Ability In Vivo

The effect of CD147 on CCA metastasis was investigated. Cells of five CD147-overexpressing cell clones and the parental cells, KKU-055, were intravenously injected via tail veins into Balb/c RJ mice (two to three mice/clone). Mice were sacrificed 24 days after injection. Lungs and livers were removed, and metastatic nodules were observed. No nodules were observed in the lungs from either parental or CD147-overexpressing cells in injected mice. However, multiple nodules were seen on the livers from mice injected with CD147-overexpressing cells but not from those injected with the parental cells (Fig. 2A). The visible nodules were counted, and the numbers are presented in Figure 2B. To confirm that no CCA cells metastasized to the liver from KKU-055-injected mice, liver sections from each group of animals

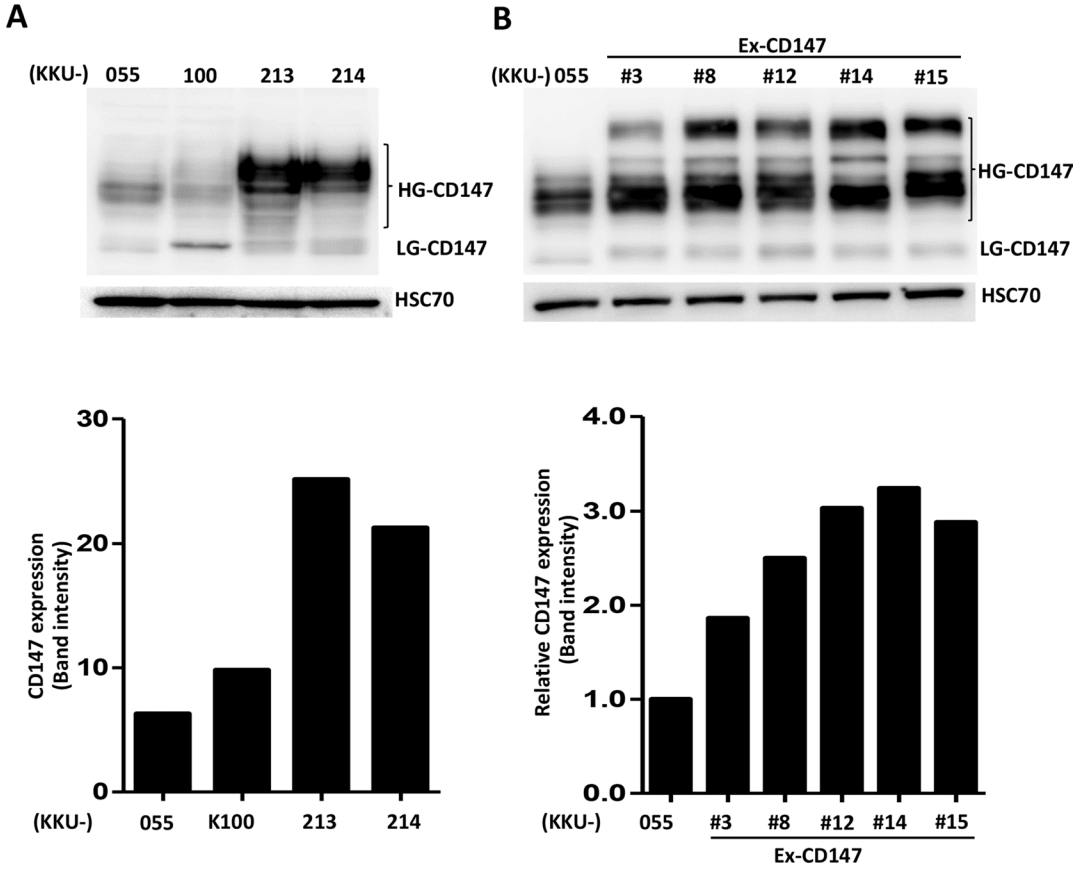


Figure 1. Expression of CD147 in cholangiocarcinoma (CCA) cell lines. The expression levels of CD147 were determined using Western blotting. (A) Endogenous expressions of CD147 in four CCA cell lines. (B) Expression of CD147 in the parental KKU-055 and the stable CD147-overexpressing clones. HSC70 was used as a loading control for Western blotting. Graphs represent band intensities of CD147 expression and are one representative from two independent experiments.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

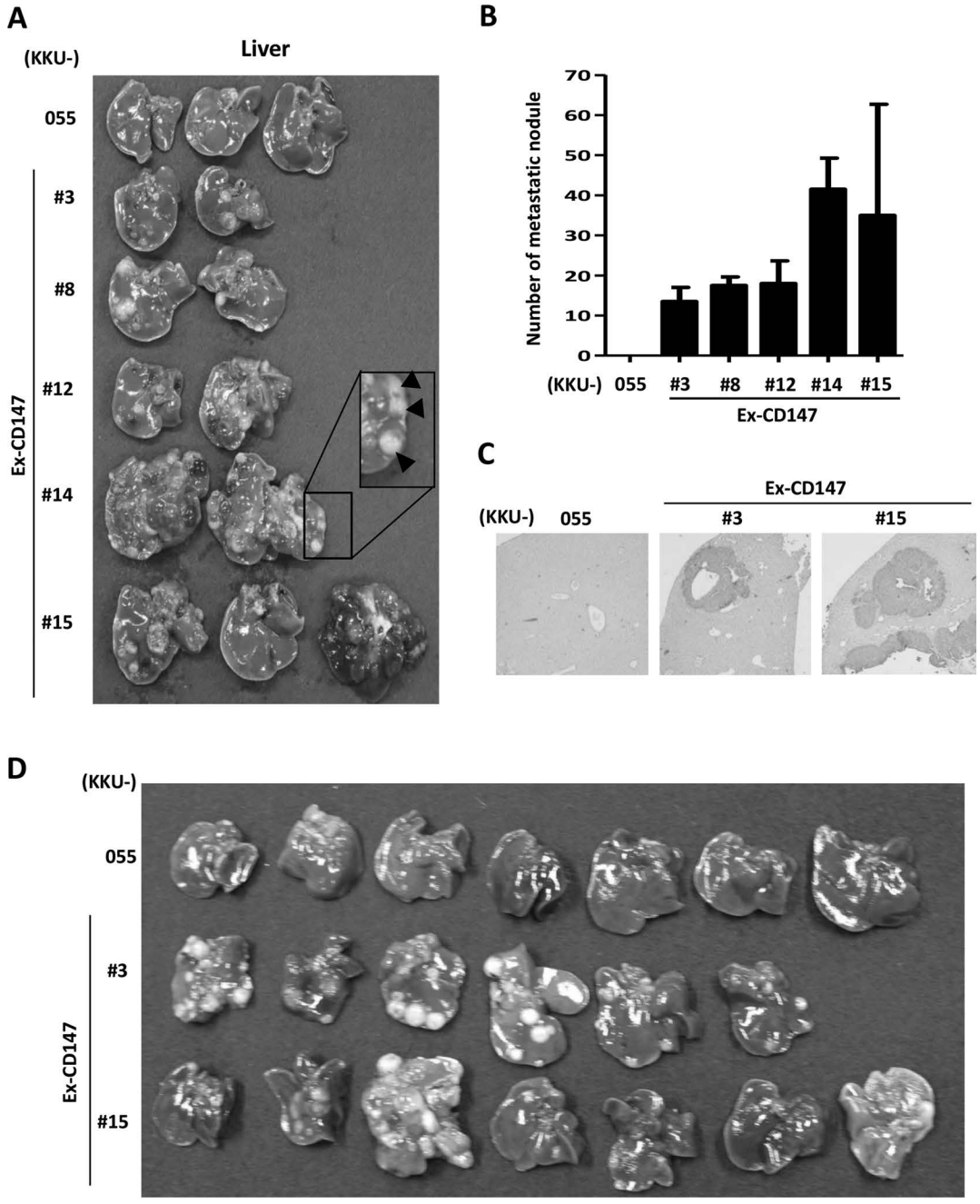


Figure 2. Overexpression of CD147 promotes liver colonization of CCA cells in vivo. The stably expressed CD147 clones (Ex-CD147) or parental cells (KKU-055) were intravenously injected into mice. Lung and liver colonizations were inspected 24 days after injection. No lung colonization was observed. (A) Liver nodules were macroscopically observed in the livers from mice injected with CD147-overexpressing clones. The inset highlights the liver nodules. (B) Quantitative analysis of the number of liver nodules found in each group. (C) Histological analysis of anti-HLA staining indicated the presence of CCA cells in the liver tissues. Representatives of liver sections from Ex-CD147 #3- and #15-injected mice are presented. (D) KKU-055, Ex-CD147 #3 and #15 were injected via tail vein to six to seven Balb/c Rag-2/Jak3 double deficient (Balb/c RJ) mice. Livers were removed 24 days after injection and inspected for liver colonization.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

were immunohistochemically stained with a specific antibody to human cells, anti-HLA class I A, B, C antibodies, and observed microscopically. There was no HLA^+ staining observed in the livers from mice injected with parental cells. In contrast, HLA^+ staining cells were frequently observed in the livers from the mice injected with CD147-overexpressing clones (Fig. 2C). To affirm the linkage between the expression of CD147 and the metastatic potential of CCA cells, two CD147-overexpressing cell line cells (Ex-CD147 #3 and #15) and their parental cells were injected via tail veins in a larger number of mice (six to seven mice/group). The results revealed that all livers obtained from mice injected with CD147-overexpressing cells had liver colonization, whereas none were found in the livers from mice injected with parental cells (Fig. 2D).

CD147-Overexpressing Cells Exhibit High F-Actin Microfilament

As observed under microscopy, the cell morphology of CD147-overexpressing cells exhibited more spindle-like shapes with multiple membrane protrusions compared with parental cells (Fig. 3A). The effect of CD147 on F-actin rearrangement was investigated using rhodamine phalloidin staining and observed under a fluorescence microscope. CD147-overexpressing cells presented the enrichment of cytoplasmic F-actin microfilaments on the protruding membranes, while it was generally dispersed in the cytoplasm and on the membranes of parental cells (Fig. 3B). In addition, the rhodamine fluorescence intensities of CD147-overexpressing cells were higher than those of parental cells (Fig. 3C).

CD147-Overexpressing Cells Possess Low Adhesion Ability

The adhesion ability and adhesion molecules may partly contribute to the morphological changes and F-actin rearrangements observed in CD147-overexpressing cells. Therefore, cell adhesion and adhesion molecules, namely, ICAM-1 and E-cadherin, were next investigated in CD147-overexpressing cells in comparison with parental cells. Almost all CD147-overexpressing cells had a significantly

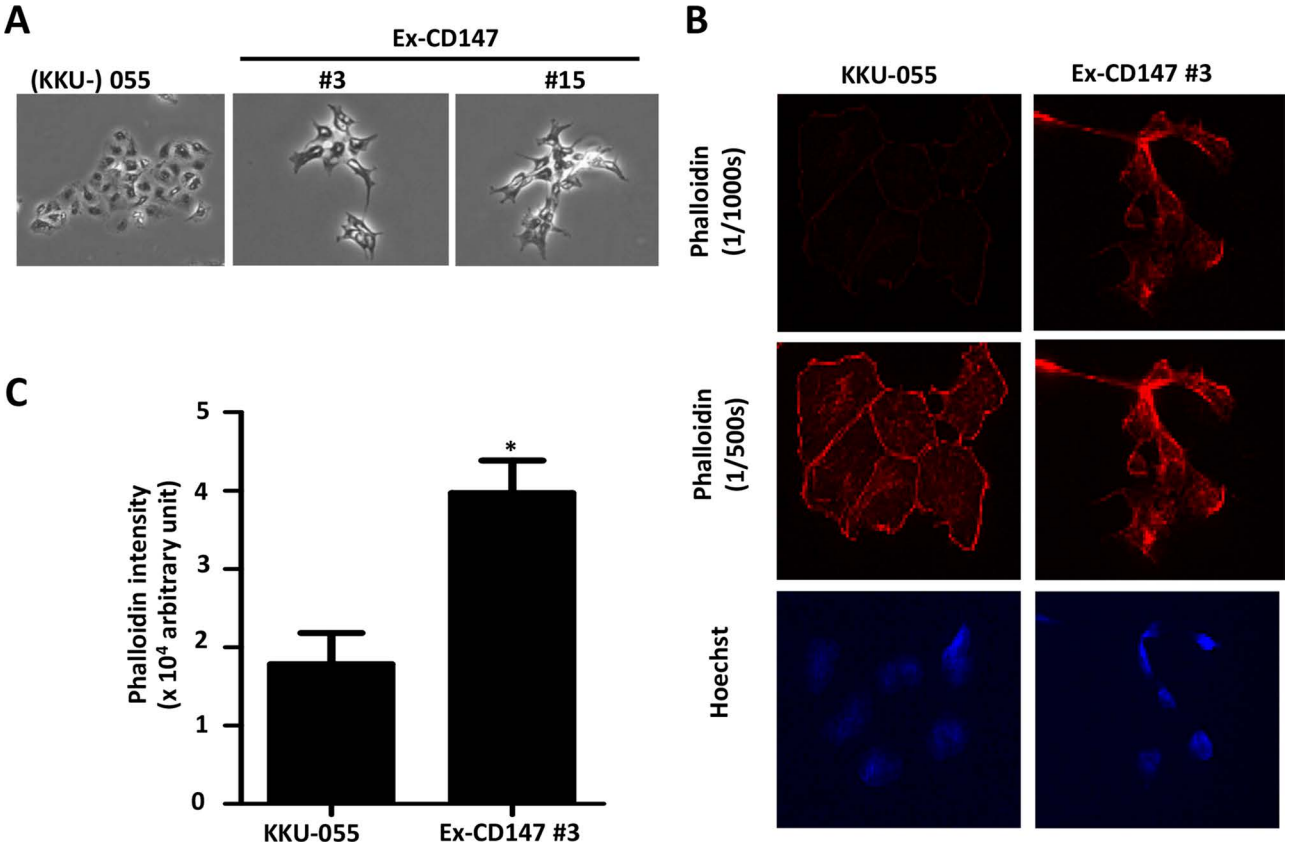


Figure 3. Overexpression of CD147 promotes cytoskeleton actin microfilament rearrangement. (A) Cell morphology of CD147-overexpressing cells compared with those of KKU-055. Phase contrast with 200× magnification. (B) F-actin arrangement analyzed by rhodamine phalloidin staining and detected by fluorescence microscopy with short (1/1,000 s) and long (1/500 s) exposure times. (C) Mean intensities of phalloidin/cell of the parental and CD147-overexpressing cells (Ex-CD147 #3) are compared. At least 100 cells were determined. The results are mean ± standard error of the mean (SEM) from one of two independent experiments. $*p < 0.05$.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

lower adhesion ability than their parental, KKU-055, cells (Fig. 4A). In addition, the expression of ICAM-1 and E-cadherin was also lower in CD147-overexpressing cells than in parental cells in both mRNAs and proteins (Fig. 4B and C).

CD147-Overexpressing Cells Had High Invasion Ability In Vitro

The effects of CD147 on cell migration and invasion were next investigated in vitro. Unfortunately, CD147-overexpressing cells had low adhesion properties, and hence data regarding their migratory ability using the wound-scratching and Boyden chamber assays could not be used. Therefore, 3D invasion or evasion assays were performed instead. The results showed that all CD147-overexpressing cells had a significantly higher invasion ability when compared with KKU-055 parental cells (Fig. 5A).

Overexpression of CD147 Promotes MMP Activity and Expression of Mesenchymal Markers

To identify the mechanism underlying CD147-promoted cell invasion, the downstream targets of CD147, MMP-2, and MMP-9, which are involved in cancer cell invasion, were determined. Gelatin zymography revealed that the CD147-overexpressing cells had a dramatically higher MMP-2 activity than their parental cells (Fig. 5B). Western blot analysis of epithelial markers (E-cadherin and claudin-1) and mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin, and Slug) indicated that CD147-overexpressing cells expressed lower levels of E-cadherin and claudin-1 and higher expressions of N-cadherin, vimentin, and Slug than their parental cells (Fig. 5C).

Suppression of CD147 Expression in High CD147-Expressing Cells Reduced Cell Migration and Invasion

To explore whether CD147 could be a promising target for the effective treatment of CCA metastasis, KKU-213 and KKU-214, two CCA cell lines with a high CD147 expression, were transiently suppressed using siRNA against CD147. Scramble RNA-treated cells were used as the controls. The efficiency of siCD147 was checked according to time after transfection in KKU-213 cells using Western blot after 24 to 96 h. Compared with the scramble control, siCD147 could suppress CD147 expression up to 96 h (Fig. 6A and B). CD147 expression was suppressed to 30% of the control at 48 h and to 60% at 72–96 h after transfection.

The proliferation rate of CD147 knockdown cells was not different than those of the scramble control cells, as observed using MTT assay from 24 to 96 h (data not shown). Cell migration and invasion were investigated using a Boyden chamber assay. The results revealed that silencing of CD147 could inhibit cell migration of KKU-213 to 40% and KKU-214 to 20% of the controls (Fig. 6C). Similar observations were made using the invasion assay. Inhibition of CD147 expression could reduce cell invasion of KKU-213 to 20% and KKU-214 to 40% of the controls (Fig. 6D).

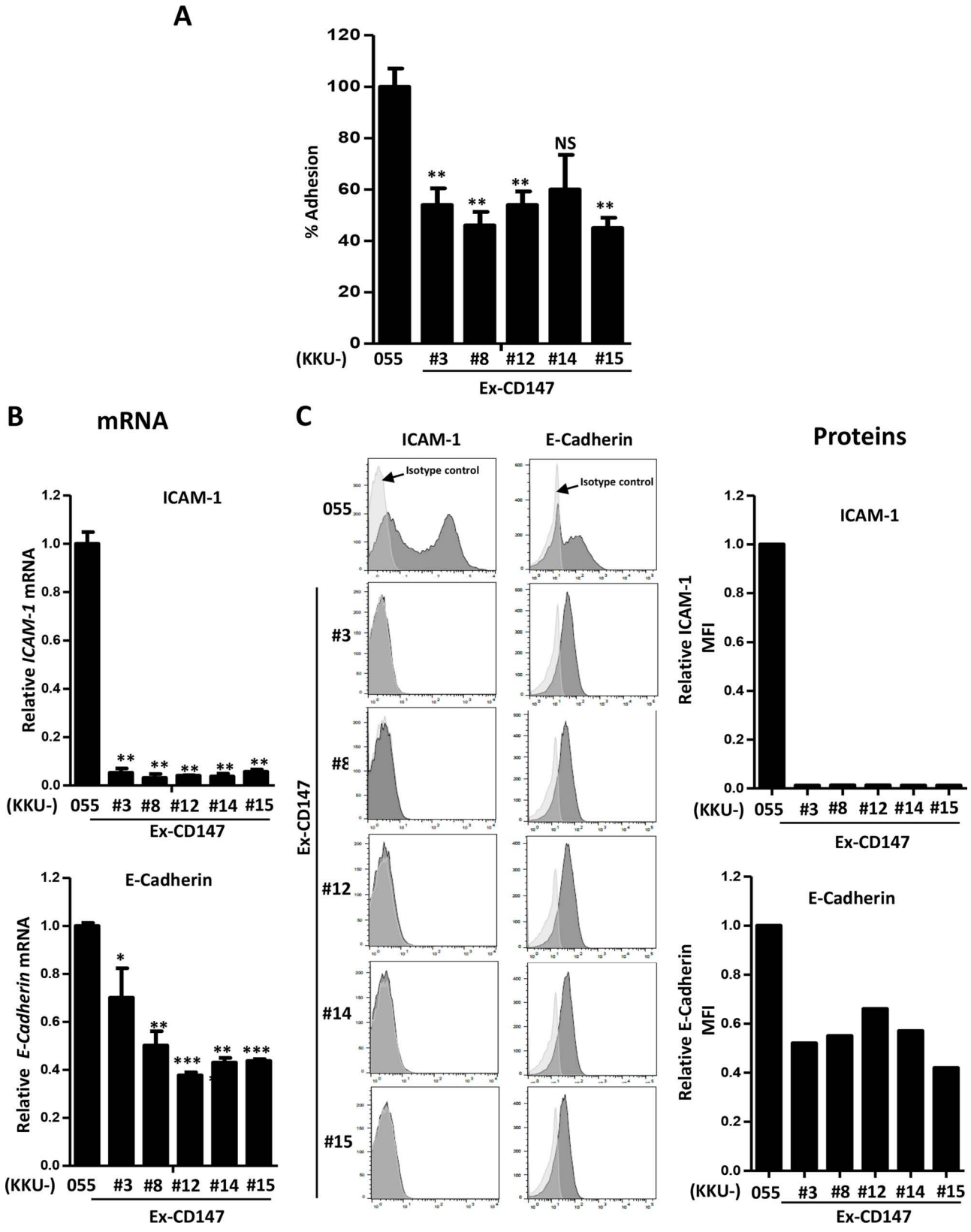
DISCUSSION

CD147, a multifunctional transmembrane glycoprotein, has been documented to promote tumor cell invasion in several cancers[26,27]. In the present study, the crucial role of CD147 in the promotion of cell invasion and tumor metastasis in CCA cells was first demonstrated in vitro and in vivo. The pronounced effect of CD147 on metastasis was clearly shown in the tail vein metastasis mouse model. Forced overexpression of CD147 in KKU-055 cells that were Ex-CD147 clones exhibited higher invasion and lower adhesion abilities than their parent CCA cells. The molecular mechanism was shown to be by the induction of MMP-2 activity and mesenchymal markers N-cadherin, vimentin, and Slug expressions, and suppression of ICAM-1, E-cadherin, and claudin-1. Moreover, suppression of CD147 in high CD147-expressing cell lines could significantly reduce the cell migration and invasion ability of CCA cells. These findings suggest CD147 as an interesting target for the treatment of highly metastatic cancers, such as CCA.

Metastasis is a major problem in cancer patients, leading to treatment failure and mortality. Several clinical and preclinical studies indicate the relationship between CD147 and the metastasis of cancer[13,28]. In the present study, five clones of CD147-overexpressing cells were generated from the parental KKU-055 cells that possessed a low CD147 expression. The association of CD147 with metastatic potential in CCA cells was clearly demonstrated in the tail vein-injected metastatic mouse model. All mice injected with each clone of CD147-overexpressing cells had liver colonization, whereas mice injected with low CD147-expressing parental cells had none. The enhancing effect of CD147 on the metastasis of CCA cells seems to be generalized for cancer cells, as similar observations were reported in head and neck cancer and hepatocellular carcinoma. Overexpression of CD147 in head and neck cancer cells promoted lung colonization in the tail vein injection mouse model[29]. In addition, CD147 overexpression of hepatocellular carcinoma cells promoted liver metastasis in the intrasplenic injection mouse model[30].

In 1889, Stephen Paget[31] suggested the "seed and soil" theory that some tumor cells (the "seed") metastasize to selected organs (the "soil") based on the preferential microenvironment suitable for the seed to implant. On the other hand, some tumor cells follow the circulatory route and implant in the first organ encountered (the anatomical/mechanical hypothesis). Accumulated information suggests the influence of the tumor–stromal interaction in organ-specific metastasis[32]. In the present study,

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.



Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

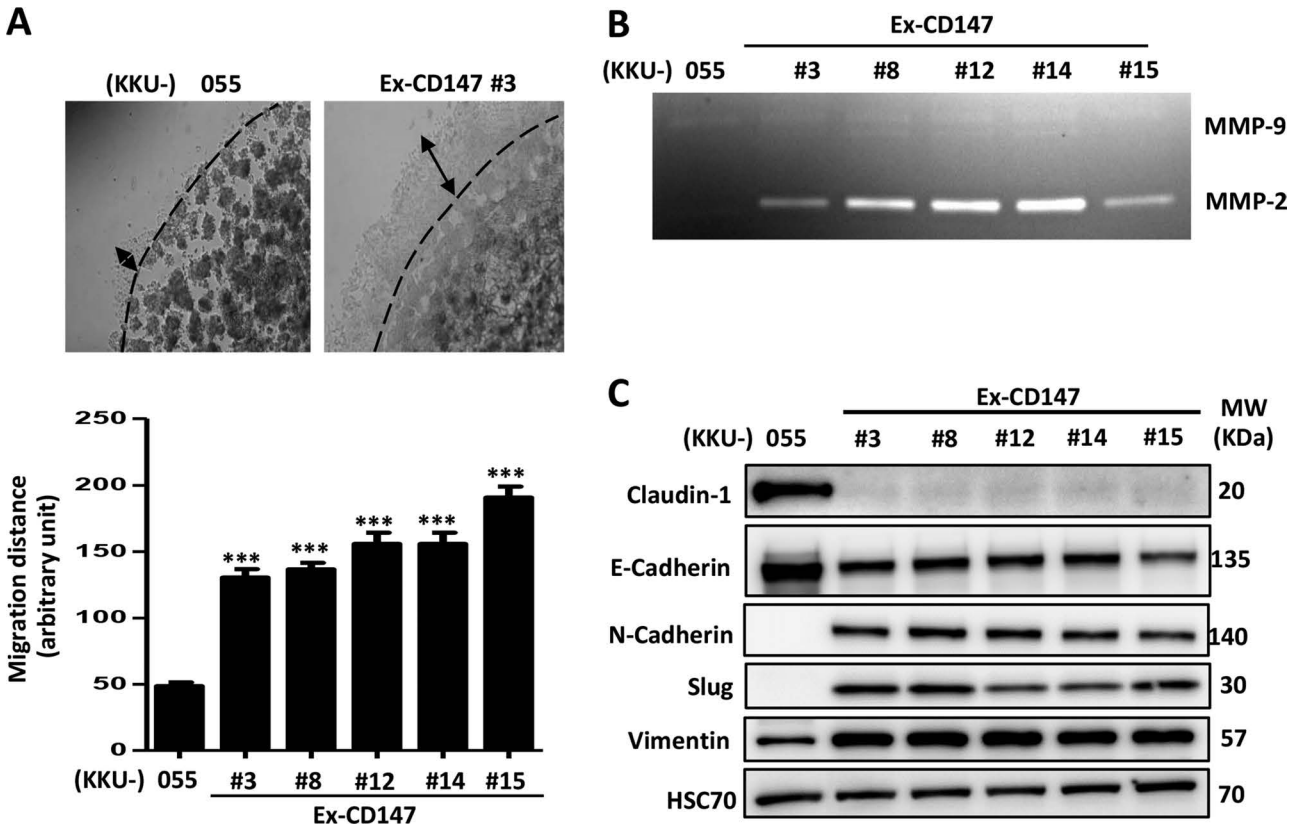


Figure 5. Overexpression of CD147 promotes invasion by stimulating matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and the epithelial-to-mesenchymal transition process in CCA cells. (A) Invasion ability of CCA cells was investigated using an evasion assay. The migration distances were quantitatively analyzed and compared. The results (mean±SEM) are the averages of three measurements from duplicate dots/sample. (B) Activities of MMPs were determined using a gelatin zymography assay. (C) Expression of epithelial markers (E-cadherin and claudin-1) and mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin, and Slug) was determined using Western blotting. HSC70 protein was used as a loading control. The data are one representative from two independent experiments. ***$p<0.001$.

CD147-overexpressing cells metastasized preferentially to the liver without lung colonization, whereas KKU-213, a highly metastatic CCA cell line, colonized mainly in the lungs with no liver metastasis in the tail vein-injected mouse model[18]. The liver preferential metastasis of CD147-overexpressing cells observed in this study may fit the "seed and soil" theory. The association of CD147 and the liver microenvironment that promotes the hepatotropic properties of CD147-overexpressing CCA cells is of interest and should be further elucidated.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a crucial step in cancer metastasis. Several molecules are involved in this process, such as adhesion molecules, MMP, and EMT regulatory proteins, etc. Loss of epithelial cell markers, such as E-cadherin, and gain of mesenchymal cell markers, such as vimentin and N-cadherin, are common features of EMT[33]. In the current study, overexpression of CD147 augmented the metastatic phenotypes of CCA cells. The morphological changes accompanying the enrichment of cytoplasmic F-actin microfilaments were observed in the CD147-overexpressing cells. Rearrangement of F-actin microfilaments, the elevation in mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin, and Slug), together with the decrease in ICAM-1 and E-cadherin on the cell surface may be

FACING PAGE

Figure 4. Overexpression of CD147 suppresses adhesion ability and expression of adhesion molecules in CCA cells. (A) Adhesion ability of CD147-overexpressing cells was compared with that of KKU-055. The data are mean±SEM from one of two independent experiments. (B) Expression of ICAM-1 and E-cadherin was determined using real-time RT-PCR. The data are mean±SEM from one of two independent experiments. (C) Expression of ICAM-1 and E-cadherin proteins was determined using flow cytometry. Histograms and mean fluorescent intensities of ICAM-1 and E-cadherin were compared. The data are one representative from two independent experiments. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

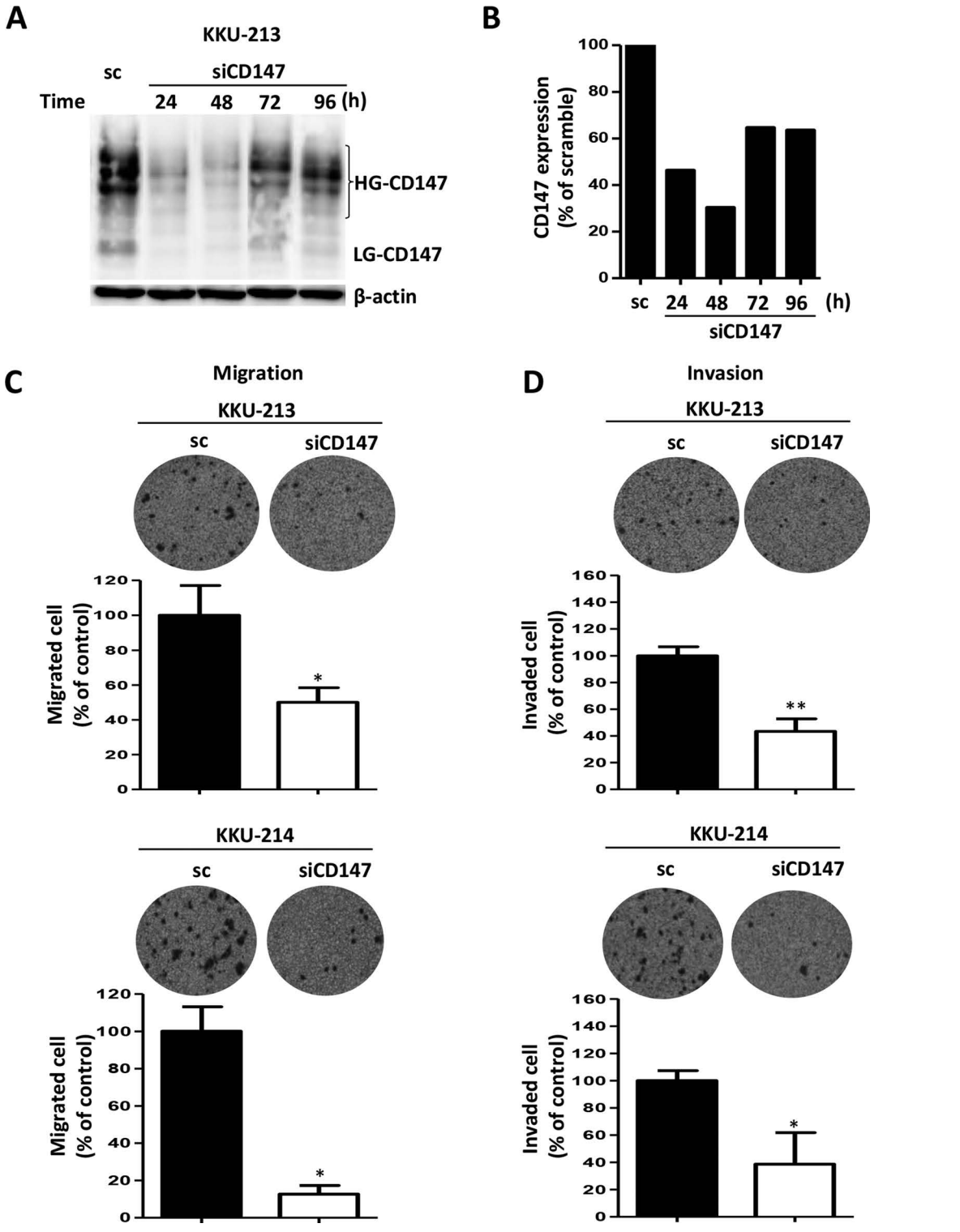


Figure 6. Suppression of CD147 expression in high CD147-expressing cell lines significantly inhibited cell migration and cell invasion. (A) siCD147 effectively suppressed CD147 expression of a high CD147-expressing cell, KKU-213, from 24 to 96 h. Expression levels of CD147 were determined using Western blot analysis. β-Actin was used as the loading control, and the nonspecific siRNA [scramble (sc)] was used as a negative control. (B) Quantitative analysis of CD147 expressions shown in (A). Cells were treated with siCD147 for 24 h and subjected to (C) migration and (D) invasion assay using the Boyden chamber. The data are mean ± SD of two independent experiments. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

responsible for the increase in cell motility, low adhesion, and high invasion ability of these CD147-overexpressing cells. It should be noted here that the influence of CD147 on the downstream target proteins is not proportional to the level of CD147 expression. In this study, the five clones of CD147-overexpressing cells exhibited similar invasive and adhesion abilities with comparable levels of EMT and MMP-2 activity, regardless of their CD147 expression levels. This phenomenon implies either that the lowest level of CD147 in the CD147-overexpressing cells (Ex-CD147 #3) is sufficient to activate the metastatic phenotypes of CCA cells or that the observed effects are not directly regulated by CD147. Extended experiments are needed to explore this further.

CD147 is identified as an inducer of MMP expression. Several MMPs, including MMP-1, -2, -3, -9, -11, and -14, are induced by CD147[34]. In the present study, overexpression of CD147 dramatically stimulated MMP-2 expression in CCA cells. Degradation of extracellular matrices by MMPs facilitates cancer invasion and metastasis[35,36]. Modulation of MMP expression by CD147 was well documented in a number of cancer cell types. Several preclinical studies have demonstrated the association of CD147 with tumor growth, invasion, and metastasis in many types of cancer cells in vitro and in vivo[29,37–39]. Silencing of CD147 expression reduced invasive ability and metastasis[26,27,40], whereas overexpression of CD147 enhanced invasiveness and metastasis of cancer cells[29].

Overexpression of CD147 together with a decrease in claudin-1 expression was first shown in this study. Claudin-1 is an integral membrane-tight junction protein in the claudin family. The role of claudin-1 in cancers is still controversial. Overexpression of claudin-1 was shown to enhance the invasion and metastasis in colon cancer, whereas depletion of claudin-1 was associated with the increase in cell invasion in lung and liver cancers[41,42]. In the present study, claudin-1 was prominent in parental cells with low CD147 expression but was almost suppressed in CD147-overexpressing cells. The underlying mechanism by which CD147 mediates the expression of claudin-1 and EMT should be further elucidated.

The collective data from CD147-overexpressing cells indicate the important role of CD147 in enhancing metastatic phenotypes of CCA cells and suggest CD147 as a target for mediating CCA metastasis. This possibility was revealed by the siCD147 experiments. Suppression of CD147 expression in the CCA cells with high CD147 expression effectively reduced the migration and invasion capabilities of these CCA cells. This observation was in agreement with reports in gastric and liver cancer cells[28,43].

In conclusion, the present study demonstrated, for the first time, the promoting effect of CD147 on cell invasion and metastasis of CCA cells in vitro and in vivo. The molecular mechanisms by which CD147 modulated cell invasion and metastasis were shown to enhance mesenchymal characteristics together with the increase

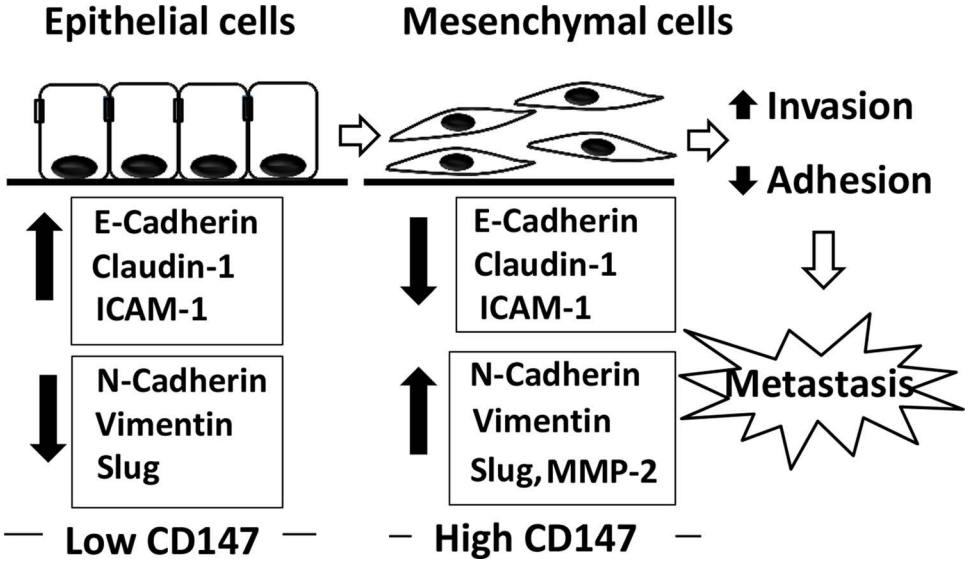


Figure 7. CD147 and the underlying mechanisms in promoting metastasis of CCA. Low CD147-expressing cells exhibit the epithelial phenotype with a high expression of adhesion molecules and epithelial markers (E-cadherin, claudin-1, and ICAM-1) and low expression of mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin, and Slug). On the other hand, overexpression of CD147 mediates the development of mesenchymal phenotypes by suppression of adhesion molecules and epithelial markers and overexpression of mesenchymal markers. Moreover, overexpression of CD147 promotes MMP-2 activity. Altogether, overexpression of CD147 promotes metastasis of CCA cells.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

in MMP-2 activity and decrease in adhesion molecule expressions (Fig. 7). These findings suggested CD147 as a promising target for cancer treatment, particularly for the highly metastatic CCA.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was cosupported by Grants-in-Aid for Science Research (No. 16K08742) from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan, the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham (RTA5780012), the National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS (NRU582010), Khon Kaen University (570601), Faculty of Medicine (I56326), and the Royal Golden Jubilee–PhD Program for P. Dana and S. Wongkham (PHD/0192/2552) cofunding with Khon Kaen University. We thank Mrs. I. Suzu for her technical assistance and Mrs. Yoshie Kanagawa and Ms. Y. Endo for their secretarial work; Professor James A. Will for editing the manuscript via the Faculty of Medicine Publication Clinic, KKU; and Professor Didier Trono for providing the lentiviral packaging vectors pMD2.G and pCMVR8.

REFERENCES

1. Patel T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. BMC Cancer 2002;2:10.
2. Sonakul D, Koompirochana C, Chinda K, Stitnimakarn T. Hepatic carcinoma with opisthorchiasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1978;9:215–9.
3. Obchoei S, Weakley SM, Wongkham S, Wongkham C, Sawanyawisuth K, Yao Q, Chen C. Cyclophilin A enhances cell proliferation and tumor growth of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Mol Cancer 2011;10:102.
4. Sawanyawisuth K, Wongkham C, Pairojkul C, Saeseow OT, Riggins GJ, Araki N, Wongkham S. Methionine aminopeptidase 2 over-expressed in cholangiocarcinoma: Potential for drug target. Acta Oncol. 2007;46:378–85.
5. Obchoei S, Sawanyawisuth K, Wongkham C, Kasinrerk W, Yao Q, Chen C, Wongkham S. Secreted cyclophilin A mediates G1/S phase transition of cholangiocarcinoma cells via CD147/ERK1/2 pathway. Tumour Biol. 2014;36:849–59.
6. Fossum S, Mallett S, Barclay AN. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. Eur J Immunol. 1991;21:671–9.
7. Kasinrerk W, Fiebiger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. J Immunol. 1992;149:847–54.
8. Koch C, Staffler G, Huttinger R, Hilgert I, Prager E, Cerny J, Steinlein P, Majdic O, Horejsi V, Stockinger H. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. Int Immunol. 1999;11:777–86.
9. Portik-Dobos V, Anstadt MP, Hutchinson J, Bannan M, Ergul A. Evidence for a matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes. Diabetes 2002;51:3063–8.
10. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. Cancer Res. 1995;55:434–9.
11. Zhang C, Tu Z, Du S, Wang Y, Wang Q. Expression of matrix metalloproteinase 2 and extracellular matrix metalloproteinase inducer are unfavorable postoperative prognostic factors in intrahepatic cholangiocarcinoma. Pathol Oncol Res. 2010;16:47–53.
12. Han ZD, Bi XC, Qin WJ, He HC, Dai QS, Zou J, Ye YK, Liang YX, Zeng GH, Chen ZN, Zhong WD. CD147 expression indicates unfavourable prognosis in prostate cancer. Pathol Oncol Res. 2009;15:369–74.
13. Zhu S, Chu D, Zhang Y, Wang X, Gong L, Han X, Yao L, Lan M, Li Y, Zhang W. EMMPRIN/CD147 expression is associated with disease-free survival of patients with colorectal cancer. Med Oncol. 2013;30:369.
14. Sawanyawisuth K, Wongkham C, Araki N, Zhao Q, Riggins GJ, Wongkham S. Serial analysis of gene expression reveals promising therapeutic targets for liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(Suppl):89–93.
15. Sripa B, Leungwattanawanit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, Sripa C, Miwa M. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). World J Gastroenterol. 2005;11:3392–7.
16. Larbret F, Dubois N, Brau F, Guillemot E, Mahiddine K, Tartare-Deckert S, Verhasselt V, Deckert M. Technical advance: Actin CytoFRET, a novel FRET flow cytometry method for detection of actin dynamics in resting and activated T cell. J Leukoc Biol. 2013;94:531–9.
17. Sribenja S, Sawanyawisuth K, Kraiklang R, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Obchoei S, Yao Q, Wongkham S, Chen C. Suppression of thymosin beta10 increases cell migration and metastasis of cholangiocarcinoma. BMC Cancer 2013;13:430.
18. Uthaisar K, Vaeteewoottacharn K, Seubwai W, Talabnin C, Sawanyawisuth K, Obchoei S, Kraiklang R, Okada S, Wongkham S. Establishment and characterization of a novel human cholangiocarcinoma cell line with high metastatic activity. Oncol Rep. 2016;36:1435–46.
19. Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H, Suzu S, Okada S. Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into BALB/c and C57BL/6 strain of rag-2/jak3 double-deficient mice. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:539748.
20. Srikoon P, Kariya R, Kudo E, Goto H, Vaeteewoottacharn K, Taura M, Wongkham S, Okada S. Diethyldithiocarbamate suppresses an NF-kappaB dependent metastatic pathway in cholangiocarcinoma cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14:4441–6.
21. Uthaisar K, Seubwai W, Srikoon P, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, Okada S, Wongkham S. Cepharanthine suppresses metastatic potential of human cholangiocarcinoma cell lines. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(Suppl):149–54.
22. Segatto I, Berton S, Sonego M, Massarut S, Fabris L, Armenia J, Mileto M, Colombatti A, Vecchione A, Baldassarre G, Belletti B. p70S6 kinase mediates breast cancer cell survival in response to surgical wound fluid stimulation. Mol Oncol. 2014;8:766–80.
23. Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). Cancer Res. 1995;55:2548–55.
24. Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Matsuda K, Taura M, Wongkham C, Wongkham S, Okada S. Perturbation of proteasome function by bortezomib leading to ER stress-induced apoptotic cell death in cholangiocarcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139:1551–62.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

25. Phoomak C, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, Seubwai W, Wongkham C, Silsirivanit A, Wongkham S. Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kappaB. Sci Rep. 2016;6:27853.
26. Pan Y, He B, Song G, Bao Q, Tang Z, Tian F, Wang S. CD147 silencing via RNA interference reduces tumor cell invasion, metastasis and increases chemosensitivity in pancreatic cancer cells. Oncol Rep. 2012;27:2003–9.
27. Xu HY, Qian AR, Shang P, Xu J, Kong LM, Bian HJ, Chen ZN. siRNA targeted against HAb18G/CD147 inhibits MMP-2 secretion, actin and FAK expression in hepatocellular carcinoma cell line via ERK1/2 pathway. Cancer Lett. 2007;247:336–44.
28. Xu J, Xu HY, Zhang Q, Song F, Jiang JL, Yang XM, Mi L, Wen N, Tian R, Wang L, Yao H, Feng Q, Zhang Y, Xing JL, Zhu P, Chen ZN. HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. Mol Cancer Res. 2007;5:605–14.
29. Huang Z, Tan N, Guo W, Wang L, Li H, Zhang T, Liu X, Xu Q, Li J, Guo Z. Overexpression of EMMPRIN isoform 2 is associated with head and neck cancer metastasis. PLoS One 2014;9:e91596.
30. Wu J, Ru NY, Zhang Y, Li Y, Wei D, Ren Z, Huang XF, Chen ZN, Bian H. HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF-beta signaling and is transcriptionally regulated by Slug. Oncogene 2011;30: 4410–27.
31. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet 1889;133:571–3.
32. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. Int J Cancer 2011;128:2527–35.
33. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119:1420–8.
34. Biswas C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 1982; 109:1026–34.
35. Quemener C, Gabison EE, Naimi B, Lescaille G, Bougatef F, Podgorniak MP, Labarchede G, Lebbe C, Calvo F, Menashi S, Mourah S. Extracellular matrix metalloproteinase inducer upregulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. Cancer Res. 2007;67: 9–15.
36. Tang Y, Nakada MT, Rafferty P, Laraio J, McCabe FL, Millar H, Cunningham M, Snyder LA, Bugelski P, Yan L. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway. Mol Cancer Res. 2006;4:371–7.
37. Chen X, Lin J, Kanekura T, Su J, Lin W, Xie H, Wu Y, Li J, Chen M, Chang J. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. Cancer Res. 2006; 66:11323–30.
38. Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M. Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. Pathol Int. 2006;56:359–67.
39. Sweeny L, Liu Z, Bush BD, Hartman Y, Zhou T, Rosenthal EL. CD147 and AGR2 expression promote cellular proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Exp Cell Res. 2012;318:1788–98.
40. Qian AR, Zhang W, Cao JP, Yang PF, Gao X, Wang Z, Xu HY, Weng YY, Shang P. Downregulation of CD147 expression alters cytoskeleton architecture and inhibits gelatinase production and SAPK pathway in human hepatocellular carcinoma cells. J Exp Clin Cancer Res. 2008;27:50.
41. Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW, Tsai MS, Chang GC, Wu CH, Wu YY, Lee YC, Hong TM, Yang PC. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. Am J Respir Crit Care Med. 2009;179:123–33.
42. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H. Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. J Surg Res. 2007;139:68–76.
43. Wang B, Xu YF, He BS, Pan YQ, Zhang LR, Zhu C, Qu LL, Wang SK. RNAi-mediated silencing of CD147 inhibits tumor cell proliferation, invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in SGC7901 cells in vitro. J Exp Clin Cancer Res. 2010;29:61.

Delivered by Ingenta to: Khon Kaen University
IP: 202.28.119.238 On: Wed, 06 Sep 2017 05:00:26
Article(s) and/or figure(s) cannot be used for resale. Please use proper citation format when citing this article including the DOI, publisher reference, volume number and page location.

ANTICANCER RESEARCH *36*: 5965-5974 (2016)
doi:10.21873/anticanres.11184

Novel Synthetic Mono-triazole Glycosides Induce G_0/G_1 Cell-cycle Arrest and Apoptosis in Cholangiocarcinoma Cells

SUMALEE OBCHOEI[1], RUNGNAPHA SAEENG[2], CHAISIRI WONGKHAM[1] and SOPIT WONGKHAM[1]

[1]*Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand;*
[2]*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand*

Abstract. *Background/Aim: The treatment of cholangiocarcinoma (CCA) is still ineffective and the search for a novel treatment is needed. In this study, eight novel mono-triazole glycosides (W1-W8) were synthesized and tested for their anticancer activities in CCA cell lines. Materials and Methods: The anti-proliferation effect and the underlying mechanisms of the triazole glycosides were explored. Viable cells were determined using the MTT test. Results: Among glycosides tested, W4 and W5 exhibited the most potent anticancer activity in a dose- and time-dependent fashion. Flow cytometry and wstern blot analysis revealed that W4 and W5 induced G_0/G_1 phase cell-cycle arrest through down-regulation of cyclin D1, cyclin E and induction of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27 and p21 protein expression. Annexin V/propidium iodide (PI) staining demonstrated that W4 and W5 also induced apoptotic cells in a dose-dependent manner via caspase signaling cascade. Conclusion: Together, these findings imply that the novel synthetic glycosides might be a promising anticancer agent for CCA.*

Although there has been progress in the development of prevention and treatment of cancer, the successful treatment of cholangiocarcinoma (CCA) remains a challenge. Therefore, there is still an urgent need to search for some new and effective anticancer agents that have a broader spectrum of cytotoxicity to tumor cells.

Triazole compounds containing three nitrogen atoms in the five-membered aromatic azole ring are readily able to bind with a variety of enzymes and receptors in biological systems *via* diverse non-covalent interactions and, thus, display versatile biological activities (1). The 1,2,3-triazole moiety has been a fruitful source of inspiration for medicinal chemists for many years. Their diverse inhibitory activities, including anti-fungal (2, 3), anti-bacterial (4, 5), anti-allergic (6), anti-inflammatory and others (7-9) are partially due to their synthetic accessibility by click chemistry. Besides existing compounds, triazoles can act as an important tool for medicinal chemists to develop newer compounds possessing the triazole moiety that could be better agents in terms of efficacy and safety. Molecular hybridization, which covalently combines two or more drug pharmacophores into a single molecule, is an effective tool to design highly active novel entities (10, 11). In addition, the hybrids may also minimize the unwanted side-effects and allow for synergistic action (12).

On the other hand, glycosides have existed extensively in the animals and plants and taken on important biological functions. Significant anti-bacterial and anticancer activities of glycosides have attracted many scientists to attempt to improve the biological activity of these compounds by glycosylation in order to increase their solubility in water and guidance qualities (13).

To combine the advantages of these two pharmacophores, 1,2,3-triazole and glycosides on the anti-tumor activity in CCA cells is challenging. In the present study, eight novel mono-triazole glycosides were developed using the O-glycosylation-click reactions resulting in high to excellent yields. The anticancer activities of these novel mono-triazole glycosides were investigated in CCA cell lines and the underlying cellular mechanisms were explored. These findings raise the possibility of using these triazole glycosides as candidate treatments for CCA.

Materials and Methods

Mono-triazole glycoside synthesis. 2,3-Unsaturated-glycosyl triazoles were synthesized in a simple one-pot process under mild conditions *via* tandem O-glycosylation using an iodine promoter and

Correspondence to: Sopit Wongkham, Ph.D., Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel/Fax: +66 43348386, e-mail: sopit@kku.ac.th

Key Words: Glycoside, cholangiocarcinoma, cell growth, G_0/G_1 arrest, cell apoptosis.

a mild copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction as previously described (14). Eight mono-triazole-glycoside candidates with distinct molecular structures were randomly selected for testing anti-tumor efficacy in CCA cell lines.

Cell lines, culture technique and treatments. KKU-055, KKU-100, KKU-213 and KKU-214 cell lines, established from primary tumors of CCA patients (15), were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, Osaka, Japan. The cell lines were maintained in HAM's F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics/antimycotics, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37˚C.

Antibodies and reagents. Antibodies against cyclin D1, cyclin E, p21, p27 and poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (1:1,000; Santa Cruz, CA, USA). Caspase-3 and caspase-9 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (1:2,000; Beverly, MA, USA) and the β-actin antibody was from Sigma-Aldrich (1:40,000; St. Louis, MO, USA). MTT reagent and propidium iodide (PI) solutions were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). The Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit was from eBioscience (San Diego, CA, USA).

Cell viability assay. Cells (5×10^3 cells/well), in a 96-well plate, were treated with various concentrations of mono-triazole glycosides. After 24 or 48 h of incubation, cell viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells incubated with 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as controls. DMSO was added to resolve the formazan complex and the absorbance at 540 nm was recorded. The cytotoxicity of each glycoside was analyzed as relative viable cells compared to the vehicle control.

Cell cycle analysis. After treatment, cells were collected, washed with PBS and fixed in 70% cold ethanol for 1 h. Cells were then stained with 10 μg/ml of PI for a few minutes and placed on ice until analysis. The analysis was performed on a BD FACSCanto II flow cytometer. The numbers of dead and live cells, as well as the numbers of cells distributed in G_0/G_1, S and G_2/M phases, were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Cell apoptosis was confirmed by annexin V staining. Cells were treated with vehicle or W4 or W5 for 48 h. After treatment, cells were washed and re-suspended in the staining buffer containing 1 μg/ml PI and 0.025 μg/ml annexin V-FITC at room temperature for 15 min in the dark. The stained cells were immediately determined using FACScanto II and analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Western blotting. Protein (20 μg) was subjected to a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond™-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The membrane was then blocked with 3% BSA for 1 h at room temperature or overnight at 4˚C, probed for 1 h at room temperature with each primary antibody and 1:20,000 horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody. The immunoactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence prime Western blotting detection reagent kit (ECL; GE Healthcare). The same membrane was stripped-off and incubated with β-actin antibody as the loading control.

Table I. *The half-maximal inhibitory concentrations of W4 and W5 on CCA cells at 48 h.*

Cell line	IC_{50} at 48 h (μM, MTT assay)	
	W4	W5
KKU-055	74.1	69.5
KKU-100	89.8	76.0
KKU-213	69.2	59.1
KKU-214	89.1	86.3

Statistical analysis. Results are shown as mean±SEM or mean±SD. The significant difference between mean values of the treated and untreated groups was determined by two-tailed Student *t*-tests. Statistical significance was established at $p<0.05$.

Results

W4 and W5 mono-triazole glycosides significantly reduced viability of CCA cells. The anti-proliferative effects of mono-triazole glycoside candidates (W1-W8, Figure 1A) were screened in the KKU-M213 cell line using the MTT assay. Cells were incubated with each candidate at 50, 100 and 200 μM for 24 h. As shown in Figure 1B, W4 and W5 exhibited the most potent anti-proliferative effects compared to other candidates. These two glycosides were selected for the subsequent experiments. The anti-proliferative effects of W4 and W5 were demonstrated in 4 different CCA cell lines, KKU-055, KKU-100, KKU-M213 and KKU-M214, in concentration- (Figure 2A) and time- (Figure 2B) dependent manners. Treated CCA cells with W4 or W5 at 100 μM for 48 h could inhibit 70-90% of cell viability in all cell lines tested.

The half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of each cell line for W4 and W5 are shown in Table I. The 48-h IC_{50s} of W4 and W5 against CCA cells were KKU-M213 <KKU-055 <KKU-100 and KKU-M214; however, there were no significant differences.

W4 and W5 glycosides induced G_0/G_1 cell-cycle arrest of CCA cells. To examine whether the growth inhibition induced by W4 and W5 glycosides was associated with regulation of the cell cycle, the cell-cycle distribution of CCA cells in the presence of W4 and W5 was analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 3Aa-b, treatments of KKU-100 cells with W4 or W5 at 25 and 50 μM for 48 h resulted in a significant accumulation of cells in the G_0/G_1 phase. At higher concentrations, 75 and 100 μM, the subG_1 population was greatly induced with reduced numbers of G_0/G_1 cells. A similar observation was obtained for KKU-

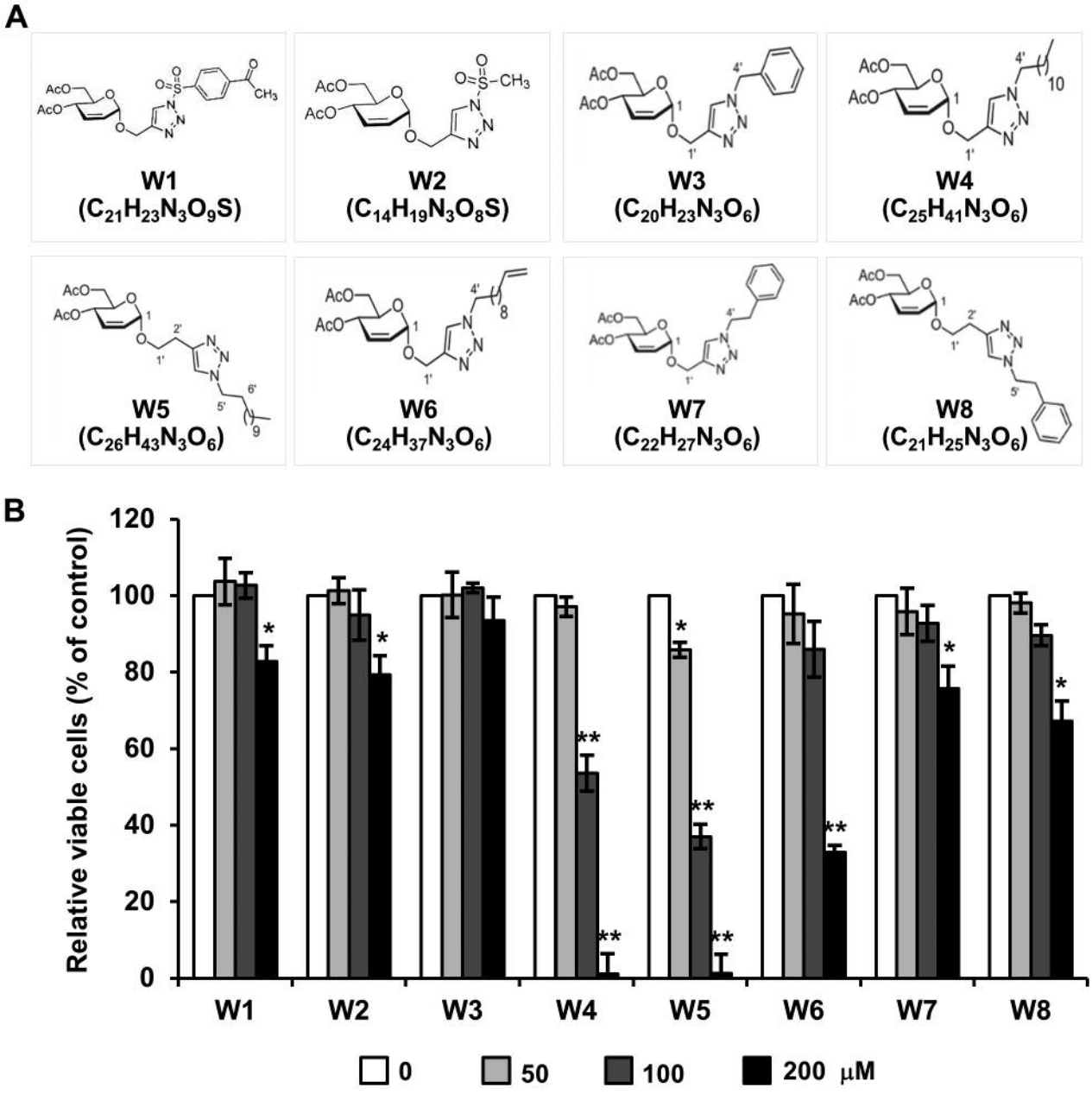


Figure 1. *Anti-proliferative effects of 8 mono-triazole glycosides. (A) Chemical structure of W1-W8. (B) KKU-M213 cells were treated with 50, 100 and 200 μM of W1-W8 glycosides for 24 h. The MTT assay was performed and the viable cells were calculated given the control as 100%. Data are expressed as the mean±SEM of triplicate assays of three independent experiments. *p<0.01, **p<0.001.*

213 cells treated with W4 and W5 (Figure 3Ac-d). Accumulations of G_0/G_1 populations were observed with 25 and 50 μM of both glycosides, while the subG_1 population was obviously increased at the 100 μM treatment.

The effects of W4 and W5 on the regulation of the cell cycle were further determined. Cell lysates of KKU-100 and KKU-213 cells treated with W4 and W5 at 50 and 75 μM for 48 h were analyzed for G_1 phase regulatory proteins, including cyclin D1, cyclin E, p21 and p27 using Western blot analysis. As shown in Figure 3B, W4 and W5 glycosides markedly down-regulated the protein levels of cyclin D1 and cyclin E but up-regulated the expressions of cell cycle inhibitors, p21 and p27, in a concentration-dependent manner in both cell lines.

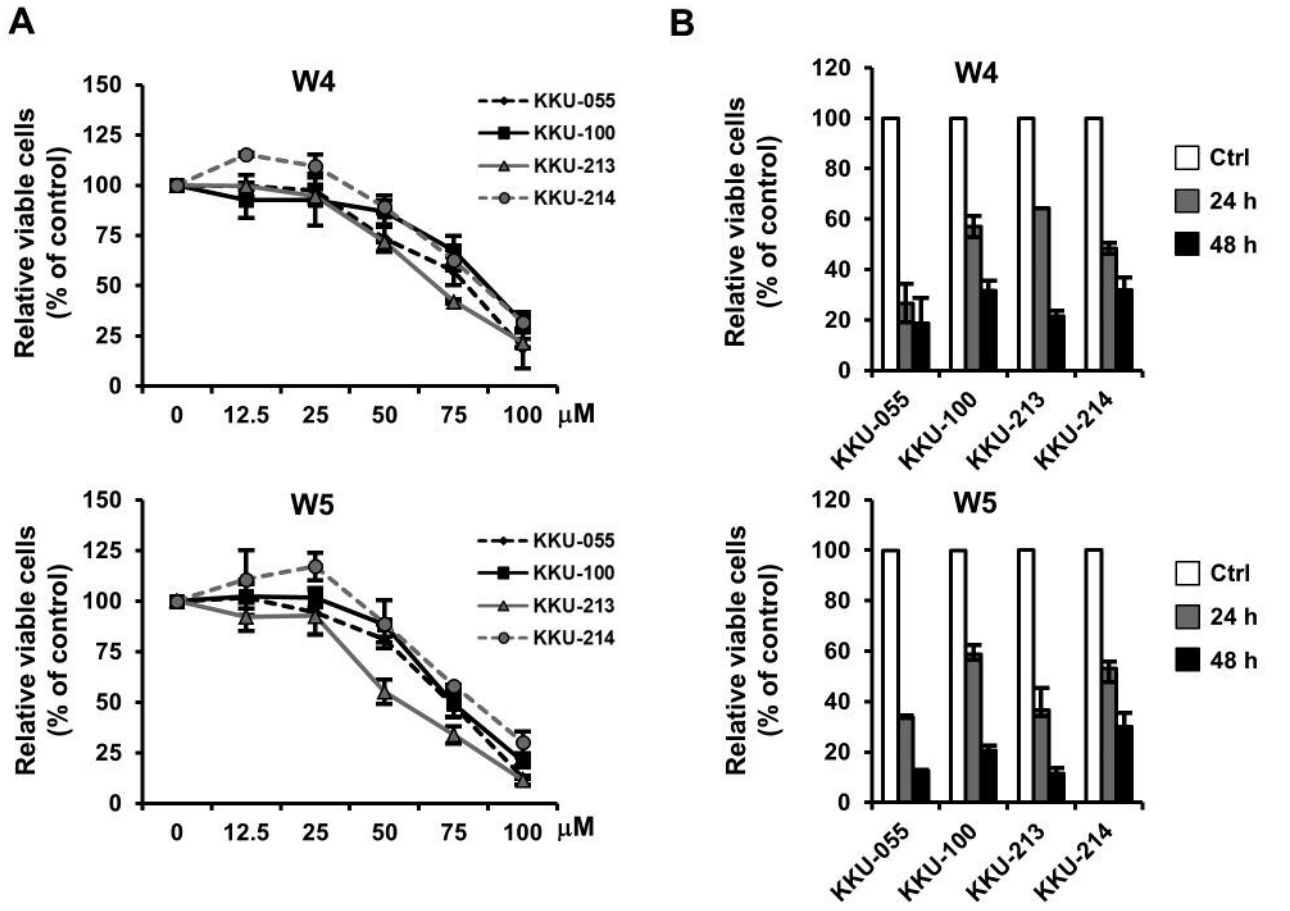


Figure 2. *Growth inhibitory effect of W4 and W5 glycosides on CCA cells. Four CCA cell lines, KKU-055, KKU-100, KKU-213 and KKU-214 were: (A) incubated in the presence of various concentrations of W4 or W5 for 48 h; (B) incubated in the presence of 100 μM W4 or W5 for 24 and 48 h. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls. The viable cells were determined using the MTT assay. Data are expressed as mean±SEM of triplicate assays of two independent experiments.*

W4 and W5 induced cellular apoptosis of CCA cells. The capability of W4 and W5 glycosides on cell apoptosis was investigated next. Annexin V/PI double-labeling was used for the detection of phosphatidylserine externalization, a hallmark of apoptosis. As shown in Figure 4A, cells treated with W4 or W5 at 50 and 75 μM could induce apoptotic cells in both cell lines in a dose-dependent manner. The average proportions of apoptotic cells were significantly increased to approximately 45% in W4 and W5-treated KKU-100 cells (Figure 4Aa-b). Similar results were observed in KKU-213 cells with approximately 65% apoptotic cells induced when cells were treated with 75 μM of W4 or W5 (Figure 4Ac-d).

In order to investigate the mechanism by which W4 and W5 induces apoptosis, the apoptosis-related proteins were examined in KKU-100 and KKU-213 cells treated with 50 and 75 μM of W4 and W5 for 48 h. The western blot analysis showed that W4 and W5 activated proteolytic cleavage of inactive pro-caspase-3 and -9 into active caspase-3 and -9 and induced cleaved PARP-1 protein expression in a concentration-dependent manner (Figure 4B).

Discussion

CCA is a cancer that is highly resistant to various anticancer drugs and, thereby, leads to poor prognosis (16-18). At present, there is no curative medical therapy recommended for CCA. The most studied chemotherapeutic drugs are 5-FU and gemcitabine that have been tested in combinations with a variety of anticancer drugs (19), some of which are highly toxic to normal tissues (20-23). A strategy to diminish the toxic effects of the chemotherapeutic agents is the co-treatment of the chemotherapeutic agents with anti-proliferation remedies. Numerous studies have shown that

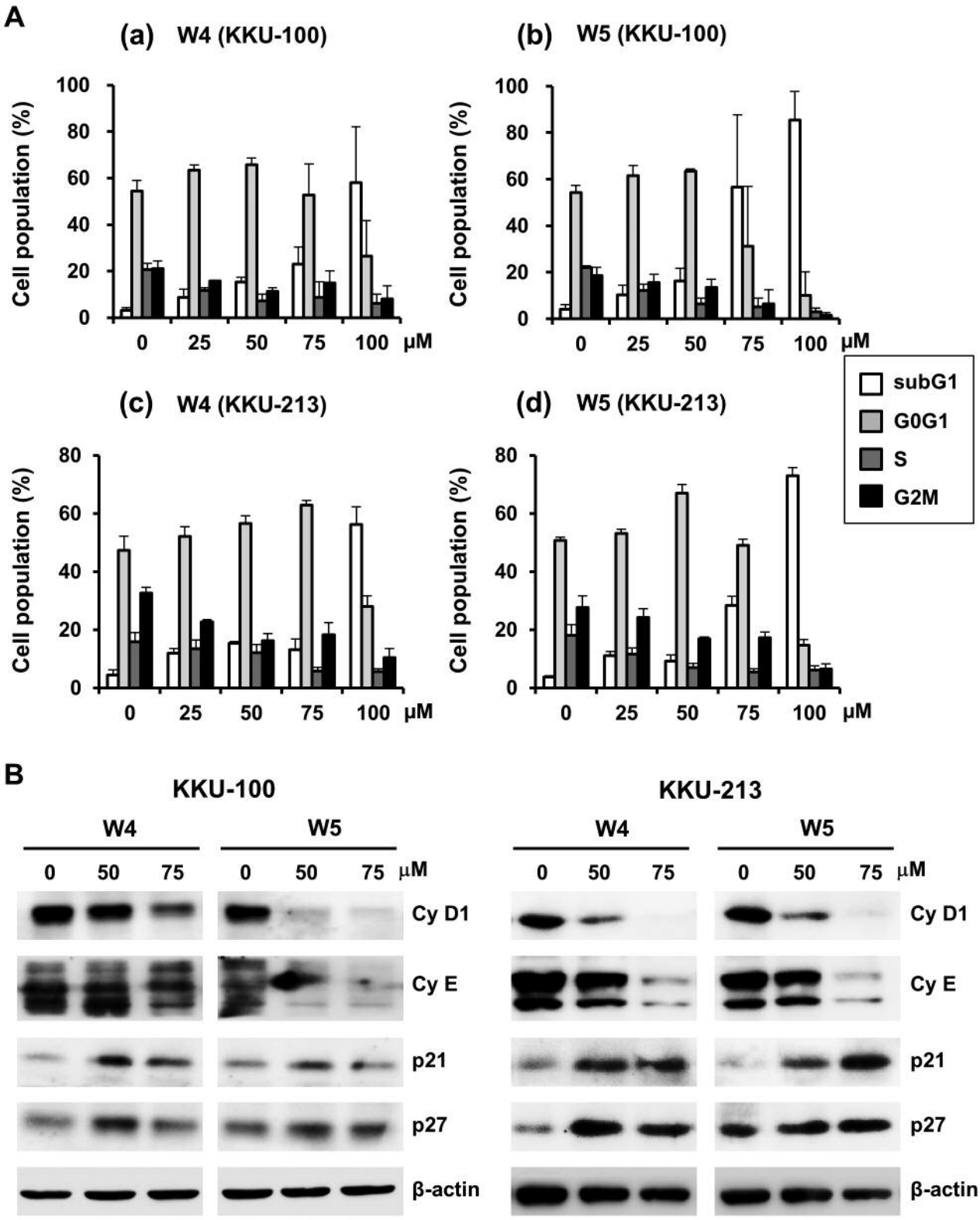


Figure 3. *Effect of W4 and W5 on cell cycle distribution and cell cycle regulatory proteins. (A) CCA cells, KKU-100 (a, b) and KKU-213 (c, d) were treated with 25, 50 and 100 μM of W4 or W5 for 48 h. Cycle distribution was analyzed using flow cytometry. (B) CCA cells were treated with 50 and 75 μM of W4 or W5 for 48 and the expression of cell cycle regulatory proteins were determined using Western blotting. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls. Data are one representative of 2 independent experiments.*

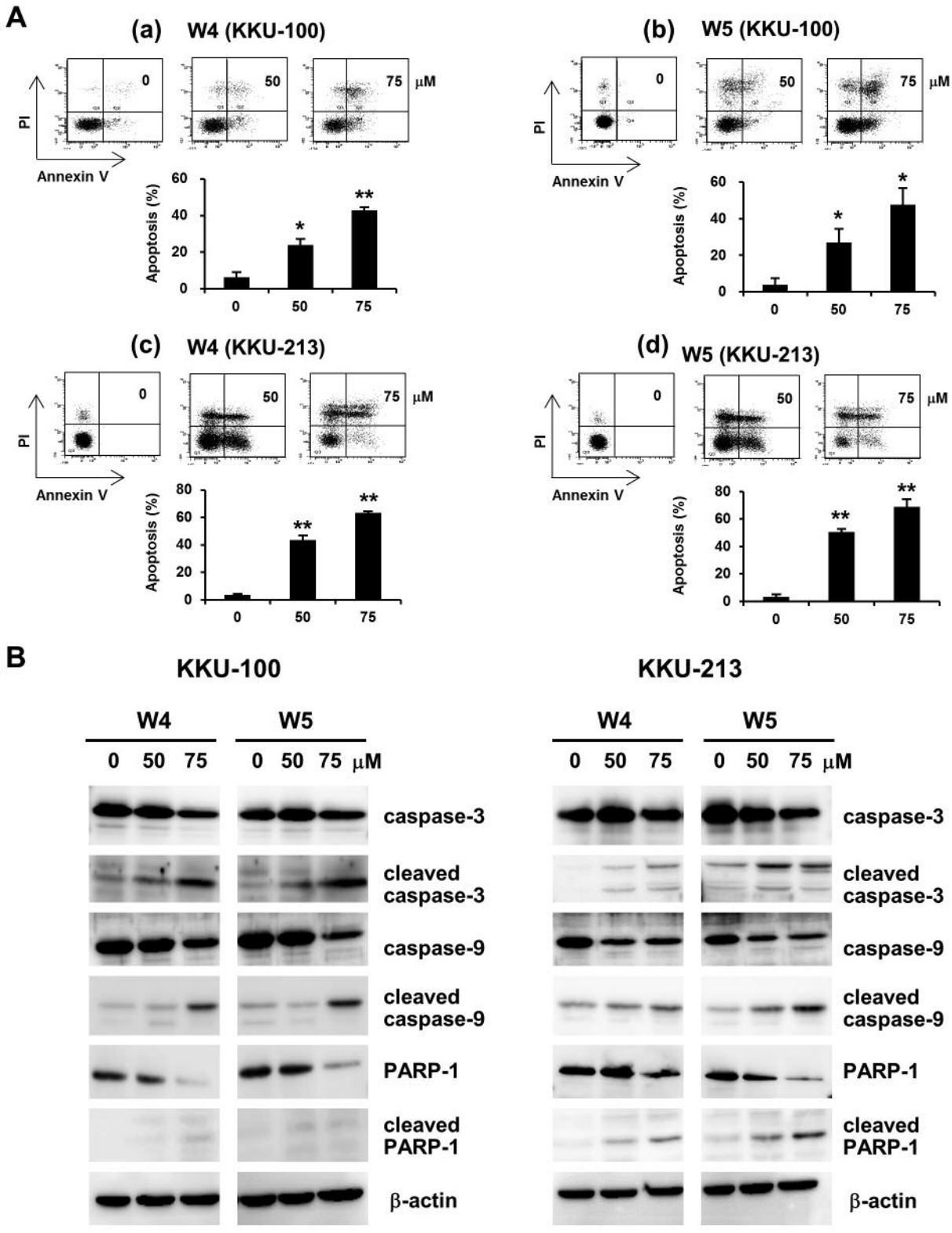


Figure 4. *W4 and W5 induced cellular apoptosis. (A) CCA cells were treated with or without 50 and 75 μM of W4 or W5 for 48 h and apoptotic cells were determined using flow cytometry with annexin V/PI staining. The quantitative analyses of apoptotic cells are shown in bar graphs. Data are expressed as mean±SD of 3 independent experiments. (B) The expressions of apoptosis-associated proteins, total and cleaved forms of caspase-3, caspase-9 and PARP-1, were determined using western blot. Data are one representative from two independent experiments. * p<0.01, **p<0.001.*

naturally-occurring glycosides and their synthetic derivatives may serve as lead candidates in the development of cancer treatment, either as a single agent or in combination with the existing chemotherapeutic drugs (24-26).

In the current study, 8 novel-triazole glycosides were synthesized and examined for anti-tumor activity against CCA cells. The glycosides exhibited differential anti-proliferative activity on CCA cells, from mild to strong. The glycosides synthesized from long-chain aliphatic azides, W4, W5 and W6, effectively inhibited cell proliferation of CCA cells. On the other hand, the glycosides synthesized from phenyl ethyl azide (W7 and W8), benzyl azide (W3) and sulfonyl azide (W1, W2) showed only weak to no anti-proliferative activity against CCA cells. Increasing the length of the carbon chain should alter the polarity and lipophilicity of the compounds, thus allowing these synthetic compounds to pass through the cell membrane by passive diffusion and may, as a result, affect their cytotoxic activity. The presence of a long-chain aliphatic compounds in the structure of palladium complexes has previously been reported to enhance the higher efficiency of DNA-binding that resulted in significantly enhancing the cytotoxic activity and the apoptotic activity on HL-60 cells (27). Up to the present search, this is the first report on the effect of 1,2,3-triazole glycoside on cancer cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis.

The results showed that W4 and W5, the glycosides synthesized from a long-chain aliphatic azide, effectively inhibited cell proliferation of CCA cells. These 2 best glycosides were selected for further investigations. The IC_{50} value of W4 against 4 CCA cell lines was 69.2-89.8 μM and of W5 was 59.1-86.3 μM. It seems to be common for the synthetic glycosides to exhibit anti-tumor efficacy at the micromolar range but the exact values are largely due to the type of glycosides and the type of cancer cell line studied. For instance, a series of solasodine glycosides were synthesized and the 3 most potent compounds in the series significantly inhibited cancer cell lines of breast (MCF-7), prostate (PC-3) and a chronic myelogenous leukemia (K562), with the IC_{50} values ranging from 7.2 to 18.8 μM (26). Paeoniflorin, a monoterpene glucoside, however, at a concentration of 200 μM could achieve only about 25% inhibition against hepatoma cell lines, HepG2 and Bel-7402 (28). In addition, the study of synthetic phenylethanoid glycosides on cell proliferation of PC-3 cells showed that 30 μM acteoside had 23%-30% inhibition, whereas echinacoside, calceolarioside-A and calceolarioside-B induced only 10-15% inhibition (29).

Cancer development is often due to perturbations in the cell cycle that leads to unlimited proliferation and confers apoptosis resistance (30). The progression of cells through the cell cycle is exerted by cyclin, cyclin-dependent kinases (CDKs) and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). CDK4/6-Cyclin D and CDK2-Cyclin E work in concert to relieve inhibition of a dynamic transcription complex of the retinoblastoma protein and E2 factor (E2F), whereas inhibition of the kinase activity of cyclin/CDK complex is mediated by several CKIs, including $p21^{waf1/cip1}$ and $p27^{kip1}$ (31). In the current study, treatment with 25 and 50 μM of W4 and W5 arrested CCA cells at the G_1 phase and was accompanied by decreased S phase cell populations. These observations were further confirmed by Western blot analyses of cell cycle regulatory proteins. As expected, the crucial G1 cyclins, cyclin D and cyclin E proteins, were markedly suppressed, while the levels of cell cycle inhibitors, p21 and p27, were strongly enhanced by the glycoside treatments.

Defective apoptosis represents a major causative factor in the development and progression of cancer. Indeed, the majority of chemotherapeutic agents act through the apoptotic pathway to induce cancer cell death. Moreover, resistance to chemotherapeutic strategies seems to be due to alterations in the apoptotic pathway of cancer cells (32). Flow cytometry analysis of annexin V/PI staining demonstrated that W4 and W5 induced CCA cell apoptosis in a dose-dependent manner. Caspases are a family of endo-proteases that provide critical links in cell regulatory networks controlling inflammation and cell death (33). Initiator caspases (-8 and -9) activate executioner caspases (-3, -6 and -7) that subsequently coordinate their activities to demolish key structural proteins and activate other enzymes contributing to apoptotic cell death. Another characteristic event of apoptosis is the proteolytic cleavage of PARP-1, a nuclear enzyme involved in DNA repair, DNA stability and transcriptional regulation (34). Treating CCA cells with W4 and W5 resulted in the activation of the caspase cascade as shown by an increase in the cleaved forms of caspase-3 and caspase-9 and, finally, facilitated the PARP-1 cleavage.

1,2,3-triazole-glycosides have been reported to possess an inhibitory effect on galectin-3 (35, 36), which was previously reported to be overexpressed in tumor tissues of CCA patients (37). Suppression of galectin-3 expression in CCA cell lines by siRNA enhanced apoptosis and sensitivity to chemotherapeutic drugs (38). In the present study, treatment of W4 and W5 effectively inhibited cell proliferation of CCA cells in a dose- and time-dependent fashion. These glycosides probably react with galectin-3 and enhanced apoptosis of CCA cells. This assumption, however, needs future investigation on the inhibition and binding of W4 and W5 on galectin-3. In addition, co-treatment of these glycosides and chemotherapeutic drugs in CCA cells should also be taken into consideration.

In conclusion, 8 novel mono-triazole glycosides were synthesized and evaluated for their anticancer activity against CCA cell lines. W4 and W5 exhibited the most potent anti-proliferative activity. These glycosides were further shown to inhibit the growth of CCA cells by arresting the cell cycle at G_1 phase, thus inducing apoptosis. Further studies on the

efficacy and safety in an animal model are needed to propose these compounds as candidates for a supplemental or alternative therapeutic approach of CCA.

Acknowledgements

This study was supported by the TRF Senior Research Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University to S. Wongkham (TRF5780012, KKU562601). S. Obchoei was the postdoctoral fellow supported by National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Health Cluster (SHeP-GMS-PD55210). We would like to acknowledge Prof. James A. Will, University of Wisconsin, for editing the manuscript *via* the Faculty of Medicine Publication Clinic, Khon Kaen University, Thailand.

References

1 Zhou CH and Wang Y: Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. Curr Med Chem *19*: 239-280, 2012.

2 Aher NG, Pore VS, Mishra NN, Kumar A, Shukla PK, Sharma A and Bhat MK: Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. Bioorg Med Chem Lett *19*: 759-763, 2009.

3 Yu S, Wang N, Chai X, Wang B, Cui H, Zhao Q, Zou Y, Sun Q, Meng Q and Wu Q: Synthesis and antifungal activity of the novel triazole derivatives containing 1,2,3-triazole fragment. Arch Pharm Res *36*: 1215-1222, 2013.

4 Demaray JA, Thuener JE, Dawson MN and Sucheck SJ: Synthesis of triazole-oxazolidinones *via* a one-pot reaction and evaluation of their antimicrobial activity. Bioorg Med Chem Lett *18*: 4868-4871, 2008.

5 Wang XL, Wan K and Zhou CH: Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. Eur J Med Chem *45*: 4631-4639, 2010.

6 Buckle DR, Outred DJ, Rockell CJ, Smith H and Spicer BA: Studies on v-triazoles. 7. Antiallergic 9-oxo-1H,9H-benzopyrano(2,3-d)-v-triazoles. J Med Chem *26*: 251-254, 1983.

7 De Simone R, Chini MG, Bruno I, Riccio R, Mueller D, Werz O and Bifulco G: Structure-based discovery of inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein: Promising hits for the development of new anti-inflammatory agents. J Med Chem *54*: 1565-1575, 2011.

8 Giffin MJ, Heaslet H, Brik A, Lin YC, Cauvi G, Wong CH, McRee DE, Elder JH, Stout CD and Torbett BE: A copper(I)-catalyzed 1,2,3-triazole azide-alkyne click compound is a potent inhibitor of a multidrug-resistant HIV-1 protease variant. J Med Chem *51*: 6263-6270, 2008.

9 Patpi SR, Pulipati L, Yogeeswari P, Sriram D, Jain N, Sridhar B, Murthy R, Anjana Devi T, Kalivendi SV and Kantevari S: Design, synthesis, and structure-activity correlations of novel dibenzo(b,d)furan, dibenzo(b,d)thiophene, and N-methylcarbazole clubbed 1,2,3-triazoles as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. J Med Chem *55*: 3911-3922, 2012.

10 Gediya LK and Njar VC: Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. Expert Opin Drug Discov *4*: 1099-1111, 2009.

11 Viegas-Junior C, Danuello A, da Silva Bolzani V, Barreiro EJ and Fraga CA: Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. Curr Med Chem *14*: 1829-1852, 2007.

12 Sharma N, Mohanakrishnan D, Shard A, Sharma A, Saima, Sinha AK and Sahal D: Stilbene-chalcone hybrids: design, synthesis, and evaluation as a new class of antimalarial scaffolds that trigger cell death through stage specific apoptosis. J Med Chem *55*: 297-311, 2012.

13 Zhang X, Wang J, Hu JM, Huang YW, Wu XY, Zi CT, Wang XJ and Sheng J: Synthesis and biological testing of novel glucosylated epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives. Molecules 21, 2016.

14 Mangsang W, Sirion U and Saeeng R: One-pot synthesis of O-glycosyl triazoles by O-glycosylation-click reaction. Carbohydr Res *375*: 79-89, 2013.

15 Sripa B, Leungwattanawanit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, Sripa C and Miwa M: Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). World J Gastroenterol *11*: 3392-3397, 2005.

16 Isa T, Kusano T, Shimoji H, Takeshima Y, Muto Y and Furukawa M: Predictive factors for long-term survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. Am J Surg *181*: 507-511, 2001.

17 Okuda K, Nakanuma Y and Miyazaki M: Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 2: molecular pathology and treatment. J Gastroenterol Hepatol *17*: 1056-1063, 2002.

18 Patel T: Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. Hepatology *33*: 1353-1357, 2001.

19 Blechacz B and Gores GJ: Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. Hepatology *48*: 308-321, 2008.

20 Coeman DC, Verbeken EK, Nackaerts KL, Demedts MG and Vansteenkiste JF: A fatal case of cholestatic liver failure probably related to gemcitabine. Ann Oncol *11*: 1503, 2000.

21 Garg MB, Lincz LF, Adler K, Scorgie FE, Ackland SP and Sakoff JA: Predicting 5-fluorouracil toxicity in colorectal cancer patients from peripheral blood cell telomere length: a multivariate analysis. Br J Cancer *107*: 1525-1533, 2012.

22 Hoskins J and Butler JS: RNA-based 5-fluorouracil toxicity requires the pseudouridylation activity of Cbf5p. Genetics *179*: 323-330, 2008.

23 Linskens RK, Golding RP, van Groeningen CJ and Giaccone G: Severe acute lung injury induced by gemcitabine. Neth J Med *56*: 232-235, 2000.

24 Allan G, Ouadid-Ahidouch H, Sanchez-Fernandez EM, Risquez-Cuadro R, Fernandez JM, Ortiz-Mellet C and Ahidouch A: New castanospermine glycoside analogues inhibit breast cancer cell proliferation and induce apoptosis without affecting normal cells. PLoS One *8*: e76411, 2013.

25 Cham BE and Chase TR: Solasodine rhamnosyl glycosides cause apoptosis in cancer cells. Do they also prime the immune system resulting in long-term protection against cancer? Planta Med *78*: 349-353, 2012.

26 Cui CZ, Wen XS, Cui M, Gao J, Sun B and Lou HX: Synthesis of solasodine glycoside derivatives and evaluation of their cytotoxic effects on human cancer cells. Drug Discov Ther *6*: 9-17, 2012.

27 Zhu M, Cui X, Zhang S, Liu L, Han Z and Gao E: The structures, cytotoxicity, apoptosis and molecular docking controlled by the aliphatic chain of palladium(II) complexes. J Inorg Biochem *157*: 34-45, 2016.
28 Lu JT, He W, Song SS and Wei W: Paeoniflorin inhibited the tumor invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells. Bratisl Lek Listy *115*: 427-433, 2014.
29 Mulani SK, Guh JH and Mong KK: A general synthetic strategy and the anti-proliferation properties on prostate cancer cell lines for natural phenylethanoid glycosides. Org Biomol Chem *12*: 2926-2937, 2014.
30 Malumbres M and Barbacid M: Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer *9*: 153-166, 2009.
31 Vermeulen K, Van Bockstaele DR and Berneman ZN: The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif *36*: 131-149, 2003.
32 Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D and Bazan V: Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. Ann Oncol *17(Suppl 7)*: vii115-123, 2006.
33 McIlwain DR, Berger T and Mak TW: Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*: a008656, 2013.
34 Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ and Schulze-Osthoff K: Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: A molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol Biol Cell *13*: 978-988, 2002.
35 Salameh BA, Leffler H and Nilsson UJ: 3-(1,2,3-Triazol-1-yl)-1-thio-galactosides as small, efficient, and hydrolytically stable inhibitors of galectin-3. Bioorg Med Chem Lett *15*: 3344-3346, 2005.
36 Tejler J, Skogman F, Leffler H and Nilsson UJ: Synthesis of galactose-mimicking 1H-(1,2,3-triazol-1-yl)-mannosides as selective galectin-3 and 9N inhibitors. Carbohydr Res *342*: 1869-1875, 2007.
37 Junking M, Wongkham C, Sripa B, Sawanyawisuth K, Araki N and Wongkham S: Decreased expression of galectin-3 is associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Eur J Cancer *44*: 619-626, 2008.
38 Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripa B, Chur-In S and Araki N: Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Cancer Sci *100*: 2077-2084, 2009.

Received August 12, 2016
Revised September 1, 2016
Accepted September 2, 2016

Biochemical and Biophysical Research Communications xxx (2017) 1–7

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma

Ubonrat Thamrongwaranggoon [a, e], Wunchana Seubwai [b, e, *], Chatchai Phoomak [a, e], Sakkarn Sangkhamanon [c], Ubon Cha'on [a, e], Thidarat Boonmars [d, e], Sopit Wongkham [a, e]

[a] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[b] Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[c] Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[d] Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[e] Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 January 2017
Accepted 24 January 2017
Available online xxx

Keywords:
Opisthorchis viverrini
Lonidamine
Hexokinase 2
Cholangiocarcinoma

ABSTRACT

Overexpression of hexokinase 2 (HKII) has been demonstrated in various cancers. A number of *in vitro* and *in vivo* studies in several cancers show the significance of HKII in many cellular processes including proliferation, metastasis and apoptosis. However, the role of HKII in *Opisthorchis viverrini* (*Ov*) associated cholangiocarcinoma (CCA) is still unknown. In the present study, the expression and roles of HKII were determined in *Ov* associated CCA. The expression of HKII was investigated in 82 patients with histologically proven CCAs by immunohistochemistry. HKII was distinctively expressed in CCA tissues. It was rarely expressed in normal bile duct epithelium, but was expressed in hyperplastic/dysplastic and in 82% of CCA bile ducts. The observation was confirmed in the *Ov* associated hamster model. Suppression of HKII expression using siRNA significantly decreased cell proliferation, migration and invasion of CCA cell lines. Similar results were obtained using lonidamine (LND), an inhibitor of HK. LND significantly inhibited growth of 4 CCA cell lines tested in dose and time dependent fashion. Comparison the cytotoxic effects of LND and siRNA-HKII suggests the off target of LND above 100 μM. In addition, LND in non-cytotoxic doses could suppress migration and invasion of CCA cells. These results indicate the association of HKII in cholangiocarcinogenesis and progression and suggest the possibility of HKII as a therapeutic target for CCA.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The incidence of cholangiocarcinoma (CCA), a malignant tumor found in both intra- and extra-hepatic biliary epithelia [1], has been increased worldwide over the past two decades [2]. The prognosis of CCA patients are generally poor, due to the lack of early detection and effective therapeutic regimens. The median post-surgical survival of patients with CCA was 4 months and 2-year survival was only 8.1% [3]. In addition, CCA recurrence can be as high as 50–70% even after surgery [4]. So, there is an urgent need to search for a novel treatment for early targeting of aberrantly expressed genes in the carcinogenesis and/or progression of CCA.

Nowadays, there are several targeted molecules for cancer therapy based on the hallmarks of cancer [5]. In 1924, Otto Warburg described glucose metabolism in cancer called the “Warburg effect” or “aerobic glycolysis” [6] which has recently been indicated as general hallmark of cancer. Cancer cells aberrantly express some specific proteins involved in glucose metabolism such as glucose transporter 1 (GLUT1), pyruvate kinase M2 (PKM2) and hexokinase 2 (HKII) [7]. Hexokinase is the first enzyme and the first rate limiting step of glycolysis pathway that converts glucose to glucose-6-phosphate. Overexpression of HKII has been reported in several cancer cells such as ovarian [8], liver [9], colon [10], including *non-Opisthorchis viverrini* (*Ov*) associated CCA [11]. High levels of HKII have been associated with poor outcomes of cancer patients, *e.g.*, tumor size, metastasis, and short survival rates, *etc.* [12]. Moreover, the inhibition of HKII using a specific inhibitor, namely lonidamine (LND) effectively suppressed the proliferation and metastasis of various cancers in *in vitro, in vivo* as well as clinical trials [13]. However, the information on HKII in *Ov* associated CCA is limited.

The aim of the present study was to investigate the expression of

* Corresponding author. Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.
E-mail address: wunchanas@yahoo.com (W. Seubwai).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139
0006-291X/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

HKII in *Ov* associated hamster and patient tissues. In addition, the functional roles of HKII in *Ov* associated CCA cell lines were to be determined using siRNA and HKII inhibitor.

2. Materials and methods

2.1. CCA tissues from patients and hamsters

Paraffin-embedded liver tissues from histologically proven CCA patients (N = 82) were obtained from the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand. Written informed consent was obtained from each subject and the protocol was reviewed and approved by The Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research (HE571464).

The experiment was conducted as previously described [14]. The hamsters were divided into four groups (n = 5): 1) without any treatment (control group); 2) *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) treated group; 3) *Ov* infected group; and 4) *Ov* plus NDMA group (CCA group). Livers from the animals were collected at 1, 3, and 6 months post infection. The protocol for animal handling and treatment was approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University, Thailand (AEMDKKU1/2558).

2.2. Cell culture and treatment

Four human CCA cell lines, KKU-055, KKU-100, KKU-213 and KKU-214, established from the tissues of Thai CCA patients [15] were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCBR) Cell Bank, Osaka, Japan. All CCA cell lines were cultured in HAM-F12 (Gibco/BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Life Technologies, Inc.) at 37 °C with 5% CO_2.

2.3. RNA silencing

Suppression of HKII expression in CCA cell lines were performed by transient transfection of HKII-siRNA using Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA.) according to the manufacturer's protocol. The sense sequences of double-strand siRNA were as previously published [16]. Briefly, 8×10^4 cells were plated into 6-well plates and incubated overnight. Cells were initially transfected with 50 pmole siRNA for 6 h in non-serum HAM-F12 and subsequently allowed to recover in complete media. Scrambled siRNA (SC) (Qiagen, Hilden, CA) served as a negative control.

2.4. Immunohistochemical analysis

The expression of HKII in the liver tissues was investigated using immunohistochemistry (IHC) according to the standard method. The sections were incubated with 1:50 anti-HKII antibody (C64G5) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) in PBS at room temperature and incubated with peroxidase-conjugated Envision™ secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA) for 1 h. The 0.1% diaminobenzidinetetrahydrochloride (Dako) solution was used for signal development. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Bio-optica, Milano, Italy) and observed under a light microscope (Axioscope A1, Carl Zeiss, Jena, Germany). The IHC index was calculated as frequency × intensity (frequency as 0 = negative; 1–25% = 1; 26–50% = 2; and >50% = 3 and intensity as weak = 1, moderate = 2 and strong = 3). The HKII expressions were divided into low (<3) and high (≥3) according to the median of IHC index.

2.5. Cell viability assay

For siHKII treated cells, CCA cells of 8×10^4 cells/well were cultured in a 48-well plate (Corning, Lowell, MA) for 24, 48, 72 and 96 h. For LND treated cells, 1.5×10^3 cells/well of CCA cells in a 96-well plate were cultured with 50–250 μM of LND (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 24, 48 and 72 h. Cells treated with vehicle (0.125% DMSO) were used as control. Cell viability was determined using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Invitrogen, Carlsbad, CA) as previously described [17].

2.6. Cell migration and invasion assay

Cell migration was performed using the transwell migration assay. CCA cells (4×10^4 cells for KKU-213 and 5×10^4 for KKU-100) in serum-free Ham's-F12 were seeded into the upper chamber of an 8-μm pore size transwell (Corning). Cells were allowed to migrate 16 h for KKU-100 and 6 h for KKU-213. The migrated cells were fixed with 4% paraformaldehyde (v/v) for 20 min and stained with 1:20,000 Hoechst (Invitrogen) at room temperature for 15 min. The stained cells were counted using Image J software (National Institutes of Health, USA). Cell invasion was performed in the similar way as migration assay, except cells were seeded into a pre-coated Matrigel (Corning), 40 μg/insert.

2.7. Clonogenic assay

For siHKII treated cells, CCA cells were treated with siHKII for 48 h before seeded into a 24-well plate (80 cells/well). For LND treated cells, cells were seeded into a 24-well plate containing 100, 150 or 200 μM LND in a complete culture medium. The plates were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 incubator for 7 days with media replacing on day 4. The cluster of more than 50 cells was counted as 1 colony under the microscope.

2.8. SDS-PAGE and western blot

Whole cell lysate was obtained using NP-40 lysis buffer and protein concentration was determined according to Lowry method [18]. Protein (30 μg/well) was subjected to a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond™-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) by wet electro-transferred using Bolt & Marhoney buffer [19]. After blocking with 3% BSA in 0.3% Tween-20 in PBS, the blot was incubated with 1:500 anti-HKII (C-14) sc-6521 (Santa Cruz Biotechnology, CA) or 1:20,000 anti-actin (A5441) (Sigma, St. Louis City, MO) and HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare). Signal was developed with ECL™ Prime Western Blotting Detection System (GE healthcare). The images of ECL signals were taken with ImageQuant 400 image analyzer and analyzed using ImageQuant™ TL analysis software (GE healthcare).

2.9. RNA extraction and real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction

Trizol reagent (Ambion) was used for total RNA was extracted and converted to cDNA using the high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reactions were performed using cDNA converted from 40 ng of total RNA, 0.4 μM of forward- and reverse-primers, and LightCycle 480® SYBR green I master mix (Roche Diagnostic). PCR was performed in the LightCycle 480® real-time PCR system (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany).

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

2.10. Statistical analysis

The results are representative data for three separate experiments. Data is shown as the mean ± standard deviation (SD) of all three experiments. Differences between groups were compared using one-way ANOVA and *t-test*; *P* values < 0.05 were considered significant. All analysis was performed using SPSS 17.0 software (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

3.1. HKII is overexpressed in CCA tissues

The HKII-immunohistochemistry of tumor tissues from 82 *Ov* associated CCA patients revealed that HKII was rarely expressed in hepatocyte 6/79 (7%), normal bile duct (NBD) 4/79 (5%) and stromal 2/82 (2%), whereas, it was significantly expressed in hyperplasia 27/38 (80%), dysplasia 37/46 (80%) and CCA 68/82 (82%) (Fig. 1A and B). In all cases, HKII was mostly detected in cytoplasm. The aberrant expressions of HKII in precancerous and CCA tissues indicate the involvement of HKII in CCA development and progression. The correlations between HKII staining index and clinical findings of CCA patients were further analyzed. The expression of HKII, however, had no correlation with any clinical features and survival of the patients (data not shown).

CCA tissues from *Ov* induced CCA hamsters were used to determine the contribution of HKII in cholangiocarcinogenesis. As shown in Fig. 2, no HKII expression was detected in the small and large bile duct epithelia of the non-treated control group, *Ov* infected and NDMA treated group at 1, 3 and 6 months, whereas

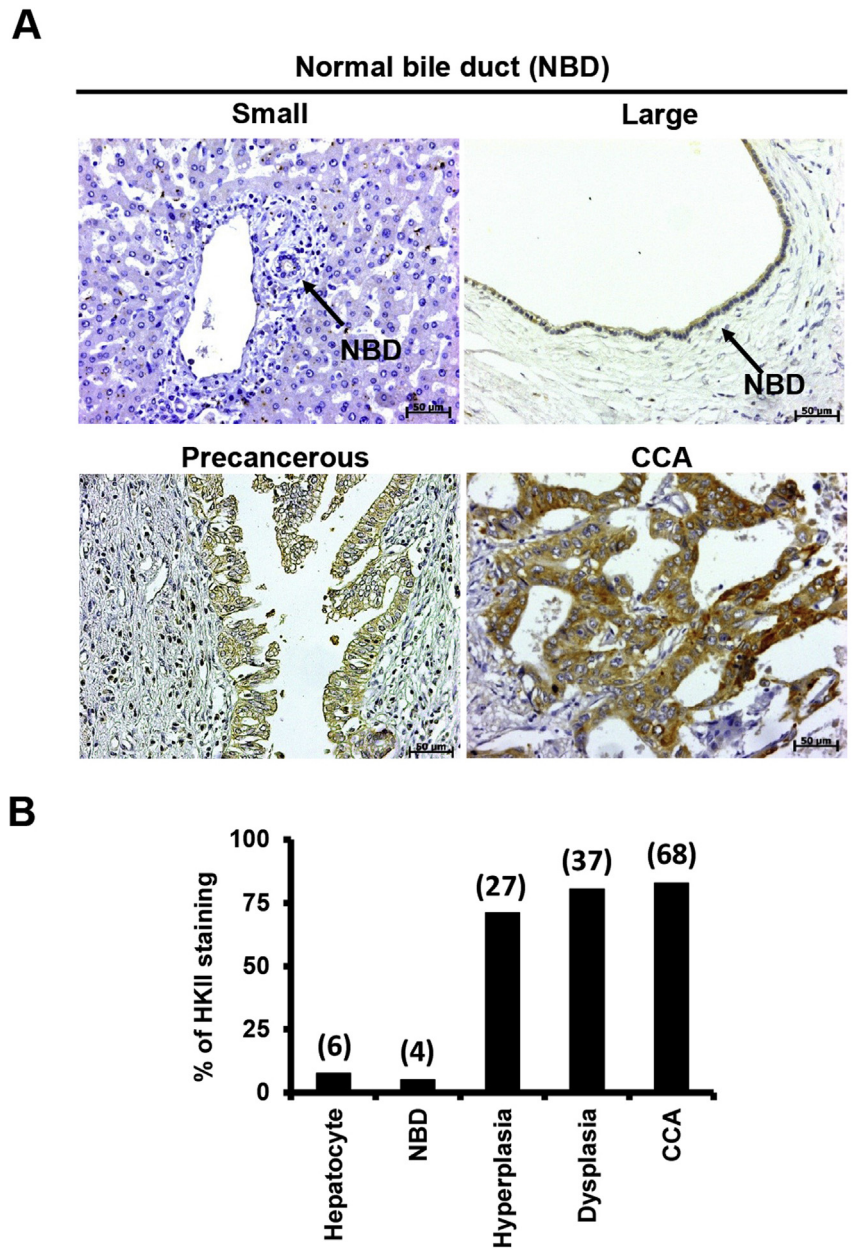


Fig. 1. HKII expression in human CCA tissues. (A) Representatives of HKII immunohistochemistry staining in normal bile duct (NBD), precancerous and CCA tissues. (B) Comparison of HKII positive staining (%).

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

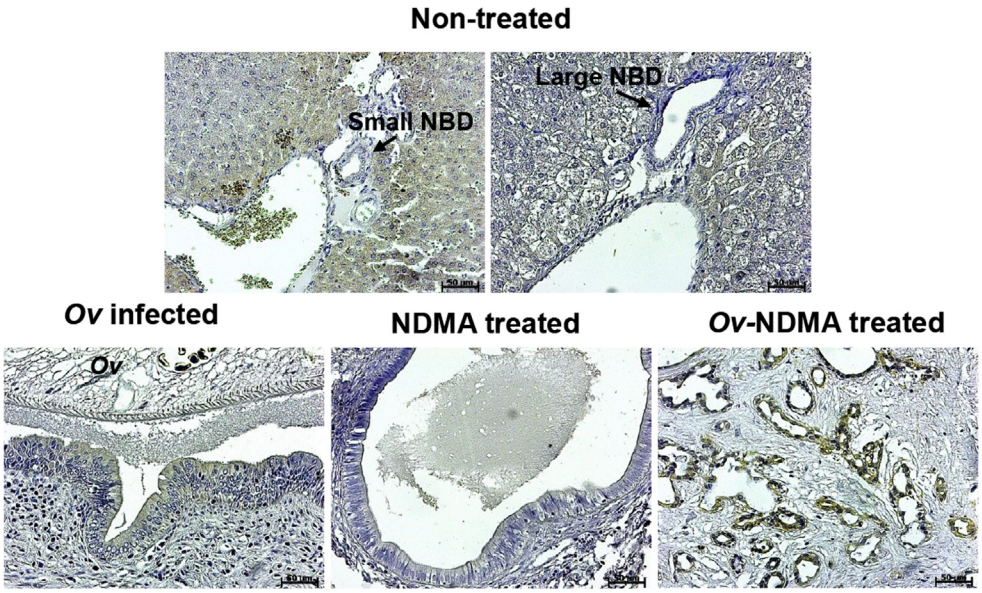


Fig. 2. HKII expression in bile duct epithelia of CCA hamster model. Representatives of HKII immunohistochemistry staining in each group of hamster tissues at 6 months.

strong expression of HKII was detected in 40% (2/5) of *Ov*-NDMA treated group at 6 months.

3.2. Suppression of HKII expression inhibits growth, migration and invasion of CCA cell lines

The expression levels of HKII in four CCA cell lines were first determined using real time-PCR and western blot. As shown in Fig. 3A, all CCA cell lines expressed HKII mRNA and protein with different basal levels. Silencing of HKII expression using specific siRNA was next performed in two CCA cell lines with low and high levels of HKII expression, KKU-100 and KKU-213. siRNA specifically to HKII effectively suppressed HKII expression from 24 to 120 h (Fig. 3B). Suppression of HKII expression (siHKII) significantly inhibited growth of both CCA cell lines compared to the scramble control cells (Fig. 3C, $P < 0.001$).

To explore the role of HKII on the ability of a single cell to grow into a colony, the clonogenic assay was performed. Comparing to the SC cells, colony formation of KKU-100 and KKU-M213 were significantly reduced in siHKII cells (Fig. 3D, $P < 0.05$). The number of colonies in siHKII cells were 77% for KKU-100 and 82% for KKU-213 compared to the SC cells.

The roles of HKII on migration and invasion abilities of CCA cells were tested. Silencing of HKII expression significantly reduced number of migrated cells of KKU-100 and KKU-213 to 34% and 21% of the controls. The same treatment could decrease the number of invaded cells of KKU-100 and KKU-213 to 46% and 25% of the untreated cells (Fig. 3E, $P < 0.001$).

3.3. HKII inhibitor, LND, inhibits growth of CCA cell lines

As LND, a known HKII inhibitor has been used in clinical trial phase II [20,21]. We next analyzed the efficacy of LND on proliferation of CCA cells. Four CCA cell lines, KKU-055, KKU-100, KKU-213 and KKU-214, were treated with 50–250 μM LND for 3 days, and numbers of viable cells were determined by MTT assay. LND significantly inhibited growth of all CCA cell lines as dose dependent manners as compared to the vehicle controls (Fig. 4A). The sensitivities of CCA cell lines to LND as determined from the IC_{50} were KKU-213 > KKU-214/KKU-055 > KKU-100.

The effect of LND on CCA cells were also determined in KKU-100 and KKU-213 with 50–250 μM LND for 24, 48 and 72 h. As shown in Fig. 4B, LND could inhibit growth of both cell lines in a dose and time dependent fashions.

Compared to the untreated control cells, colony formation of KKU-100 and KKU-M213 was significantly reduced in LND treated cells (Fig. 4C). The number of colonies were 16% for KKU-100 and 35.7% for KKU-213 compared to the controls when cells were treated with 100 μM LND. No colony formation was observed in cells treated with LND at 150 and 200 μM.

The effects of LND on migration and invasion ability of CCA cells were tested. The sub-cytoxicity dose (50 μM) of LND significantly inhibited number of migrated cells of KKU-100 and KKU-213 to 50% and 60% of the controls. The same treatment of LND could inhibit number of invaded cells of KKU-100 and KKU-213 to 50% and 60% of the untreated cells (Fig. 4D).

4. Discussion

In aerobic condition, normal cells mostly rely on mitochondrial oxidative phosphorylation to produce energy. In contrast, cancer cells, although in aerobic atmosphere, depend mostly on glycolysis, the aerobic breakdown of glucose into ATP, known as the “Warburg effect” [22]. Based on this contrary finding, the specific isoform of glycolytic enzymes which is unique to cancer metabolism should be an effective target for cancer therapy. In the present study, the aberrant expression of HKII in tumor tissues from *Ov* associated CCA patients was observed. The contribution of HKII in CCA was confirmed in *Ov* induced hamster model. Lastly, it was shown that inhibiting expression or activity of HKII in CCA cells using small interfering RNA (siRNA) or HKII inhibitor, LND, gave a good promising as the target therapy for CCA.

In the current study, HKII was overexpressed in precancerous and tumor tissues in more than 80% (68/82 cases) of *Ov* associated intrahepatic CCA. The result was similar to those reported for non *Ov* associated CCA (77%, 20/26 cases) [23] and extrahepatic CCA (84.6%, 22/26 cases) [11]. Contribution of HKII in the development of cholangiocarcinoma was noted in the *Ov* induced CCA hamster model in the present study. Aberrant expression of HKII was detected only in the tumor tissues from the *Ov* plus NDMA induced

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

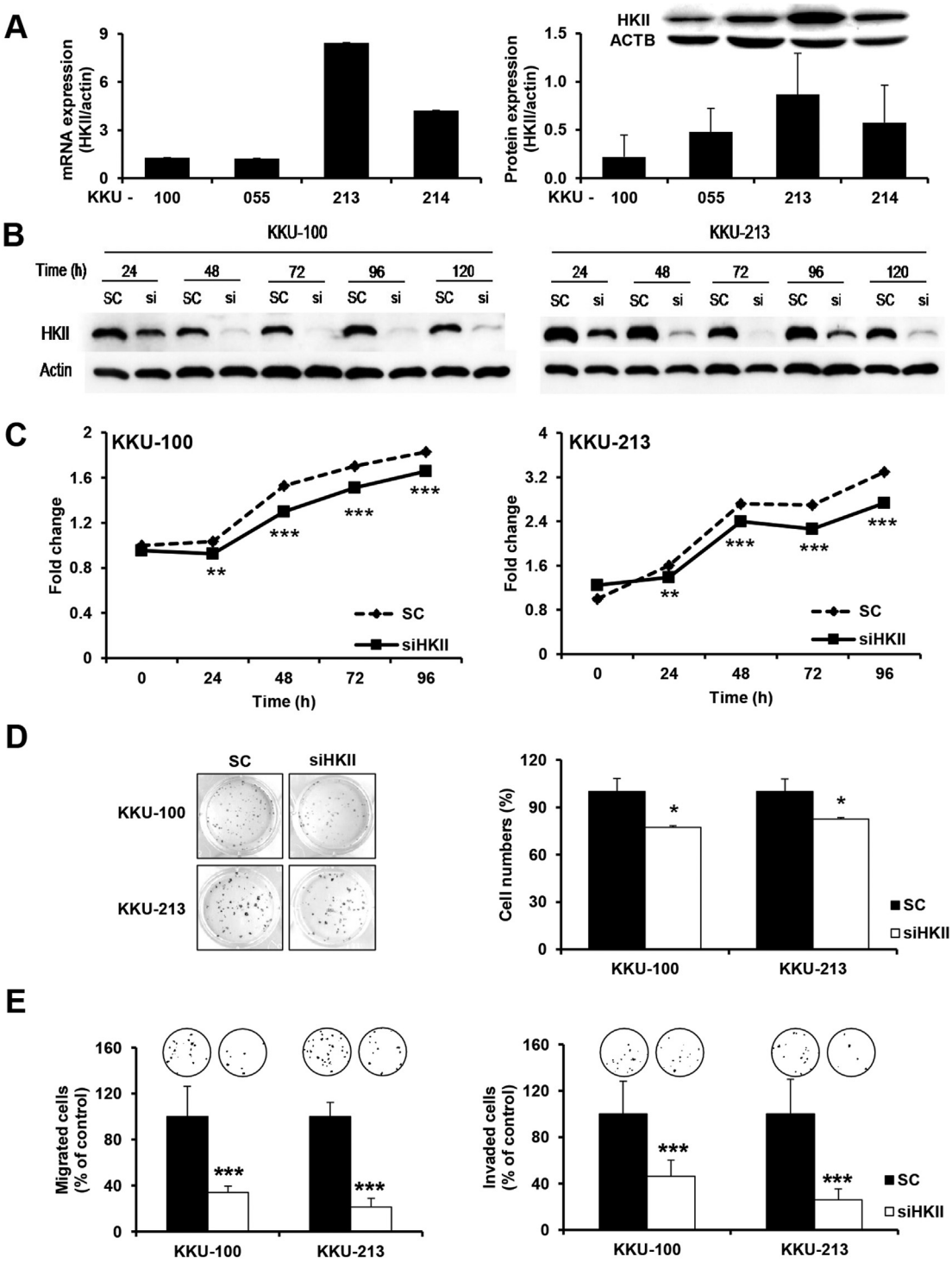


Fig. 3. Silencing of HKII expression suppresses proliferation, migration and invasion of CCA cells. (A) Expressions of HKII mRNA and protein in CCA cell lines, KKU-100 and KKU-213, were determined using real-time RT-PCR and western blot. (B) Western blots of HKII from siHKII (si) and scramble control (SC) treated cells. Silencing of HKII expression using siHKII decreased levels of (C) cell proliferation, (D) colony formation and (E) cell migration and invasion compared to those of scramble control cells. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$.

CCA hamsters but not observed in those from other hamster groups. The influence of HKII in carcinogenesis of CCA, however, may be at late stage, as there was no HKII expression in the bile duct epithelia observed before CCA was fully developed (at 6 months). In addition, HKII is possibly specific to malignant cells as it was detected only in the CCA but not in other cell types found in the liver. This assumption is supported by the fact that HKII was found mainly in the CCA tissues of the patients. On this basis, HKII might be a good target for therapy of CCA.

Aberrant expression of HKII may be a required feature for cancer development and progression. Overexpression of HKII has been reported in tumor tissues of cancer patients with liver [9], ovary [8,24] and larynx [25]. The clinical significance of HKII in cancer was noted as overexpression of HKII was associated with poor prognosis

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

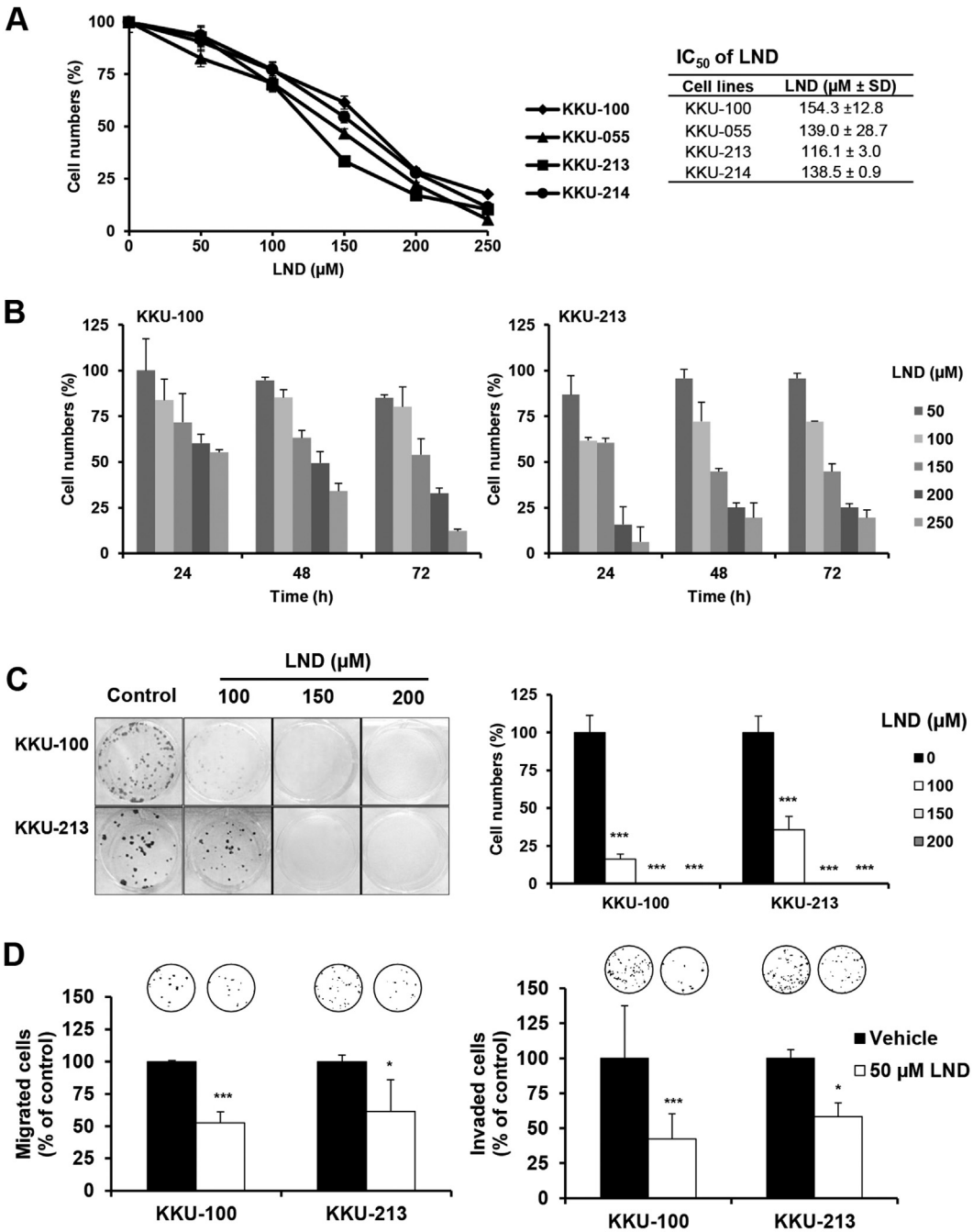


Fig. 4. Effect of LND on CCA cell progression. (A) Cell numbers (%) was determined using the MTT assay in CCA cells treated with 50–250 μM LND for 72 h and the IC50s were analyzed. (B) CCA cells, KKU-100 and KKU-213, were treated with 50–250 μM LND for 24, 48 and 72 h and cell numbers (%) were compared to those of untreated cells. (C) Colony formation of CCA cells, KKU-100 and KKU-213, treated with or without 100–200 μM LND. (D) Cell migration and invasion were determined in KKU-100 and KKU-213 treated with 50 μM LND. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.01$.

of the patients, *e.g.,* shorten survival, metastasis and chemo-resistance. Clinical significance of HKII in cancer was proved in *in vitro* and *in vivo* studies. Knocking down of HKII expression using siRNA significantly suppressed growth of lung cancer cells [26,27].

The direct evidence that HKII is necessary to promote growth and metastasis of CCA was supported by the siHKII experiment. Suppression of HKII expression using siHKII significantly decreased growth, colony formation, migration and invasion of CCA cells. The antitumor activity of LND, a selective inhibitor of hexokinase [28], was widely reported in several cancers, *in vitro* [29], *in vivo* [30] and phase II-clinical trials [20,21]. Here we tested the antitumor activity of LND in four CCA cell lines with different drug-response properties [31]. LND significantly suppressed growth of CCA cell lines in both drug-resistant (KKU-100) and drug-sensitive (KKU-055) [31] cells in the similar dose- and time-dependent manners. The average IC_{50} of LND for CCA cells is 137 μM which is more sensitive than those reported for nasopharyngeal cancer and leukaemic cells with IC_{50} of 300 μM [32]. The anti-tumor efficiency of LND seems to vary based on cell types and the demand of consumption from glycolysis. It is well known that brain cells are strictly dependent on aerobic glycolysis and hence very sensitive to a shortage of energy production via inhibition of HKII by LND. In CCA cells, KKU-213 with the highest HKII expression had lowest IC50 for LND (116 μM). In contrast, KKU-100 with the lowest HKII

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

expression had highest IC50 for LND (154 μM). However, the present study suggests the off target of LND above 100 μM. LND at 150–250 μM, 72 h could inhibit 45–90% of cell proliferation, whereas, siHKII could inhibit 20% growth of CCA cells. Actions of LND on mitochondrial complex II [33] and mitochondrial pyruvate carrier [34] other than HK have been reported. Moreover, LND at sub-toxicity doses (IC_{20}) could effectively suppress migration and invasion of CCA cells. The observation of low dose LND and anti-metastatic activity has also been reported in breast and colon cancer cell lines [35,36].

HKII seems to be the good and specific target for CCA treatment, as firstly, it is aberrantly and uniquely expressed in CCA cells, other cell types found in the liver did not express HKII. Secondly, the inhibition of HKII using siRNA or LND not only suppresses growth but also suppress metastatic activity of CCA cells. In conclusion, this is the first study to report the aberrant expression of HKII in *Ov* associated CCA and provide the possibility of using HKII as the target for CCA treatment. This study enriches the knowledge on potential therapeutic targets for CCA likely to enhance the survival of CCA patients.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund and Khon Kaen University (RTA5780012) and Faculty of Medicine, KKU (IN58211). We would like to thank the TRG Researcher grant (TRG5780188), Khon Kaen University grant (570604) for W. Seubwai and LFCRC Scholarship for U. Thamrongwaranggoon (LFCRC 004/2556). We would like to acknowledge Assoc. Prof. John F Smith, for editing the manuscript via Publication Clinic, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

References

[1] V. Cardinale, R. Semeraro, A. Torrice, M. Gatto, C. Napoli, M.C. Bragazzi, R. Gentile, D. Alvaro, Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: new insight into epidemiology and risk factors, World J. Gastrointest. Oncol. 2 (2010) 407–416.
[2] Y. Shaib, H.B. El-Serag, The epidemiology of cholangiocarcinoma, Semin. Liver Dis. 24 (2004) 115–125.
[3] V. Luvira, K. Nilprapha, V. Bhudhisawasdi, A. Pugkhem, N. Chamadol, S. Kamsa-Ard, Cholangiocarcinoma patient outcome in northeastern Thailand: single-center prospective study, Asian pac. J. Cancer Prev. 17 (2016) 401–406.
[4] K.C. Soares, I. Kamel, D.P. Cosgrove, J.M. Herman, T.M. Pawlik, Hilar cholangiocarcinoma: diagnosis, treatment options, and management, Hepatobiliary Surg. Nutr. 3 (2014) 18–34.
[5] L.M. Phan, S.C. Yeung, M.H. Lee, Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies, Cancer Biol. Med. 11 (2014) 1–19.
[6] O. Warburg, On the origin of cancer cells, Science 123 (1956) 309–314.
[7] H. Ngo, S.M. Tortorella, K. Ververis, T.C. Karagiannis, The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities, Mol. Biol. Rep. 42 (2015) 825–834.
[8] Z. Jin, J. Gu, X. Xin, Y. Li, H. Wang, Expression of hexokinase 2 in epithelial ovarian tumors and its clinical significance in serous ovarian cancer, Eur. J. Gynaecol. Oncol. 35 (2014) 519–524.
[9] G. Guzman, R. Chennuri, A. Chan, B. Rea, A. Quintana, R. Patel, P.Z. Xu, H. Xie, N. Hay, Evidence for heightened hexokinase II immunoexpression in hepatocyte dysplasia and hepatocellular carcinoma, Dig. Dis. Sci. 60 (2015) 420–426.
[10] M. Iwamoto, K. Kawada, Y. Nakamoto, Y. Itatani, S. Inamoto, K. Toda, H. Kimura, T. Sasazuki, S. Shirasawa, H. Okuyama, M. Inoue, S. Hasegawa, K. Togashi, Y. Sakai, Regulation of 18F-FDG accumulation in colorectal cancer cells with mutated KRAS, J. Nucl. Med. 55 (2014) 2038–2044.
[11] S.O. Yoon, T.J. Jeon, J.S. Park, Y.H. Ryu, J.H. Lee, J.S. Yoo, J.K. Kim, D.S. Yoon, E.J. Oh, Analysis of the roles of glucose transporter 1 and hexokinase 2 in the metabolism of glucose by extrahepatic bile duct cancer cells, Clin. Nucl. Med. 40 (2015) e178–182.
[12] K.C. Patra, Q. Wang, P.T. Bhaskar, L. Miller, Z. Wang, W. Wheaton, N. Chandel, M. Laakso, W.J. Muller, E.L. Allen, A.K. Jha, G.A. Smolen, M.F. Clasquin, R.B. Robey, N. Hay, Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer, Cancer Cell 24 (2013) 213–228.
[13] J.P. Golding, T. Wardhaugh, L. Patrick, M. Turner, J.B. Phillips, J.I. Bruce, S.G. Kimani, Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy, Br. J. Cancer 109 (2013) 976–982.
[14] T. Boonmars, Z. Wu, S. Boonjaruspinyo, A. Puapairoj, B. Kaewsamut, I. Nagano, S. Pinlaor, P. Yongvanit, O. Wonkchalee, A. Juasook, P. Sudsarn, T. Srisawangwong, Involvement of c-Ski oncoprotein in carcinogenesis of cholangiocacinoma induced by Opisthorchis viverrini and N-nitrosodimethylamine, Pathol. Oncol. Res. 17 (2011) 219–227.
[15] B. Sripa, S. Leungwattanawanit, T. Nitta, C. Wongkham, V. Bhudhisawasdi, A. Puapairoj, C. Sripa, M. Miwa, Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100), World J. Gastroenterol. 11 (2005) 3392–3397.
[16] N. Ho, J. Morrison, A. Silva, B.L. Coomber, The effect of 3-bromopyruvate on human colorectal cancer cells is dependent on glucose concentration but not hexokinase II expression, Biosci. Rep. 36 (2016) e00299.
[17] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
[18] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265–275.
[19] M.W. Bolt, P.A. Mahoney, High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem. 247 (1997) 185–192.
[20] C.M. Carapella, M.G. Paggi, F. Cattani, G.B. Ciottoli, A. Floridi, B. Iandolo, L. Raus, A. Riccio, A. Caputo, The potential role of lonidamine (LND) in the treatment of malignant glioma. Phase II study, J. Neurooncol 7 (1989) 103–108.
[21] M. De Lena, V. Lorusso, A. Latorre, G. Fanizza, G. Gargano, L. Caporusso, M. Guida, A. Catino, E. Crucitta, D. Sambiasi, A. Mazzei, Paclitaxel, cisplatin and lonidamine in advanced ovarian cancer. A phase II study, Eur. J. Cancer 37 (2001) 364–368.
[22] O. Warburg, On respiratory impairment in cancer cells, Science 124 (1956) 269–270.
[23] B. Paudyal, N. Oriuchi, P. Paudyal, T. Higuchi, T. Nakajima, K. Endo, Expression of glucose transporters and hexokinase II in cholangiocellular carcinoma compared using [18F]-2-fluro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography, Cancer Sci. 99 (2008) 260–266.
[24] D.H. Suh, M.A. Kim, H. Kim, M.K. Kim, H.S. Kim, H.H. Chung, Y.B. Kim, Y.S. Song, Association of overexpression of hexokinase II with chemoresistance in epithelial ovarian cancer, Clin. Exp. Med. 14 (2014) 345–353.
[25] J. Chen, S. Zhang, Y. Li, Z. Tang, W. Kong, Hexokinase 2 overexpression promotes the proliferation and survival of laryngeal squamous cell carcinoma, Tumour Biol. 35 (2014) 3743–3753.
[26] F. Xi, J. Ye, Inhibition of lung carcinoma A549 cell growth by knockdown of hexokinase 2 in situ and in vivo, Oncol. Res. 23 (2016) 53–59.
[27] H. Wang, L. Wang, Y. Zhang, J. Wang, Y. Deng, D. Lin, Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase II (HK2) suppresses lung tumor growth, Cancer Cell Int. 16 (2016) 9.
[28] A. Floridi, M.G. Paggi, M.L. Marcante, B. Silvestrini, A. Caputo, C. De Martino, Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells, J. Natl. Cancer Inst. 66 (1981) 497–499.
[29] Y.C. Li, K.P. Fung, T.T. Kwok, C.Y. Lee, Y.K. Suen, S.K. Kong, Mitochondrial targeting drug lonidamine triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells, Life Sci. 71 (2002) 2729–2740.
[30] K. Nath, D.S. Nelson, D.F. Heitjan, D.B. Leeper, R. Zhou, J.D. Glickson, Lonidamine induces intracellular tumor acidification and ATP depletion in breast, prostate and ovarian cancer xenografts and potentiates response to doxorubicin, NMR Biomed. 28 (2015) 281–290.
[31] N. Tepsiri, L. Chaturat, B. Sripa, W. Namwat, S. Wongkham, V. Bhudhisawasdi, W. Tassaneeyakul, Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines, World J. Gastroenterol. 11 (2005) 2748–2753.
[32] B. Silvestrini, G.M. Hahn, V. Cioli, C. De Martino, Effects of lonidamine alone or combined with hyperthermia in some experimental cell and tumour systems, Br. J. Cancer 47 (1983) 221–231.
[33] L. Guo, A.A. Shestov, A.J. Worth, K. Nath, D.S. Nelson, D.B. Leeper, J.D. Glickson, I.A. Blair, Inhibition of mitochondrial complex II by the anticancer agent lonidamine, J. Biol. Chem. 291 (2016) 42–57.
[34] B. Nancolas, L. Guo, R. Zhou, K. Nath, D.S. Nelson, D.B. Leeper, I.A. Blair, J.D. Glickson, A.P. Halestrap, The anti-tumour agent lonidamine is a potent inhibitor of the mitochondrial pyruvate carrier and plasma membrane monocarboxylate transporters, Biochem. J. 473 (2016) 929–936.
[35] F. Morais-Santos, V. Miranda-Goncalves, S. Pinheiro, A.F. Vieira, J. Paredes, F.C. Schmitt, F. Baltazar, C. Pinheiro, Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines, Endocr. Relat. Cancer 21 (2014) 27–38.
[36] G.H. Lee, H.J. Chae, H.R. Kim, Monoamine carboxylate transporters are involved in BI-1-associated cancer metastasis in HT1080 colon fibrosarcoma cells, Int. J. Oncol. 39 (2011) 209–216.

Please cite this article in press as: U. Thamrongwaranggoon, et al., Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma, Biochemical and Biophysical Research Communications (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.139

ANTICANCER RESEARCH *37*: 115-124 (2017)
doi:10.21873/anticanres.11296

Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF-κB

CHARUPONG SAENGBOONMEE[1,3], WUNCHANA SEUBWAI[2,3], UBON CHA'ON[1,3], KANLAYANEE SAWANYAWISUTH[1,3], SOPIT WONGKHAM[1,3] and CHAISIRI WONGKHAM[1,3]

[1]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand;*
[2]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand;*
[3]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

Abstract. *Background/Aim: Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive cancer for which standard treatments are still ineffective. This study demonstrated the antiproliferative and anti-metastatic activity of metformin, an anti-diabetic drug, in CCA cells. Materials and Methods: Cell proliferation, migration/invasion and anoikis resistance were determined. The underlying mechanisms were identified using western blotting and immunocytofluorescence. Results: Metformin significantly suppressed proliferation of CCA cells in a dose- and time-dependent manner, regardless of glucose present in the medium. A low dose of metformin significantly increased anoikis and inhibited migration/ invasion of CCA cells that was in concert with the decrease of vimentin, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -7. Activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) by phosphorylation together with suppression of nuclear translocation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) were the underlying mechanisms for these effects. Conclusion: Metformin is a potent antiproliferative and anti-metastatic agent against human CCA cells. These findings encourage the repurposing of metformin in clinical trials to improve CCA treatment.*

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Chaisiri Wongkham, Ph.D., Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel/Fax:+6643 348386, e-mail: chaisiri@kku.ac.th and Wunchana Seubwai, Ph.D., Department of Forensic Medicine,Faculty of Medicine,Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel/Fax: +6643 202859, e-mail: wunchanas@yahoo.com

Key Words: Metformin, cholangiocarcinoma, proliferation, STAT3, NF-κB.

Cholangiocarcinoma (CCA) is the most common type of liver cancer after hepatocellular carcinoma worldwide. The incidence of CCA varies geographically: It is considered low in Western countries, but it is relatively high in the East and Southeast Asia. A high incidence of CCA has been noted in the Northeast of Thailand and infection with the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* has been shown to be a strong risk factor for CCA in this region (1). Primary sclerosing cholangitis, hepatolithiasis, and hepatitis B virus infection, however, are the documented risk factors for CCA in Western countries (2, 3). CCA is a lethal type of cancer since early diagnosis is rarely possible. Most patients present at an inoperable advanced/metastatic stage. Chemotherapeutic and radiological therapies are alternative choices, but these treatments still have a low potential for curative purposes (4). The search goes on for additive treatments that might improve therapeutic outcome.

Development of a new pharmaceutical requires extensive research and development costs and time. Repositioning a drug that is already clinically used provides a way to shortcut the research and time required, and costs much less (5). Diabetes mellitus (DM) has been reported to be associated with risk and prognosis of many cancer types, including CCA (6, 7). The molecules that bridge DM and cancer have been shown to be insulin and a high blood glucose level (8-10). Repositioning an antidiabetic compound that appears to have great potential for cancer prevention and as a cure provides a rare opportunity. Metformin is such a drug.

Metformin is a widely studied drug for its potential for cancer treatment even though it is primarily used as a first-line treatment for type 2 DM. Metformin indirectly activates AMP-activated protein kinase (AMPK) by inhibiting the activity of mitochondrial complex I, resulting in an increased cellular AMP/ATP ratio. Activated AMPK plays an important role as a cellular energy sensor by promoting glycolysis and inhibiting

gluconeogenesis. Apart from its function in energy metabolism, AMPK is able to interact with several signaling pathways and transcription factors such as phosphoinositide-3-phosphate/protein kinase B (PI3K/AKT), Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT), nuclear factor-kappa B (NF-κB) and the mammalian target of rapamycin (mTOR). The attempt to repurpose a drug for CCA, in this instance metformin, is a potential way to find an improvement for CCA treatment. An epidemiological study in the United States showed that metformin significantly reduced risk of CCA in patients with DM (11). The potential for repurposing metformin for cancer treatment has been reviewed (5). To date, 243 clinical trials of metformin as cancer treatment have been registered at https://www.clinicaltrials.gov. Metformin, however, is still at the preclinical stage for some cancer types, including CCA (12, 13).

In the present study, the effects of metformin on the proliferation and progression of liver fluke-associated CCA cells were examined. The effects of metformin on the metastatic potential, namely migration, invasion and anoikis resistance of CCA cells are reported. The molecular mechanisms by which metformin affected CCA cells were elucidated. The demonstrated effects of metformin on CCA cells in the present study should further encourage clinical trials to improve the treatment of CCA.

Materials and Methods

Chemicals and antibodies. Metformin (1, 1-dimethylbiguanide hydrochloride) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis City, MO, USA) and dissolved in sterile distilled water. Primary antibodies to p-AMPKα (T183/172), AMPK, p-RB (S249/T252), Rb, Cyclin D1, MMP2, MMP7, NF-κB (p65) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), anti-p21 was from Cell Signaling, (Danvers, MA, USA), anti-vimentin from Abcam (Cambridge, UK), and anti-actin from Sigma. The secondary antibodies for western blots were goat anti-mouse and donkey anti-rabbit from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK), and rabbit anti-goat from Dako (Carpinteria, CA, USA). The secondary antibodies for the immunocytofluorescent study were fluorescein isothyocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Hoechst 33342 was purchased from Invitrogen.

Cell lines. CCA cell lines, namely KKU-055, KKU-100, KKU-213 and KKU-214, were originally established from primary cultures of liver fluke associated CCA tissues from Thai patients and obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Osaka, Japan. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-high glucose (HG; 25 mM) or normal glucose (NG; 5.6 mM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic (all from Invitrogen). Cells were incubated at 37˚C with 5% CO_2, in a humidified incubator and passaged when confluence reached 80%.

Proliferation assay. CCA cells were seeded into 96-well plates at 3×10^3 cells/well and cultured overnight in a humidified incubator at 37˚C with 5% CO_2. Cells were then treated with 5, 10, 20, 40 mM metformin for 48 h or for different times. The number of viable cells was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described in our previous study (14).

Migration and invasion assay. CCA cells were pretreated with 10 mM metformin for 24 h prior to migration and invasion assays according to our previous report (14). Cells were allowed to migrate in the absence of metformin for 12 h for KKU-M213 and 24 h for KKU-M214 cells. The invasion assay was performed using the same protocol as the migration assay except that the upper chamber was pre-coated with 50 μg/well of Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, USA).

Anoikis assay. CCA cells were suspended in a complete medium containing 0, 10, 20 mM of metformin and then seeded into a 24-well ultralow attachment plate (Corning, Lowell, MA, USA) which was coated with a neutral charge of hydrogel to prevent the adherence of cells. Cells (5×10^4 cells/well) were then incubated in the non-adhered condition for 48 h. Total cells in each well were collected, washed twice with PBS and treated with trypsin for 5 min to obtain a single-cell suspension. The numbers of viable and dead cells were determined using the trypan blue dye exclusion assay. Three independent experiments were performed with triplicated tests.

Western blot analysis for cell-cycle proteins. CCA cells were treated with 10, 20, 40 mM metformin for 48 h whereas those for protein markers of metastasis were treated with 10 mM metformin for 24 h. Cells were lysed with NP-40 lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Cell lysates were prepared, subjected to sodium dodecyl sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond™-polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane as mentioned previously (14). The membrane was probed with each primary antibody at 4˚C overnight and with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. Signals were detected using an enhanced chemiluminescence prime western blotting detection kit (GE Healthcare) and the image was analyzed using Image Quant™ Imager (GE Healthcare).

Immunocytofluorescence analysis. CCA cells (8×10^3 cells/well) were cultured in Matrigel pre-coated slide chambers overnight at 37˚C with 5% CO_2. The cells were treated 10 and 20 mM metformin for 24 h. Immunofluorescent staining was performed and recorded as described previously (14). Fixed cells were incubated with 1:100 anti-STAT3 or anti-p65 antibodies at 4˚C overnight. Then, 1:200 FITC-conjugated secondary antibody for STAT3 or 1:200 Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody for p65 antibody and 1:10,000 of Hoechst 33342 were applied at room temperature for further 2 h. The immunofluorescent images were captured and analyzed using Nikon NIS-Elements software (Nikon, Tokyo, Japan).

Statistical analysis. All quantitative data are reported as mean±SD. Triplicate tests for each experiment and at least two independent experiments were performed. The differences between two groups were compared using the two-tailed Student's *t*-test. A value of $p<0.05$ was considered as statistically significant.

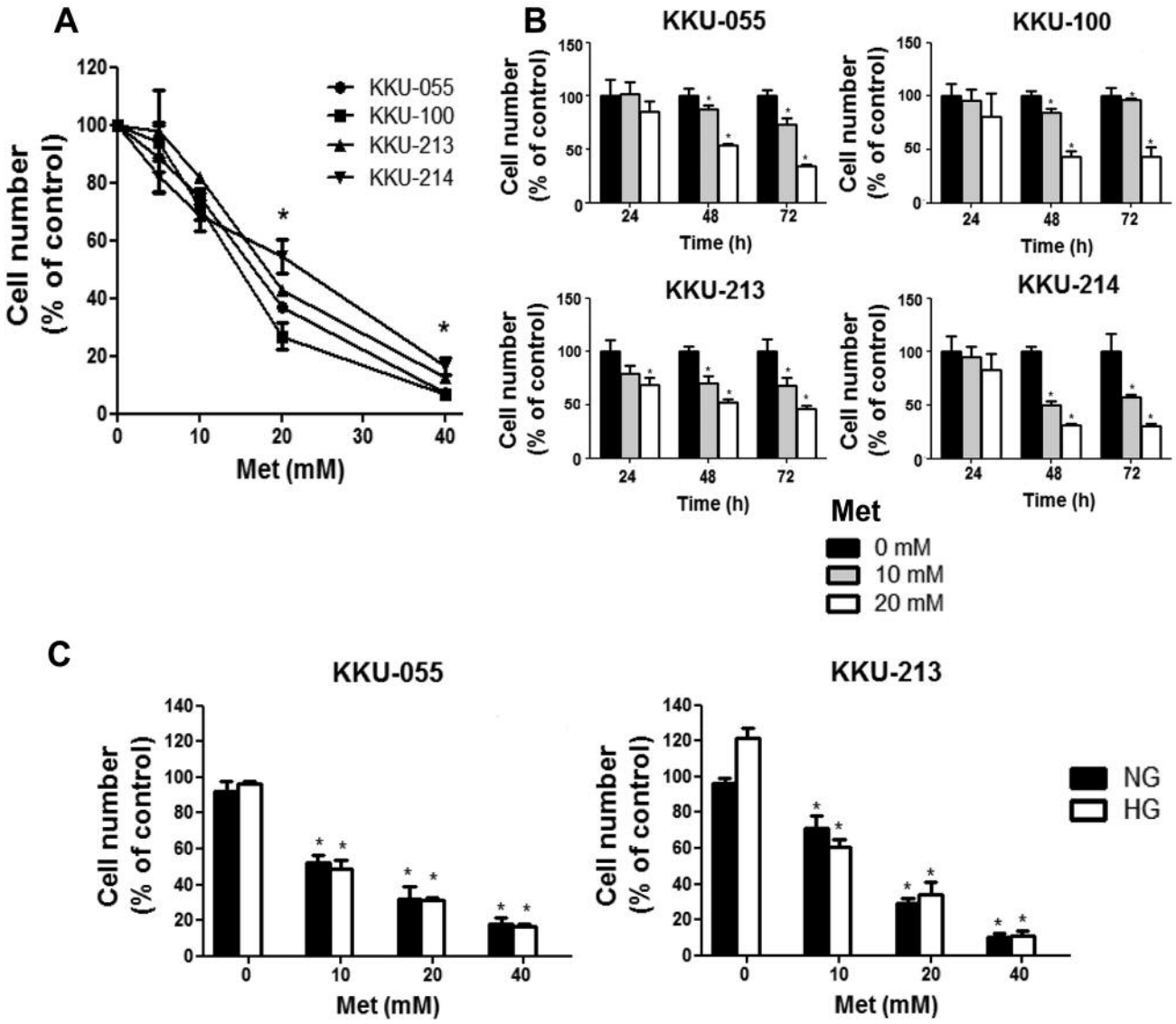


Figure 1. *Metformin exerted an antiproliferative effect on cholangiocarcinoma (CCA) cell lines in a dose- and time-dependent manner. Cells were treated with different concentrations of metformin for different times and the viable cells were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. A: Cells were cultured in the presence of 5, 10, 20 or 40 mM metformin for 48 h. B: CCA cells were treated with 10 or 20 mM metformin for 24, 48 and 72 h. Data are mean±SD of three independent experiments. *Significantly different from control of each time point, p<0.05. C: Metformin had similar growth inhibitory effects on CCA cells regardless of the glucose level in the medium. Data are the mean±SD from triplicate assays from one of two independent experiments (*p<0.05). NG: Normal glucose; HG: high glucose; Met: metformin.*

Results

Metformin suppressed proliferation of CCA cells regardless of glucose level. The effect of metformin on cell proliferation was first tested in four CCA cell lines cultured in medium with 10-40 mM of metformin for 48 h. The antiproliferative effect of metformin was observed in all CCA cell lines tested in a dose- (Figure 1A) and time- (Figure 1B) dependent manner. All CCA cell lines responded to metformin treatment in a similar manner, with a half-maximal inhibitory

Table I. *The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of metformin for cholangiocarcinoma cell lines after 48 h treatment.*

Cell line	IC_{50} (mM)
KKU-055	14.94±5.38
KKU-100	14.32±2.60
KKU-213	18.61±6.22
KKU-214	16.86±1.72

The IC_{50} (mean±SD) was calculated from three independent experiments.

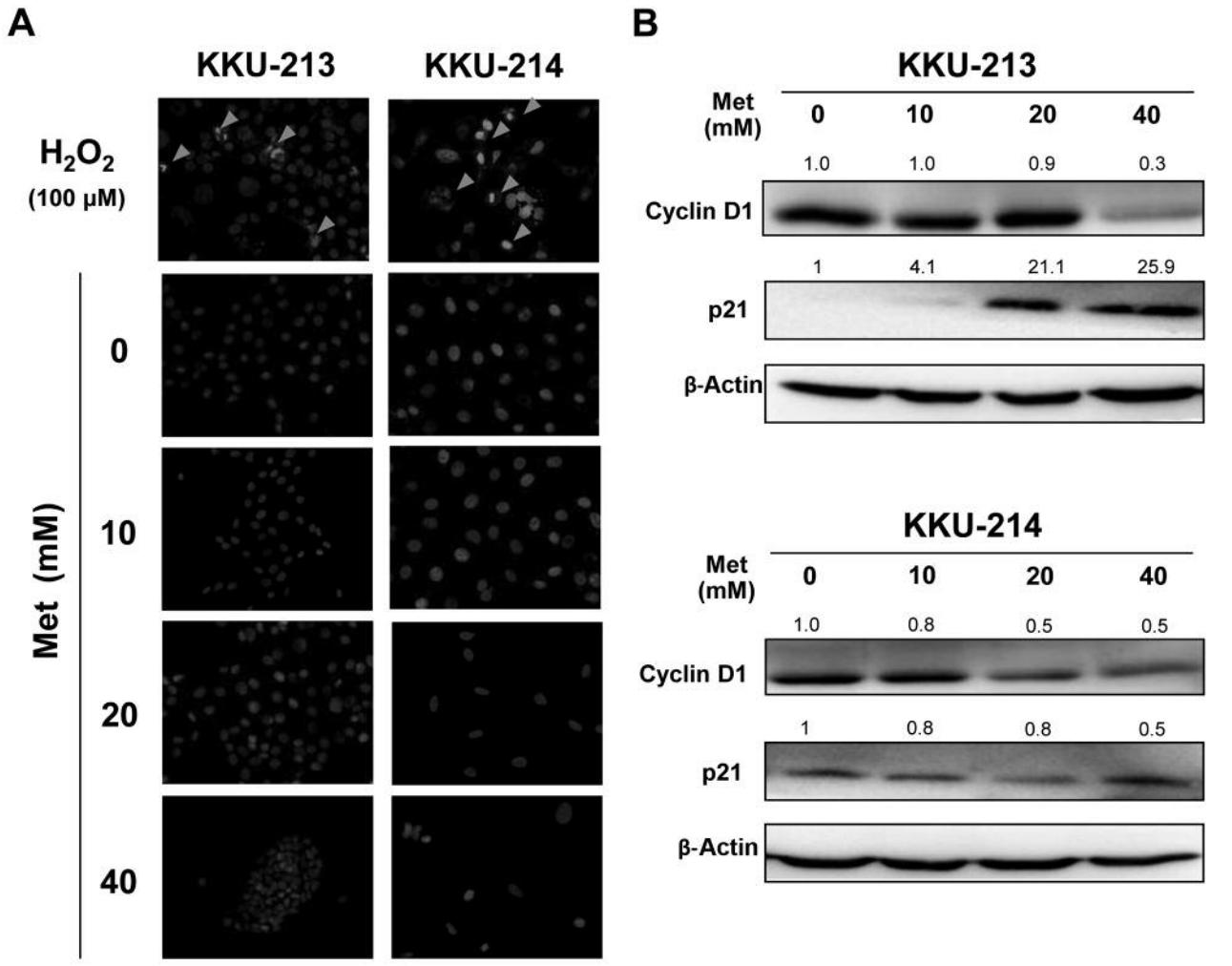


Figure 2. *Metformin inhibited cholangiocarcinoma cell growth without induction of apoptosis. A: Hoechst staining was used to demonstrate nuclear morphology and chromatin condensation of DNA. Cells were treated with 10-40 mM of metformin for 48 h. No chromatin condensation was noted in control nor in metformin-treated cells. H_2O_2 (100 μM) was used as a positive control to illustrate the feature of apoptotic nuclei (indicated by arrows). B: Western blot analysis of cell-cycle regulatory proteins: cyclin D1 and p21. Quantification of each protein was performed using β-actin as an internal control and compared by designating expression of the untreated sample as 1. Data are representative of two independent experiments. Met: Metformin.*

concentration (IC_{50}) that ranged from 14.3 to 18.6 mM (Table I).

As DM and CCA seem to be associated, and metformin is generally used for diabetic patients who have chronic hyperglycemia, it was next tested as to whether the antiproliferative effect of metformin would be effective in patients with normal blood glucose. The antiproliferative effect of metformin was then tested in KKU-055 and KKU-213 cells cultured in media with normal glucose or high glucose, in the presence or absence of metformin. The results showed that regardless of glucose concentration, metformin exhibited similar effects on growth inhibition in a dose-dependent manner (Figure 1C).

As apoptotic cells were not observed in metformin-treated cells, it was hypothesized that the antiproliferative activity of metformin should be, partly, due to growth suppression rather than apoptosis induction. To demonstrate this, KKU-213 and KKU-214 cells were treated with different concentrations of metformin for 48 h and apoptotic cells were observed using Hoechst staining. Cells treated with 100 μM hydrogen peroxide for 48 h were used as positive controls. As shown in Figure 2A, nuclear fragmentation and chromatin condensation were observed in the hydrogen peroxide-treated cells but were rarely observed in the cells treated with up to 40 mM metformin.

To affirm the cytostatic effect of metformin, cell-cycle regulatory proteins, namely cylclin D1 and p21, were

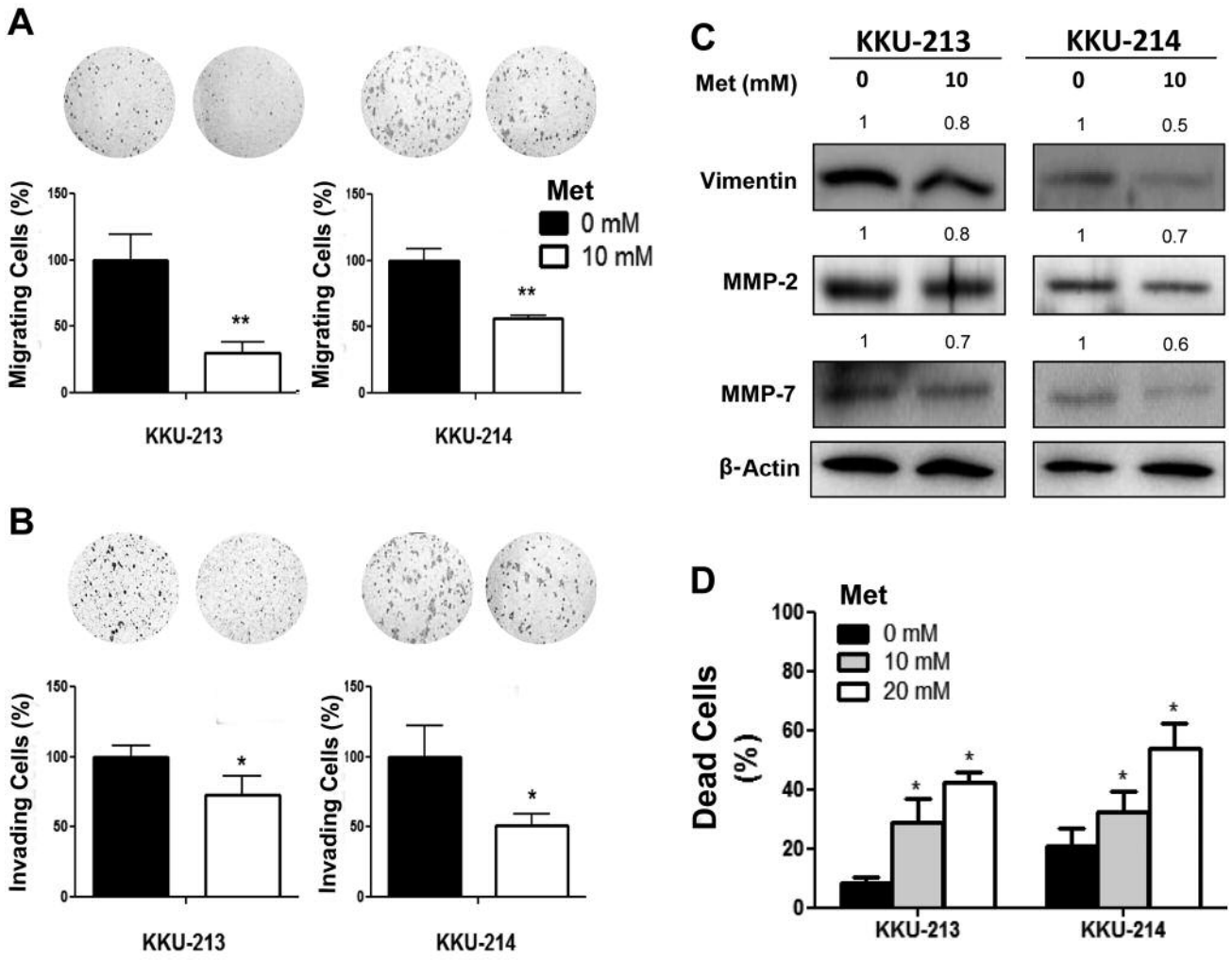


Figure 3. *Metformin suppressed migration and invasion and induced anoikis of cholangiocarcinoma cells. KKU-213 and KKU-214 cells were pretreated with 10 mM metformin for 24 h before being subjected to migration and invasion assays. Numbers of migrating (A) and invading (B) cells were counted and compared by assigning the controls a value of 100%. Data are the mean±SD of triplicates from one of two independent experiments. C: Western blots of vimentin, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -7. Quantification of each protein was performed using β-actin as an internal control and compared by designating expression of the untreated sample as 1. D: Anoikis resistance was assessed in the absence and presence of 10 or 20 mM metformin for 48 h. The number of dead cells was counted using the trypan blue dye exclusion assay. The data are representative of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01.*

determined in cells treated with metformin for 48 h. Compared to the untreated control cells, suppression of cyclin D1 and up-regulation of p21 were observed in CCA cells treated with increasing metformin concentrations (Figure 2B).

Low dose of metformin inhibited migration and invasion of CCA cells. CCA cells (KKU-213 and KKU-214) treated with 10 mM metformin for 24 h were used to examine the effect of metformin on migration and invasion, as this concentration did not significantly affect growth of CCA cells. After 24 h of metformin treatment, cells were allowed to migrate in the absence of metformin for 12 h for KKU-M213 and 24 h for KKU-M214. Metformin significantly reduced migrated cells to 30-50% and invaded cells to 50-70% of the controls (Figure 3A and B). To explore the underlying mechanism, the expression levels of vimentin, MMP2 and MMP7 were determined using western blotting. As shown in Figure 3C, the expressions of vimentin, MMP2 and MMP7 were reduced in metformin-treated compared to control cells.

Metformin induced anoikis of CCA cells. Anoikis resistance or resistance to apoptosis in non-adherent conditions is a key property of cells that metastasize.

Whether metformin can induce anoikis was next analyzed in CCA cells treated with 10 and 20 mM metformin in a 24-well ultralow attachment plate for 48 h. The total cells were harvested and the live *vs*. dead cells were determined using the trypan blue dye exclusion assay. As shown in Figure 3D, the basal percentage of dead cells induced by anoikis in the control cells was 10-20% of the total cell count. Metformin at 10 and 20 mM, however, significantly induced cell death by anoikis by up to 2- to 3-fold of that observed in the control cells.

Metformin activated AMPK. It is well documented that the conventional effect of metformin is through AMPK activation. The level of phosphorylation AMPKα, a stimulatory subunit of AMPK, were determined in CCA cells treated with 10 and 20 mM metformin for 48 h. The western blot results demonstrated that p-AMPKα was increased 3- to 4-fold in metformin-treated cells while total AMPKα remained unaltered (Figure 4A). The ratio of p-AMPKα to AMPKα of both cell lines increased respectively in metformin-treated cells.

Metformin inhibited nuclear localization of NF-κB and STAT3 without affecting their activations. Since the proteins affected by metformin treatment, as observed in this study, can be mediated by NF-κB and STAT3, important transcription factors in carcinogenesis and progression of CCA (15, 16), it was thus interesting to investigate whether metformin affected CCA cells *via* NF-κB or STAT3 pathways. The levels of NF-κB (p65) and STAT3 from whole-cell lysates of CCA cells treated with 10 and 20 mM metformin for 48 h and the control cells were determined using western blots. Under metformin treatment, the expression of NF-κB (p65) slightly increased in KKU-213 cells, but was unaltered in KKU-214 cells (Figure 4B). The western blots of STAT3 indicated that activation of STAT3 determined as the ratio of p-STAT3 (Y705 and S727) to STAT3 of the metformin-treated cells did not differ from that of the control cells (Figure 4B).

As nuclear translocation is the crucial step for NF-κB and STAT3 activation, the localization of NF-κB (p65) and STAT3 was investigated using immunocytofluorescent staining and nuclei were localized using Hoechst staining. These generated bright blue signals for NF-κB p65 and bright purple signals for STAT3 when these were localized in the nucleus. As demonstrated in Figure 4C, the signals of NF-κB (p65) and STAT3 of almost all of the control cells were localized in the nucleus. In contrast, the signals of NF-κB (p65) and STAT3 of the metformin-treated cells were mainly in the cytoplasm. These results indicate an inhibitory effect of metformin on the nuclear translocation of NF-κB (p65) and STAT3 in these CCA cell lines.

Discussion

Metastasis is a leading cause of death in all patients with cancer. It involves many biological processes such as invasion and migration to adjacent tissues and blood vessels, survival in the blood circulation and adhesion to secondary sites. Accumulated evidence suggests metformin to be a potential drug for suppressing the progression of tumors in many cancer types (5). The present study demonstrates the effects of metformin on the inhibitory mechanisms of *Opisthorchis viverrini*-associated CCA cells. Metformin exhibited dose- and time-dependent antiproliferative effects on CCA cells. In this study, it was additionally demonstrated for the first time that metformin at a non-antiproliferative dose significantly suppressed cell migration and invasion and the underlining mechanism was shown to be *via* the inhibition of nuclear translocation of NF-κB and STAT3.

In the current study, metformin effectively suppressed proliferation of CCA cell lines in a time- and dose-dependent manner. Metformin affected proliferation of CCA cells regardless of their chemo- or radioresistant behavior. The IC50 of all four CCA cell lines tested were similar in the range of 14.3-18.6 mM. KKU-100, a chemoresistant cell line (17) and KKU-055, a radioresistant clone (18), responded to metformin in the same manner. These effective doses were in agreement with reports on non-liver fluke-associated CCA (12, 19). Metformin also affected proliferation of CCA cells irrespectively of the glucose condition. DM has been considered as a common risk factor for various cancer types, including CCA (7). In addition, a high glucose condition can significantly enhance proliferation, migration and invasion of CCA cells (14). In the present study, metformin reduced proliferation not only of CCA cells cultured in normal glucose medium but also those cultured in high glucose medium. This information may imply an antitumor effect of metformin in patients with CCA regardless of diabetic condition.

Metformin inhibited proliferation of CCA cells without induction of apoptosis, as no obvious apoptotic cells were observed with metformin treatment. In addition, the western blot analyses indicated an increase of p21 and suppression of cyclin D1 in metformin-treated cells. These observations were in agreement with those previously reported in many cancer cell types (13, 20), including non-liver fluke-associated CCA cells (12, 19). In addition to cell-cycle regulatory proteins, the alteration of microRNA expression in metformin treated CCA cells was also noted (12, 21).

The present study also demonstrated, as far as we are aware of for the first time, the inhibitory effect of metformin on the metastatic potential of CCA cells. At low doses, metformin significantly suppressed migration and invasion, and induced anoikis of CCA cells. The molecular basis underlying these observations in metformin-treated cells was

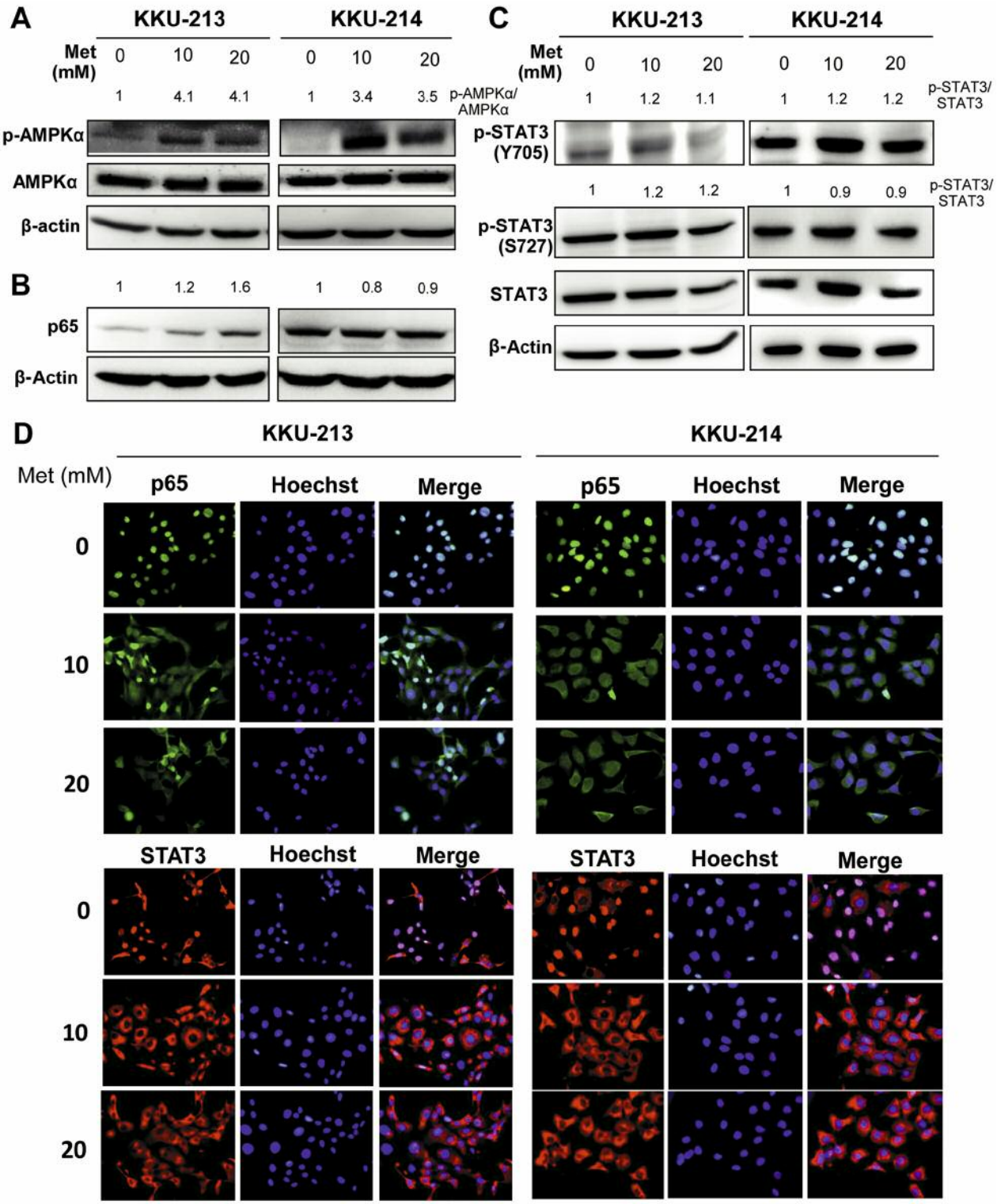


Figure 4. *Metformin increased phosphorylated-5' adenosine monophosphate activated protein kinase (p-AMPK) and inhibited nuclear localization of nuclear factor-kappa B (NF-κB) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Cholangiocarcinoma cells were cultured in the absence or presence of 10 or 20 mM metformin for 48 h before western blot analysis. A: p-AMPKα and AMPKα, B: total NF-κB (p65), and C: p-STAT3 (Y705 and S727) and STAT3. Quantification of each protein was performed using β-actin as an internal control and compared by designating expression of the untreated sample as 1. D: Cells were treated with 10 or 20 mM metformin for 24 h and the cellular localizations of NF-κB (p65) (green) and STAT3 (red) were observed using immunocytofluorescent staining, ×400 magnification. Met: Metformin.*

shown to be *via* suppression of vimentin, a marker of epithelial–mesenchymal transition related to cell motility, and anoikis, along with MMP2 and MMP7, essential enzymes for extracellular matrix degradation. These three markers are known to be under regulation of several key pathways, including STAT3 and NF-κB (22).

The conventional effect of metformin is trough the indirect activation of AMPK, however, there are many consequent transcription factors and signaling pathways activated/inactivated in responses to AMPK activation (5). Apart from AMPK, metformin exerts anticancer effects *via* multiple pathways, *e.g.* inhibition of the mTOR pathway in CCA (19), a decrease of forkhead box protein M1 (FOXM1) in leukemia (23), suppression of STAT3 activation in lung adenocarcinoma (24)and in triple-negative breast cancer (25), and inactivation of STAT3 and NF-κB in several cancer cell lines (26, 27).

In the present study, metformin activated the AMPK pathway as the level of p-AMPK in CCA cells actually increased in metformin-treated cells. To investigate the alternative pathways in response to metformin treatment, NF-κB and STAT3, the major transcription factors reported in development and progression of liver fluke-associated CCA (15, 16) were further examined. The results from western blots of whole-cell lysates showed no differences of p-STAT3 at both Y705 and S727 and the expression levels of p65 between the controls and the metformin-treated cells. This indicates that metformin had no effect on STAT3 phosphorylation and NF-κB expression. In contrast, the strong reduction of nuclear localization of STAT3 and p65 was observed in metformin-treated cells. Nuclear translocation of STAT3 and p65 is an important step to complete the activation of both transcriptional factors. Suppression of nuclear translocation of STAT3 and p65 may reduce the expression of their downstream regulated genes, *e.g.* vimentin, MMP2 and MMP7, as shown in this study. These assumptions are supported by several previous reports showing that inhibition of STAT3 and NF-κB activation using specific inhibitors significantly suppressed growth (14, 16), migration and invasion (28) of CCA cells.

The effects of metformin on the activation of STAT3 and the expression of NF-κB have been reported in many studies (24, 25, 29-31). In the present study, these effects of metformin were not observed, however, the effects of metformin on nuclear translocation of STAT3 and NF-κB were pronounced. This effect of metformin on nuclear translocation of NF-κB (p65) was reported for the first time in the present study.

Taken together, the findings of this study indicate the additional effect of metformin on anti-metastatic properties of CCA cell lines. This action of metformin concurs with the observation of longer survival of patients with CCA with DM who received metformin than those without metformin treatment (21). The findings from this study are important in repurposing metformin as a drug of choice for CCA treatment, as metformin has several advantages in the treatment of CCA: i) Metformin affects CCA cells regardless of their etiology. Metformin effectively suppressed growth of liver fluke-associated and non-liver fluke-associated CCA. ii) Metformin effectively inhibited growth of CCA cells unrelated to the background of chemo- or radioresistant behavior: both a chemoresistant CCA cell line, KKU-100 and a radioresistant clone, KKU-055, were sensitive to metformin treatment in a similar manner. iii) A low dose of metformin can suppress metastatic activity of CCA cells. iv) Lastly, because metformin is already used in clinical practice, its safety and efficacy are known. Since CCA is a highly metastatic and highly recurrent cancer, the antimetastatic activity of metformin may be of an advantage for patients with CCA with metastasis. Further studies in animal models should be conducted to ensure the efficacy of the anticancer effect of metformin, either as a single drug or as a part of a combined treatment for CCA.

Acknowledgements

This work was co-supported by research grants from Khon Kaen University and the TRF Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund to S. Wongkham (RTA5780012), a Khon Kaen University Research grant (KKU59) to U. Cha'on and a research grant from the Junior Science Talent Project (JSTP), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) to C. Saengboonmee (JSTP-06-56-01E). C. Seangboonmee also thanks Faculty of Medicine, Khon Kaen University for the support of the BSc-PhD-MD program. We would like to thank Professor James A. Will for editing this article *via* the Faculty of Medicine Publication Clinic, Khon Kaen University, Thailand.

References

1 Vatanasapt V, Tangvoraphonkchai V, Titapant V, Pipitgool V, Viriyapap D and Sriamporn S: A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health *21*: 489-494, 1990.

2 Ben-Menachem T: Risk factors for cholangiocarcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol *19*: 615-617, 2007.

3 Li M, Li J, Li P, Li H, Su T, Zhu R and Gong J: Hepatitis B virus infection increases the risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis and systematic review. J Gastroenterol Hepatol *27*: 1561-1568, 2012.

4 Bhudhisawasdi V, Talabnin C, Pugkhem A, Khuntikeo N, Seow OT, Chur-in S, Pairojkul C and Wongkham S: Evaluation of postoperative adjuvant chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma patients undergoing R1 and R2 resections. Asian Pac J Cancer Prev *13(Suppl)*: 169-174, 2012.

5 Pernicova I and Korbonits M: Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol *10*: 143-156, 2014.

6 Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G and Vigneri R: Diabetes and cancer. Endocr Relat Cancer *16*: 1103-1123, 2009.

7 Saengboonmee C, Seubwai W, Wongkham C and Wongkham S: Diabetes mellitus: Possible risk and promoting factors of cholangiocarcinoma: Association of diabetes mellitus and cholangiocarcinoma. Cancer Epidemiol *39*: 274-278, 2015.
8 Belfiore A and Malaguarnera R: Insulin receptor and cancer. Endocr Relat Cancer *18*: R125-147, 2011.
9 Garcia-Jimenez C, Garcia-Martinez JM, Chocarro-Calvo A and De la Vieja A: A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/β-catenin signaling by high glucose. J Mol Endocrinol *52*: R51-66, 2014.
10 Fedirko V, Lukanova A, Bamia C, Trichopolou A, Trepo E, Nothlings U, Schlesinger S, Aleksandrova K, Boffetta P, Tjonneland A, Johnsen NF, Overvad K, Fagherazzi G, Racine A, Boutron-Ruault MC, Grote V, Kaaks R, Boeing H, Naska A, Adarakis G, Valanou E, Palli D, Sieri S, Tumino R, Vineis P, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Siersema PD, Peeters PH, Weiderpass E, Skeie G, Engeset D, Quiros JR, Zamora-Ros R, Sanchez MJ, Amiano P, Huerta JM, Barricarte A, Johansen D, Lindkvist B, Sund M, Werner M, Crowe F, Khaw KT, Ferrari P, Romieu I, Chuang SC, Riboli E and Jenab M: Glycemic index, glycemic load, dietary carbohydrate and dietary fiber intake and risk of liver and biliary tract cancers in Western Europeans. Ann Oncol *24*: 543-553, 2013.
11 Chaiteerakij R, Yang JD, Harmsen WS, Slettedahl SW, Mettler TA, Fredericksen ZS, Kim WR, Gores GJ, Roberts RO, Olson JE, Therneau TM and Roberts LR: Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma: association between metformin use and reduced cancer risk. Hepatology *57*: 648-655, 2013.
12 Fujimori T, Kato K, Fujihara S, Iwama H, Yamashita T, Kobayashi K, Kamada H, Morishita A, Kobara H, Mori H, Okano K, Suzuki Y and Masaki T: Antitumor effect of metformin on cholangiocarcinoma: *In vitro* and *in vivo* studies. Oncol Rep *34*: 2987-2996, 2015.
13 Cai X, Hu X, Tan X, Cheng W, Wang Q, Chen X, Guan Y, Chen C and Jing X: Metformin induced AMPK activation, G_0/G_1 phase cell cycle arrest and the inhibition of growth of esophageal squamous cell carcinomas *in vitro* and *in vivo*. PLoS One *10*: e0133349, 2015.
14 Saengboonmee C, Seubwai W, Pairojkul C and Wongkham S: High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells *via* STAT3 activation. Sci Rep *6*: 18995, 2016.
15 Dokduang H, Techasen A, Namwat N, Khuntikeo N, Pairojkul C, Murakami Y, Loilome W and Yongvanit P: STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. J Hepatobiliary Pancreat Sci *21*: 767-776, 2014.
16 Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Khuntikeo N, Pugkhem A, Hahnvajanawong C, Chaiyagool J, Umezawa K, Okada S and Wongkham S: Aberrant expression of NF-κB in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy. PLoS One *9*: e106056, 2014.
17 Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V and Tassaneeyakul W: Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. World J Gastroenterol *11*: 2748-2753, 2005.
18 Hematulin A, Sagan D, Sawanyawisuth K, Seubwai W and Wongkham S: Association between cellular radiosensitivity and G_1/G_2 checkpoint proficiencies in human cholangiocarcinoma cell lines. Int J Oncol *45*: 1159-1166, 2014.
19 Ling S, Feng T, Ke Q, Fan N, Li L, Li Z, Dong C, Wang C, Xu F, Li Y and Wang L: Metformin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. Oncol Rep *31*: 2611-2618, 2014.
20 Quattrini I, Conti A, Pazzaglia L, Novello C, Ferrari S, Picci P and Benassi MS: Metformin inhibits growth and sensitizes osteosarcoma cell lines to cisplatin through cell-cycle modulation. Oncol Rep *31*: 370-375, 2014.
21 Jiang X, Ma N, Wang D, Li F, He R, Li D, Zhao R, Zhou Q, Wang Y, Zhang F, Wan M, Kang P, Gao X and Cui Y: Metformin inhibits tumor growth by regulating multiple miRNAs in human cholangiocarcinoma. Oncotarget *6*: 3178-3194, 2015.
22 Bollrath J and Greten FR: IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. EMBO Rep *10*: 1314-1319, 2009.
23 Zhang B, Liu LL, Mao X and Zhang DH: Effects of metformin on FOXM1 expression and on the biological behavior of acute leukemia cell lines. Mol Med Rep *10*: 3193-3198, 2014.
24 Zhao Z, Cheng X, Wang Y, Han R, Li L, Xiang T, He L, Long H, Zhu B and He Y: Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial–mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. PLoS One *9*: e95884, 2014.
25 Deng XS, Wang S, Deng A, Liu B, Edgerton SM, Lind SE, Wahdan-Alaswad R and Thor AD: Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. Cell Cycle *11*: 367-376, 2012.
26 Hirsch HA, Iliopoulos D and Struhl K: Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. Proc Natl Acad Sci USA *110*: 972-977, 2013.
27 Tan XL, Bhattacharyya KK, Dutta SK, Bamlet WR, Rabe KG, Wang E, Smyrk TC, Oberg AL, Petersen GM and Mukhopadhyay D: Metformin suppresses pancreatic tumor growth with inhibition of NFκB/STAT3 inflammatory signaling. Pancreas *44*: 636-647, 2015.
28 Aneknan P, Kukongviriyapan V, Prawan A, Kongpetch S, Sripa B and Senggunprai L: Luteolin arrests cell cycling, induces apoptosis and inhibits the JAK/STAT3 pathway in human cholangiocarcinoma cells. Asian Pac J Cancer Prev *15*: 5071-5076, 2014.
29 Lin CC, Yeh HH, Huang WL, Yan JJ, Lai WW, Su WP, Chen HH and Su WC: Metformin enhances cisplatin cytotoxicity by suppressing signal transducer and activator of transcription-3 activity independently of the liver kinase B1-AMP-activated protein kinase pathway. Am J Respir Cell Mol Biol *49*: 241-250, 2013.
30 Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, Kwon KI, Kim BH, Kim SK, Song GY, Jeong TC and Jeong HG: Metformin inhibits P-glycoprotein expression *via* the NF-kappaB pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. Br J Pharmacol *162*: 1096-1108, 2011.
31 Gu J, Ye S, Wang S, Sun W and Hu Y: Metformin inhibits nuclear factor-κB activation and inflammatory cytokines expression induced by high glucose *via* adenosine monophosphate-activated protein kinase activation in rat glomerular mesangial cells *in vitro*. Chin Med J *127*: 1755-1760, 2014.

Received November 4, 2016
Revised November 25, 2016
Accepted November 29, 2016

ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/317268892

Berberine Induces Cell Cycle Arrest in Cholangiocarcinoma Cell Lines via Inhibition of NF-κB and STAT3 Pathways

Article *in* Biological & Pharmaceutical Bulletin · June 2017

DOI: 10.1248/bpb.b16-00428

CITATIONS
0

READS
34

7 authors, including:

Wunchana Seubwai
Faculty of Medicine, Khon Kaen University
35 PUBLICATIONS **201** CITATIONS
SEE PROFILE

Kulthida Vaeteewoottacharn
Khon Kaen University
49 PUBLICATIONS **273** CITATIONS
SEE PROFILE

Ubon Cha'on
Khon Kaen University
17 PUBLICATIONS **94** CITATIONS
SEE PROFILE

Sopit Wongkham
Khon Kaen University
203 PUBLICATIONS **2,475** CITATIONS
SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:

Medical laboratory research. View project

Tracking glucose and its metabolism as therapeutic targets for cholangiocarcinoma View project

All content following this page was uploaded by Kulthida Vaeteewoottacharn on 05 June 2017.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

Regular Article

Berberine Induces Cell Cycle Arrest in Cholangiocarcinoma Cell Lines *via* Inhibition of NF-κB and STAT3 Pathways

Nattapong Puthdee,[a,b] Wunchana Seubwai,*[,b,c] Kulthida Vaeteewoottacharn,[a,b] Thidarut Boonmars,[b,d] Ubon Cha'on,[a,b] Chatchai Phoomak,[a,b] and Sopit Wongkham[a,b]

[a] *Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University; Khon Kaen 40002, Thailand:* [b] *Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University; Khon Kaen 40002, Thailand:* [c] *Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University; Khon Kaen 40002, Thailand: and* [d] *Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University; Khon Kaen 40002, Thailand.*
Received May 26, 2016; accepted March 9, 2017

Berberine is a natural compound found in several herbs. Anticancer activity of berberine was reported in several cancers, however, little is known regarding the effects of berberine against cholangiocarcinoma (CCA). In this study, the growth inhibitory effects of berberine on CCA cell lines and its molecular mechanisms were explored. Cell growth and cell cycle distribution were examined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and flow cytometry. The expression levels of cell cycle regulatory proteins were determined by Western blot analysis. Berberine significantly inhibited growth of CCA cell lines in a dose and time dependent fashion. The inhibition was largely attributed to cell cycle arrest at the G1 phase through the reduction of cyclin D1, and cyclin E. Moreover, berberine could reduce the expression and activation of signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3) and probably nuclear factor-kappaB (NF-κB) *via* suppression of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 action. These results highlight the potential of berberine to be a multi-target agent for CCA treatment.

Key words cholangiocarcinoma; berberine; cell cycle arrest; nuclear factor-kappaB; signal transducer and activator of transcription 3

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant tumor which originates from the biliary epithelium. CCA is a rare cancer worldwide but the incidence is very high in northeastern Thailand. The epidemiology and experimental evidence indicates that the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* (*Ov*), is a major risk factor for CCA in Thailand.[1,2] Current treatment for CCA is based on surgery, but its success is still limited due to late presentation and delayed diagnosis. Adjuvant chemotherapy to improve the therapeutic outcome for CCA has been attempted and continuously investigated.[3] The results, however, were unsatisfactory due to drug resistance. Therefore, searching for new chemotherapeutic agents for an effective CCA treatment is urgently required.

Berberine is an isoquinoline alkaloid which is abundant in several medicinal Chinese plants, such as *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* and *Berberis aristata*.[4] Recently, berberine has been used for treatments of various diseases, *e.g.*, type 2 diabetes, hypercholesterolemia and diarrhea without obvious toxicity to humans.[5] Currently, anti-cancer activity of berberine has been reported. The strong anti-tumor growth *via* induction of cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of metastasis have been shown in several *in vitro* and *in vivo* studies.[6–8] Little, however, is known about the anti-cancer activities of berberine on CCA. The present work was aimed to determine the anti-cancer activities and potential molecular mechanisms of berberine on CCA cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Berberine Berberine chloride powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) was solubilized in warm distilled water, filtered through 0.2 micron filters and stored at −20°C until use.

Cell Culture Two human CCA cell lines, KKU-213 and -214, were established from primary tumors[3] of a Thai CCA patient and registered at the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, Osaka, Japan. The immortalized normal cholangiocyte cell line, MMNK-1, was generated and supplied by Prof. Naoya Kobayashi.[9] These cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (Gibco, NY, U.S.A.) at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere.

Cell Proliferation The anti-proliferative activities of berberine were determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Invitrogen, CA, U.S.A.). Cells (5×10^3 per well) were seeded in a 96 well plate and incubated overnight before being treated with various concentrations of berberine for 24, 48 and 72 h. Cells treated with water were used as controls. At the end of incubation time, MTT was added and incubated for 3 h. Then the formazan crystals were solubilized by acid isopropanol and the absorbance was measured at 540 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (TECAN Sunrise, Mannedorf, Switzerland). The IC_{50} for berberine was determined from the log concentration effect curves using non-linear regression analysis in Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., CA, U.S.A.).

Cell Cycle Analysis Cell cycle distributions were determined using propidium iodide (PI) (Invitrogen) staining and flow cytometry. After being treated with berberine for 24 and 48 h, adherent cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), trypsinized, resuspended in 70% cold ethanol and stored at −20°C overnight. Cell pellets were washed

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: wunchanas@yahoo.com

© 2017 The Pharmaceutical Society of Japan

twice with PBS, resuspended in staining solutions (5 μg/mL PI in PBS) and incubated on ice for 10 min in the dark. Cell cycle distributions were determined using flow cytometry (BD FACSCanto II, BD Bioscience, CA, U.S.A.) and data were analyzed using BD FACSDiva software (BD Bioscience).

Protein Preparation and Western Blotting After berberine treatment, cells were lysed with Nonidet P-40 (NP-40) lysis buffer. Protein lysates of 30 μg were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.). The immunoreactivity was detected by incubating with Amersham ECL Prime (GE Healthcare). Intensity of each protein band was measured using a Gel-Pro Analyzer, software version 3 (Media Cybernetics, MD, U.S.A.).

Sources of antibodies were as followed: anti-Cyclin D1 (H-295), anti-Cyclin E (C-19), anti-nuclear factor-kappaB (NF-κB) p50 (E-10), anti-NF-κB p65 (F-6), anti-NF-κB p52 (C-5), anti-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (C-20), anti-p-STAT3 (B-7), anti-p-STAT3 (serine (Ser) 727), anti-extracellular signal-regulated kinases (ERK1) (K-23), anti-p-ERK (E-4) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.), and anti-β actin (AC-15) was from Sigma-Aldrich.

Statistical Analysis The results are presented as a mean±standard deviation (S.D.) from at least three separate experiments. Statistical significance was determined using Student's *t*-test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Berberine Inhibited Growth of CCA Cell Lines To determine the effect of berberine on the proliferation of CCA cells, two human CCA cell lines, KKU-213 and -214, and the immortalized human cholangiocyte cell line, MMNK-1, were treated with 0–160 μM berberine for 24, 48 and 72 h and the viable cells were determined using the MTT assay. As shown in Fig. 1, berberine inhibited growth of all cell lines in a dose- and time-dependent manner. Berberine, however, was more effective in suppressing proliferation of KKU-213 and -214 than MMNK-1 cells. The IC_{50}s of berberine for KKU-213 at 48 and 72 h were 10.3±3.5 and 4.2±0.3 μM and those for KKU-214 were 9.3±1.2 and 3.0±1.0 μM, whereas those of MMNK-1 cells were >160 and 133±15 μM (Supplementary Table 1).

Berberine Induced G1 Phase Cell Cycle Arrest *via* Inhibition of Cell Cycle Regulatory Proteins To determine the effect of berberine on cell cycle distribution, CCA cell lines were treated with 5, 10 and 20 μM of berberine for 24 and 48 h, stained with propidium iodide and subjected to flow cytometry. As shown in Fig. 2A, the G1 phase cells of cells treated with berberine were gradually increased with the increase of time and dose. Compared to the control cells, the accumulations of cells at G1 phase were significantly observed in KKU-213 and -214 treated with 10 and 20 μM berberine at 24 and 48 h.

To investigate the mechanisms by which berberine induced G1 phase arrest, the expression of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1 and cyclin E were determined. Western blot analyses showed that supplementation of berberine inhibited the expressions of cyclin D1 and cyclin E of both KKU-213 and -214 cells (Fig. 2B) in dose and time dependent fashions. These results indicated that berberine inhibited cell cycle progression from G1 to S phase by suppression of G1 phase regulatory proteins.

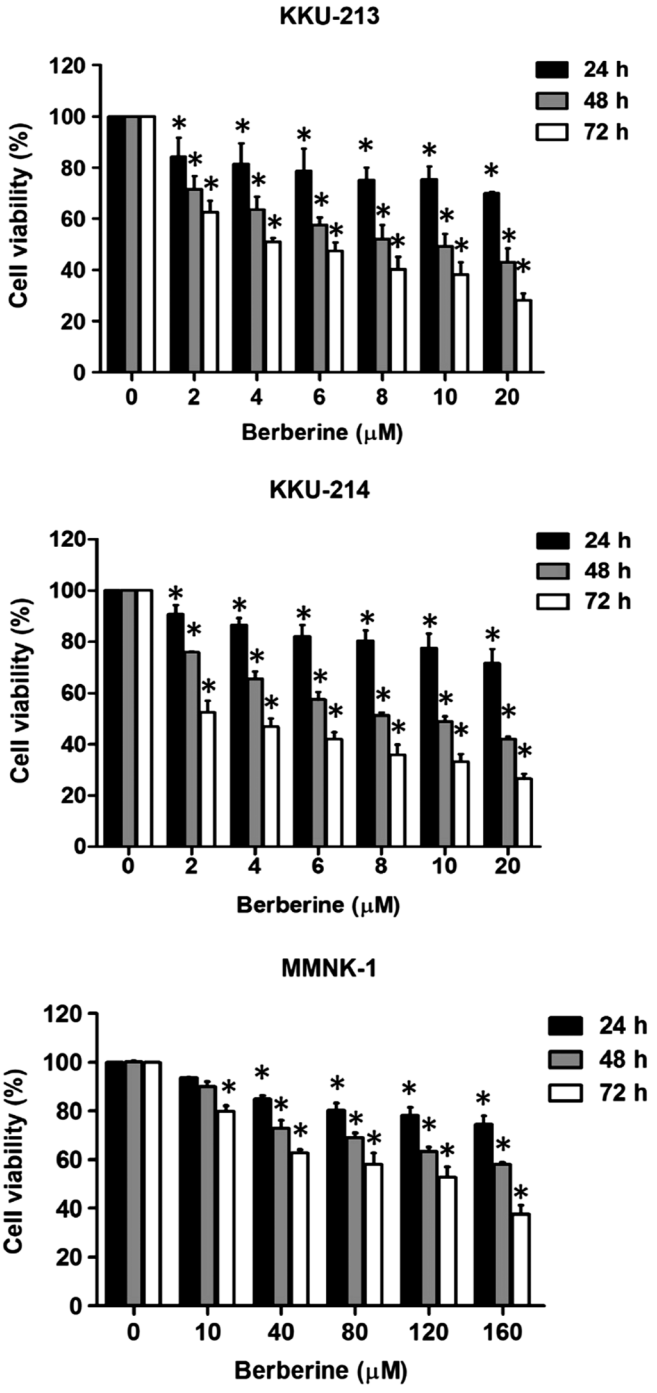


Fig. 1. Berberine Preferentially Inhibits CCA Cell Proliferation

The anti-proliferative effects were determined by the MTT assay. These results are presented as percentage of cell numbers relative to untreated cells. A bar graph represents the mean±S.D. from three independent experiments. *$p \leq 0.05$.

Berberine Suppressed the Activation of STAT3 and NF-κB Pathways NF-κB, a key transcription factor involved in cancer progression,[10,11] has been shown to be activated and overexpressed in many cancers including CCA. Berberine was then investigated as to whether it affected the action of NF-κB in CCA cells. The expression levels of NF-κB (p50/p105, p52/p100 and p65) in berberine treated cells were determined

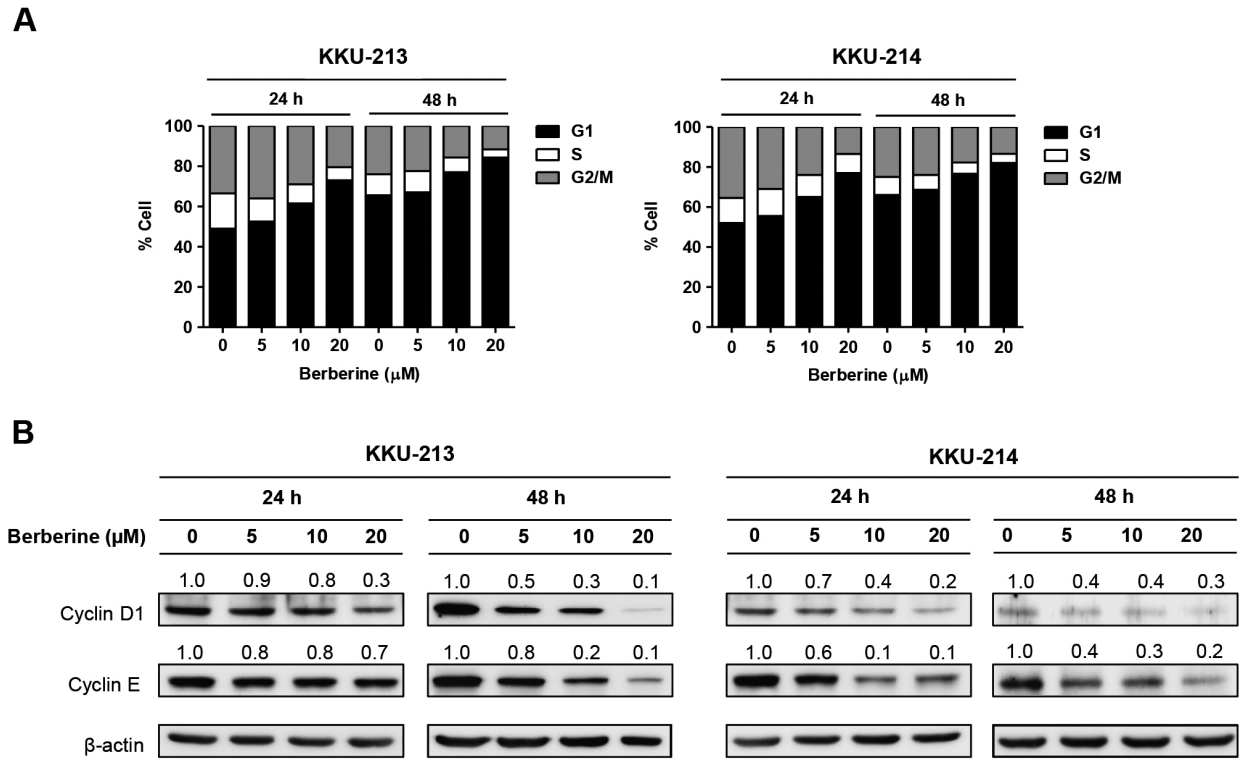


Fig. 2. Berberine Induces G1 Cell Cycle Arrest *via* Decreasing Expression of G1 Cell Cycle Regulatory Proteins in CCA Cell Lines

Cell cycle distribution is represented as mean percentage of cells in each phase. (A) Cell cycle regulatory proteins, cyclin D1 and cyclin E were determined by Western blot analysis. *β*-Actin was used to verify equal protein loading. (B) Intensity of each band was normalized with actin and compared relative to untreated cells (=1), as indicated by the number shown on the top of each band. The data are the representation of two independent experiments.

using Western blotting. Expressions of p50, p52, p65 and its precursors p105, p100 were gradually decreased in berberine treated KKU-213 cells according to the incubation times and doses of berberine (Fig. 3A). The effect of berberine on NF-*κ*B, however, was not demonstrated in KKU-214 treated cells.

As berberine is also known for its action on STAT3,[12–14] the effect of berberine on STAT3 signaling was further explored. The Western blot analyses of STAT3 and pSTAT3 (tyrosine (Tyr) 705, and Ser 727) were performed in CCA cells treated with berberine in comparison with the control cells. Berberine reduced STAT3 expression and inhibited the phosphorylation of both STAT3 at Tyr705 and Ser727 related to dose- and time-dependent manners (Fig. 3B). At 48 h of 20 μM berberine treatment, the expression levels of p-STAT3 (Tyr705) in berberine treated cells were reduced from 1.0 to 0.1–0.2 and those of p-STAT3 (Ser727) were reduced from 1.0 to 0.2–0.4.

Berberine Suppressed the Expressions and Activations of ERK For a better understanding of the molecular mechanism of berberine on NF-*κ*B and STAT3, the effect of berberine on the expression of extracellular signal-regulated kinase (ERKs), a STAT3 and NF-*κ*B regulatory protein, was explored. The results showed that berberine could reduce the expression and phosphorylation of ERK1/2 in CCA cell lines, KKU-213 and -214, as compared to the untreated cells (Fig. 4).

DISCUSSION

The intensive studies of berberine, an extracted compound from roots and stem barks of the *Berberis* species, showed the promising outcomes of berberine in inhibiting cancer cell proliferation and metastasis as well as inducing apoptosis in several cancer cell lines. The present study reported for the first time that berberine significantly suppressed growth of CCA cells *via* inhibitions of ERK1/2, NF-*κ*B and STAT3 pathways.

The anti-cancer activity effects of berberine in the non-*Ov*-associated human CCA cell line, QBC939 were shown to be *via* the induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis.[15] Similar results were also observed in an *Ov*-associated CCA hamster cell line.[16] The underlying molecular mechanisms of berberine induced cell cycle arrest and apoptosis in CCA cells, however, have remained unrevealed.

In the present study, the anti-proliferative effects of berberine were determined in the *Ov*-associated human CCA cell lines, KKU-213 and -214 and in the immortal cholangiocytes, MMNK1. Berberine could inhibit proliferations of all cell lines in dose- and time- dependent fashions. The anti-proliferative activity of berberine, however, is preferentially active on CCA cells rather than normal cholangiocytes, as the IC_{50} of berberine to MMNK-1 was >30 times that of CCA cells at 72 h. This observation is similar to those reported for normal osteoblast cells,[16] Chang liver cells, a non-tumor liver cell line[17] and normal human keratinocytes.[18]

The anti-cancer activity effects of berberine were also reported in the non-*Ov*-associated human CCA cell line, QBC939.[12] *Ov*-associated human CCA cell lines, KKU-213 and -214, however, were more sensitive to berberine than the non *Ov*-associated CCA cell line, QBC939, as the effective doses of KKU-213, -214 were 2–20 μM *vs.* 10–80 μM of QBC939. Berberine seems preferentially active on CCA cell lines rather than on other cancer cell lines when comparing the IC_{50} of berberine on several cancer cell lines, *e.g.*,

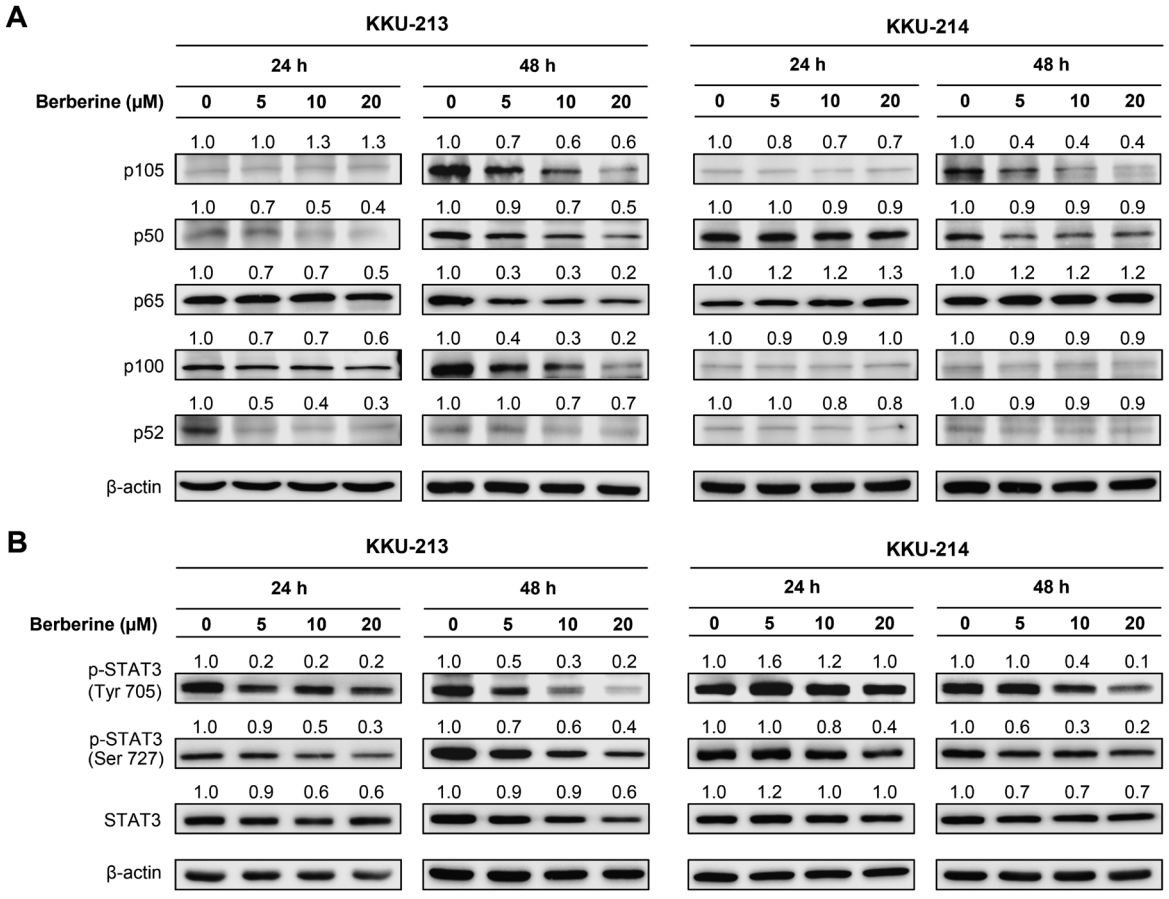


Fig. 3. Effects of Berberine on the NF-κB and STAT3 Activation and Expression in CCA Cell Lines

After treatment with or without berberine (5, 10 and 20 μM) for 24 and 48 h, proteins were collected and subjected to Western blot analysis to determine the expression level of (A) NF-κB proteins (p100, p52, p105, p50 and p65) and (B) STAT3, p-STAT3 (Tyr705) and p-STAT3 (Ser727). Normalized band intensities are presented. The data are the representation of two independent experiments.

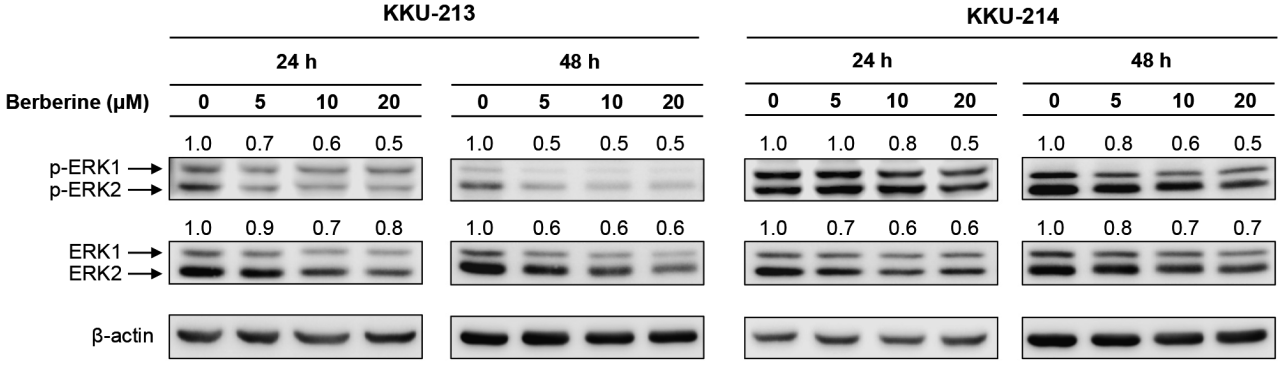


Fig. 4. Berberine Reduces ERKs Action in CCA Cell Lines

Expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 in KKU-213 and -214 cells were determined using Western blot analysis. Normalized expression levels are indicated. The data are the representation of two independent experiment.

epidermoid carcinoma A431 cells,[19] neuroblastoma cells,[20] and prostate carcinoma cells (LNCaP, DU145 and PC-3).[21] The sensitivity and selectivity of berberine on CCA cells demonstrated the potential use of berberine as supplementary therapy for CCA.

The growth inhibitory effects of berberine have been shown to be due to the induction of cell cycle arrest and/or promotion of cell death, depending on the cancer types and doses of berberine. In the present study, 10–20 μM of berberine significantly induced G1 arrest in CCA cells in dose and time dependent fashions. The induction of cell cycle arrest at G1 phase by low doses of berberine ($<50\,\mu$M) were demonstrated in several cancer cell lines including human bladder cancer cells,[22] a murine leukemia cell line[23] and a non-*Ov*-associated CCA cell line.[15] In addition, high doses of berberine ($>50\,\mu$M) promoted G2/M arrest or induction of apoptosis as reported in many human cancer cells, *e.g.*, gastric cancer[24] and prostate cancer.[25]

The induction of cell cycle arrest at G1 to S phase by berberine was further demonstrated in the present study to be through the suppression of cyclin D1 and cyclin E expressions. This observation is in accordance with the previous report

in QBC939 CCA cells, however, only suppression of cyclin D1 but not cyclin E expression was shown in QBC939 CCA cells.[15] It is well known that cyclin E acts after cyclin D1 in regulation of the G1/S phase transition, and is the critical and essential step for progressing cells into the S phase.[26] The present results suggest that berberine inhibited the initiation and progression of the G1 phase and effectively halted CCA cells at the G1 phase. This is possibly the reason for the high sensitivity of CCA cells to berberine compared to other cancer cells.

Berberine affected STAT3, a major pathway that plays vital roles in pathogenesis of many cancers including CCA.[11] The present study demonstrated that berberine inhibited the expression of STAT3 and phosphorylation of STAT3 at both Tyr705 and Ser727 in both CCA cell lines. A similar effect was reported in nasopharyngeal carcinoma cells.[12]

NF-κB, a transcription factor that controls expression of many genes involved in carcinogenesis and cancer progression, is constitutively activated in many tumor cells including CCA.[10] Suppression of NF-κB significantly reduced growth, cell motility and induced apoptosis of cancer cells. Berberine can inhibit NF-κB in many ways. It was shown in a primary effusion lymphoma cell line that berberine suppressed the phosphorylation of inhibitor of kappa B kinase (IKK) and inhibitor of κB (IκB), and degradation of IκB.[27] In human lung cells, berberine was shown to directly inhibit NF-κB activity by modification of cysteine-179 of the IKK-β subunit, resulting in the inhibition of transcriptions of several NF-κB targeted genes including cyclin D1.[28]

The present study demonstrated that berberine exhibited similar anti-tumor activity against 2 CCA cell lines, KKU-213 and -214. Berberine suppressed the expression and activation of STAT3 and ERK in both cell lines at a comparable level, however, berberine had a stronger effect on the expression and activation of NF-κB in KKU-213 than KKU-214. This discrepancy may due to: firstly, KKU-213 is more dependent on NF-κB action than KKU-214. KKU-213 possessed higher basal levels of NF-κB precursors (p100 and p105) than KKU-214 cells.[10,29] As a result, KKU-213 was more strongly affected than KKU-214 when NF-κB activation was inhibited. This assumption was supported by the fact that DHMEQ, a specific NF-κB inhibitor, had a stronger effect on KKU-213 than KKU-214, *in vitro* and *in vivo*.[10] Similar findings were also confirmed in Seubwai *et al.*[29] Secondly, berberine possibly affected KKU-214 *via* signaling pathways other than NF-κB. It was shown recently that berberine could down-regulate cyclooxygenase (COX)-2/prostaglandin E2 (PGE2),[13] miR-93/PTEN/Akt,[30] and epidermal growth factor receptor (EGFR),[31] *etc*. These candidates also affected cell proliferation and are probably responsible for the action of berberine in KKU-M214. The increased NF-κB expression in the control cells at 48 h when compared to those at 24 h was evident in both CCA cell lines. This observation is probably due to the activation of interleukin 6 (IL-6) produced from CCA cells. As a large amount of biologically active IL-6 was found in the culture medium of the CCA cell line,[32] therefore the increase of IL-6 could activate NF-κB expression in cancer cells.[33]

Inhibition of STAT3 and possibly NF-κB and pathways in CCA cell lines might be due to the modulation of ERK1/2 by decreasing of ERK1/2 expression and phosphorylation. ERK1/2 plays important roles in the regulation of cell proliferation, motility and cell survival of many cancer cells. Overexpression of pERK1/2 protein was seen in 49.2% of CCA cases.[34] ERKs can be activated by several stimuli including growth factors, cytokines and carcinogens. The ERK phosphorylation cascade is linked to cell surface receptor tyrosine kinases (RTKs) and other upstream signaling proteins with known oncogenic potential such as EGFR and human EGF receptor 2 (HER2) which are overexpressed in CCA.[35] Suppression of the EGFR signaling pathway by berberine has been reported by several groups.[31,36,37] Berberine inhibited growth and promoted apoptosis of breast cancer cells[38] and the mechanism was shown to be *via* inhibition of the HER2 signaling pathway. This evidence suggests the inhibition of ERK upstream stimuli, EGFR and HER2 being the mechanism by which berberine affected the ERK pathway as observed in the current study.

ERK activation activates NF-κB signaling. In contrast, the NF-κB pathway was suppressed by PD98059, a specific inhibitor of ERK.[39] ERK phosphorylates STAT3 on serine 727 site of STAT3[40] while phosphorylation on tyrosine 705 residue of STAT3 is through JAKs and Src kinase. Several reports demonstrated that STAT3 phosphorylation at both sites is required for full activation of STAT3. Therefore, the inhibition of NF-κB and STAT3 phosphorylation was partly due to the inhibition of ERK1/2 expression and phosphorylation. The direct linkage between ERK/NF-κB/STAT3 was shown by using PD98059, a potent and selective inhibitor of MEK/ERK phosphorylation. Inhibition of ERK phosphorylation could reduce expression and/or phosphorylation of NF-κB pathway (p50, p52, p65) and STAT3 in KKU-213 and -214 cells treated with PD98059 (data not shown).

In summary, the anti-cancer activity of berberine on an *Ov*-associated CCA cell lines was demonstrated *in vitro*. Berberine inhibits growth of CCA cell lines by induction of cell cycle arrest at G1 phase. In addition, the current study provides first evidence that berberine potently inhibits the growth of CCA cells by inhibition of ERK1/2 which resulted in suppression of the NF-κB and STAT3 pathways. These findings suggest berberine to be a good candidate as adjunct therapy for CCA.

Acknowledgments This work was supported by Grant from the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund (RTA5780012) and Khon Kaen University (KKU 580603). NP was scholarship recipient from the National Research University Project, Khon Kaen University. We also acknowledge and thank Professor James A. Will for editing this manuscript *via* the English Editing Publication Clinic, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Materials The online version of this article contains supplementary materials.

REFERENCES

1) Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of chol-

angiocarcinoma in Opisthorchis viverrini-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res.*, **38**, 4634–4639 (1978).
2) Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **24**, 349–356 (2008).
3) Sripa B, Leungwattanawanit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, Sripa C, Miwa M. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). *World J. Gastroenterol.*, **11**, 3392–3397 (2005).
4) Vuddanda PR, Chakraborty S, Singh S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **19**, 1297–1307 (2010).
5) Birdsall T, Kelly G. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern. Med. Rev.*, **2**, 94–103 (1997).
6) Lu W, Du S, Wang J. Berberine inhibits the proliferation of prostate cancer cells and induces G(0)/G(1) or G(2)/M phase arrest at different concentrations. *Mol. Med. Rep.*, **11**, 3920–3924 (2015).
7) Park SH, Sung JH, Kim EJ, Chung N. Berberine induces apoptosis *via* ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **48**, 111–119 (2015).
8) Liu CH, Tang WC, Sia P, Huang CC, Yang PM, Wu MH, Lai IL, Lee KH. Berberine inhibits the metastatic ability of prostate cancer cells by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-associated genes with predictive and prognostic relevance. *Int. J. Med. Sci.*, **12**, 63–71 (2015).
9) Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, Okitsu T, Fukazawa T, Weber A, Stolz DB, Leboulch P, Tanaka N. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation*, **77**, 446–451 (2004).
10) Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Khuntikeo N, Pugkhem A, Hahnvajanawong C, Chaiyagool J, Umezawa K, Okada S, Wongkham S. Aberrant expression of NF-kappaB in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy. *PLOS ONE*, **9**, e106056 (2014).
11) Dokduang H, Techasen A, Namwat N, Khuntikeo N, Pairojkul C, Murakami Y, Loilome W, Yongvanit P. STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.*, **21**, 767–776 (2014).
12) Tsang CM, Cheung YC, Lui VW, Yip YL, Zhang G, Lin VW, Cheung KC, Feng Y, Tsao SW. Berberine suppresses tumorigenicity and growth of nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting STAT3 activation induced by tumor associated fibroblasts. *BMC Cancer*, **13**, 619 (2013).
13) Liu X, Ji Q, Ye N, Sui H, Zhou L, Zhu H, Fan Z, Cai J, Li Q. Berberine inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells *via* COX-2/PGE2 mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *PLOS ONE*, **10**, e0123478 (2015).
14) Zhu T, Li LL, Xiao GF, Luo QZ, Liu QZ, Yao KT, Xiao GH. Berberine increases doxorubicin sensitivity by suppressing STAT3 in lung cancer. *Am. J. Chin. Med.*, **43**, 1487–1502 (2015).
15) He W, Wang B, Zhuang Y, Shao D, Sun K, Chen J. Berberine inhibits growth and induces G1 arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma QBC939 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **119**, 341–348 (2012).
16) Liu Z, Liu Q, Xu B, Wu J, Guo C, Zhu F, Yang Q, Gao G, Gong Y, Shao C. Berberine induces p53-dependent cell cycle arrest and apoptosis of human osteosarcoma cells by inflicting DNA damage. *Mutat. Res.*, **662**, 75–83 (2009).
17) Liu B, Wang G, Yang J, Pan X, Yang Z, Zang L. Berberine inhibits human hepatoma cell invasion without cytotoxicity in healthy hepatocytes. *PLoS ONE*, **6**, e21416 (2011).
18) Kim S, Kim Y, Kim JE, Cho KH, Chung JH. Berberine inhibits TPA-induced MMP-9 and IL-6 expression in normal human keratinocytes. *Phytomedicine*, **15**, 340–347 (2008).
19) Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdki-Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP. *Carcinogenesis*, **27**, 2018–2027 (2006).
20) Choi MS, Yuk DY, Oh JH, Jung HY, Han SB, Moon DC, Hong JT. Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis. *Anticancer Res.*, **28** (6A), 3777–3784 (2008).
21) Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 296–308 (2006).
22) Yan K, Zhang C, Feng J, Hou L, Yan L, Zhou Z, Liu Z, Liu C, Fan Y, Zheng B, Xu Z. Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **661**, 1–7 (2011).
23) Jantová S, Cipak L, Cernakova M, Kost'alova D. Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**, 1143–1149 (2003).
24) Lin JP, Yang JS, Lee JH, Hsieh WT, Chung JG. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line. *World J. Gastroenterol.*, **12**, 21–28 (2006).
25) Wang Y, Liu Q, Liu Z, Li B, Sun Z, Zhou H, Zhang X, Gong Y, Shao C. Berberine, a genotoxic alkaloid, induces ATM-Chk1 mediated G2 arrest in prostate cancer cells. *Mutat. Res.*, **734**, 20–29 (2012).
26) Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2612–2624 (1995).
27) Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S. Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma *via* inhibition of NF-kappaB pathway. *Cancer Sci.*, **103**, 775–781 (2012).
28) Lee CH, Chen JC, Hsiang CY, Wu SL, Wu HC, Ho TY. Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha productions *via* the inhibition of IkappaB degradation in human lung cells. *Pharmacol. Res.*, **56**, 193–201 (2007).
29) Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Kraiklang R, Umezawa K, Okada S, Wongkham S. Inhibition of NF-kappaB activity enhances sensitivity to anticancer drugs in cholangiocarcinoma cells. *Oncol. Res.*, **23**, 21–28 (2016).
30) Chen Q, Qin R, Fang Y, Li H. Berberine sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin through miR-93/PTEN/Akt signaling pathway. *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 956–965 (2015).
31) Huang ZH, Zheng HF, Wang WL, Wang Y, Zhong LF, Wu JL, Li QX. Berberine targets epidermal growth factor receptor signaling to suppress prostate cancer proliferation *in vitro*. *Mol. Med. Rep.*, **11**, 2125–2128 (2015).
32) Okada K, Shimizu Y, Nambu S, Higuchi K, Watanabe A. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in a cholangiocarcinoma cell line. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 462–467 (1994).
33) De Simone V, Franze E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G, Stolfi C. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-alpha synergistically activate STAT3 and NF-κB to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, **34**, 3493–3503 (2015).
34) Jinawath A, Akiyama Y, Yuasa Y, Pairojkul C. Expression of phosphorylated ERK1/2 and homeodomain protein CDX2 in cholangiocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **132**, 805–810 (2006).
35) Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer*, **98**, 418–425 (2008).
36) Liu Q, Xu X, Zhao M, Wei Z, Li X, Zhang X, Liu Z, Gong Y, Shao C. Berberine induces senescence of human glioblastoma cells by downregulating the EGFR–MEK–ERK signaling pathway. *Mol.*

Cancer Ther., **14**, 355–363 (2015).
37) Wang L, Cao H, Lu N, Liu L, Wang B, Hu T, Israel DA, Peek RM Jr, Polk DB, Yan F. Berberine inhibits proliferation and down-regulates epidermal growth factor receptor through activation of Cbl in colon tumor cells. *PLOS ONE*, **8**, e56666 (2013).
38) Kuo HP, Chuang TC, Yeh MH, Hsu SC, Way TD, Chen PY, Wang SS, Chang YH, Kao MC, Liu JY. Growth suppression of HER2-overexpressing breast cancer cells by berberine *via* modulation of the HER2/PI3K/Akt signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8216–8224 (2011).
39) Kim JH, Na HK, Pak YK, Lee YS, Lee SJ, Moon A, Surh YJ. Roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in phorbol ester-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human breast epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.*, **171**, 133–141 (2008).
40) Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6508–6516 (1997).

View publication stats

Clinical significance of GalNAcylated glycans in cholangiocarcinoma: Values for diagnosis and prognosis

Waraporn Saentaweesuk[a,d], Atit Silsirivanit[a,d*], Kulthida Vaeteewoottacharn[a,d], Kanlayanee Sawanyawisuth[a,d], Chawalit Pairojkul[b,d], Ubon Cha'on[a,d], Somsiri Indramanee[a,d], Somchai Pinlaor[c,d], Thidarut Boonmars[c,d], Norie Araki[e], Chaisiri Wongkham[a,d*]

[a]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[b]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[c]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[d]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[e]Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, 860-8556, Japan

***Corresponding authors:**

Atit Silsirivanit, Ph.D.
Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen, 40002, Thailand
Fax and Phone: +66-43-348-386
Email: atitsil@kku.ac.th

Chaisiri Wongkham, Ph.D.
Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen, 40002, Thailand
Fax and Phone: +66-43-348-386
Email: chaisiri@kku.ac.th

Abstract

Cancer cells exhibited the aberrant cancer-associated glycans that are potential biomarkers for diagnosis and monitoring of the cancer. In this study, *Sophora japonica* agglutinin (SJA) was used to detect SJA-specific *N*-acetylgalactosamine-associated glycans (SNAG) in liver tissues and sera from cholangiocarcinoma (CCA) patients. Whether SNAG could be the diagnostic and prognostic markers for CCA was evaluated. SJA-histochemistry revealed that SNAG was undetectable in normal bile ducts but was highly expressed in hyperplastic/dysplastic bile ducts and CCA. SNAG was negative in hepatocytes and hepatoma tissues indicating SNAG as a differential marker of CCA and hepatoma. SJA-histochemistry of CCA hamster tissues revealed the involvement of SNAG in the early pathogenesis of bile duct epithelia and CCA development. A SJA-based ELISA was successfully developed to determine SNAG in serum. Serum-SNAG from CCA patients was significantly higher than those of non-CCA control groups with the diagnostic values of 59.5% sensitivity and 73.6% specificity, comparable to those of serum CA19-9. High levels of serum SNAG (≥ 69 AU/ml) indicated poor survival of CCA patients. Taken together, SNAG was first demonstrated here to be a glycobiomarker for diagnosis and prognosis of CCA. Association of SNAG with pathogenesis of bile ducts and CCA development were suggested.

Keywords: Bile duct cancer, Biomarker, Carbohydrate antigen, GalNAc-transferase, Glycosylation, Lectin,
Figures: 3; Tables: 3

Abbreviations: arbitrary unit (AU), benign biliary diseases (BBD), bovine serum albumin (BSA), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), cholangiocarcinoma (CCA), GalNAc-transferases (GalNAcTs), healthy controls (HE), hepatoma or hepatocellular carcinoma (HCC), hyperplastic/dysplastic bile ducts (HP/DP), mucin (MUC), *N*-acetylgalctosamine (GalNAc), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), other gastrointestinal cancers (OCA), receiver operating characteristic (ROC), SJA specific *N*-acetylgalactosamine-binding glycan (SNAG), *Sophora japonica* agglutinin (SJA), tetramethylbenzidine (TMB)

1. Introduction

Glycosylation, an enzymatic posttranslational modification with carbohydrates, is an important process for maturation of glycoproteins and consequently achieving the appropriate functions. Membranous glycans and glycoproteins play important roles in many biological processes such as cell adhesion and cell-cell/matrix communications, *etc*. [1-3]. Alteration of glycosylation was frequently observed in cancer cells, resulting in neo-expression of cancer-associated glycans. Not only being biomarkers for cancers, cancer-associated glycans also plays crucial roles during tumor development and metastasis [4-8].

The incidence of cholangiocarcinoma (CCA), a malignancy of bile duct epithelium, is high in Khon Kaen province, Thailand [9] and has increased globally in the past decades [9-11]. There are many risk factors reported for CCA. Primary sclerosing cholangitis, hepatitis, choledochal cysts, *etc*., are considered as potential risk factors for CCA in western countries, whereas infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, OV, and *Clonorchis sinensis*) are strongly associated with CCA in Southeast and East Asia [12]. The epidemiological studies in OV infected persons, however, indicated that fewer than 1% of infected people developed CCA [13, 14], suggesting the involvement of other personal factors in CCA genesis in individuals. Generally, CCA is difficult to diagnose due to the lack of early and specific markers. Most of CCA patients are diagnosed at the late stage that is incapable of curative treatment, resulting in the unfavorable prognosis and short survival of the patients [15, 16]. Although complete resection provides the highest survival rate and curative treatment for CCA patients, however, accurate preoperative diagnosis is still the most problematic.

Previous studies indicated the aberrant glycosylation in CCA [17-20], e.g., carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), mucin (MUC) 5AC, MUC1, CCA-CA, and CA-S27 [19, 21-23]. Many of these were not only applicable for diagnosis and prognostic prediction of CCA, but were also shown to mediate migration and invasion of CCA cell lines [20, 22, 24, 25]. A previous study by the present authors of CCA, using lectin histochemistry of 14 commercially available lectins, revealed the aberrant glycosylations

in CCA compared with normal bile ducts [18]. *Sophora japonica* agglutinin (SJA), an *N*-acetylgalactosamine (GalNAc)-binding lectin from the Japanese pagoda tree was marked as one of the potent lectins for discriminating CCA from normal bile ducts.

In this report, the aberrant expression of SJA specific *N*-acetylgalactosamine-associated glycan (SNAG) in CCA tissues was demonstrated using SJA-histochemistry. The clinical significance of SNAG expression in the pathogenesis and carcinogenesis of CCA was determined in CCA patient tissues and liver fluke-induced CCA hamster tissues. A SJA-based enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was successfully developed to detect SNAG in serum. The possibilities of using SNAG as diagnostic and prognostic markers for CCA were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Tissue and serum samples

Tissues and sera from histologically-proven CCA patients without any pre- or post-operative chemotherapy or radiotherapy (n = 89), hepatoma (HCC, n = 38), benign biliary diseases (BBD, n = 17; including 3 biliary cysts, 3 cholangitis, 2 cirrhosis, 2 inflammatory duct dilations, 3 inflammatory pseudotumors, and 4 papillary adenomas), and other gastrointestinal cancers (OCA, n = 52; including 5 ampullary carcinomas, 12 colon carcinomas, 4 cystadenocarcinomas, 1 gastrointestinal tract metastatic cancer, 14 HCC, 8 pancreatic cancers and 8 stomach carcinomas) were obtained from the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Thailand. Tumor staging of CCA was categorized according to the 7th American Joint Committee on Cancer classification [26]. *Opisthorchis viverrini* (OV) infected persons with the positive examination for OV-eggs in feces and had apparently normal livers by ultrasonography (n = 25) were included in this study. Sera from healthy controls (HE, n = 50) who had normal fasting blood sugar, complete blood count, and liver function tests; were obtained from persons who had an annual check-up at Srinagarind Hospital, Khon Kaen University. Serum CA19-9 levels of each group were obtained from the medical records of patients, Srinagarind Hospital. Serum CA19-9 were analyzed using ELISA (Roche Diagnostic GmbH) according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Informed consents were obtained from the subjects

and the research protocol was approved by the Ethics Committee for Human Research of Khon Kaen University (HE571283 and HE591308).

Liver sections of experimental hamsters were obtained from a previous study [27], under a protocol approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University (AEKKU 17/2552). Samples were collected at 1, 3, and 6 month post-treatment from 4 groups of hamsters; including 1) non-treated, 2) OV-infected, 3) *N*-nitrosodimethylamine (NDMA; 12.5 ppm in water *ad libitum*)-treated, and 4) CCA (OV+NDMA-treated) groups.

2.2 Lectin histochemistry staining

SJA-lectin histochemistry was performed as previously described [18]. Briefly, after blocking with BSA, sections were incubated with 20 µg/ml biotinylated-SJA (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) for 2 h at room temperature followed by 1:100 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (streptavidin-HRP, Invitrogen, Camarillo, CA) for 40 min. Signal was developed with diaminobenzidine and the sections were counter-stained by Mayer's hematoxylin (Bio-Optica, Milano, Italy). Sections that were probed with PBS instead of biotinylated-SJA were used as a negative control. The intensity of SNAG was scored as 0, negative; 1 = weakly positive; 2 = moderately positive and 3 = strongly positive. The frequency of positive cells was scored based on the percentage of SJA-positive biliary cells; 0-10% = negative, 11-25% = +1, 26-50% = +2, and > 50% = +3. The expression of SNAG was semi-quantified as SNAG-score as intensity x frequency. SNAG-score = 0 was considered as SNAG negative and SNAG-scores > 0 were considered as SNAG positive.

2.3 Double-SJA sandwich ELISA

Serum SNAG was determined using double-SJA sandwich ELISAs. 96-well EIA/RIA plates (Corning, NY) that were pre-coated overnight with 1.25 µg (50 µl, 25 µg/ml) of SJA in PBS (Vector Laboratories). After washing 5 times with 0.1% Tween-20 in PBS (PBST), non-specific binding was blocked using 3% BSA, followed by 1 h incubation with 50 µl of 1:10 serum in PBS. Antigens were decanted and the reaction plate was washed with PBST. The plate was incubated with 50 µl of 4 µg/ml biotinylated-SJA and 1:5,000 streptavidin-HRP, respectively. Signal were developed with 100 µl of TMB substrate, room temperature, 15 min. The reactions were stopped by adding 50 µl of 1 N H_2SO_4 and the absorbance were measured at 450 nm. Pooled-CCA serum samples

diluted to 12.5, 25, 50 and 100 arbitrary units of (AU)/ml of SNAG were used as standard controls. Levels of serum SNAG were calculated as AU/ml regarding of standard controls.

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 16.0 software (SPSS, Chicago, IL). Differences of serum-SNAG level between CCA and controls were compared using Student's t-test. The paired t-test was used to compare serum-SNAG levels between pre- and post-operative sera of CCA patients. The power of serum-SNAG in discriminating CCA from the control groups was evaluated using the receiver operating characteristic (ROC) curve. Chi-square (χ^2) was used to analyze the correlation of SNAG levels in sera and tissues as well as the clinicopathological data of CCA patients. Survival time was measured from the time of surgical resection to death. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier plot and Log-Rank test.

3. Results

3.1 *SNAG was aberrantly expressed in precancerous bile duct epithelia and CCA.*

Expression of SNAG in CCA tissues (n = 89) was determined using SJA lectin histochemistry. SNAG was positively stained in hyperplastic/dysplastic bile ducts (HP/DP) and CCA with SNAG signal observed in lumina of CCA bile ducts, while it was negative in normal bile ducts in the adjacent non-tumor area, inflammatory cells, hepatocyte and HCC (Figure 1A). SNAG was differentially expressed in CCA with SNAG-scores varying from 0-9 (Figure 1B). Among 89 CCA cases, 67.4% (60/89) had positive SNAG scores of moderate to high levels (Figure 1C). All normal bile duct epithelia (n = 79) had negative staining, while 77.6% (52/67) of HP/DP strongly expressed SNAG. In contrast to CCA, 97.4% (37/38) had negative for SNAG (Figure 1C). The clinical relevance of SNAG on the clinicopathological features and survival of CCA patients were analyzed based on the median value of SNAG scores = 6. The univariate and survival analyses using Kaplan-Meier plot and Log-Rank test showed no association between SNAG score with clinicopathological data as well as survival of the patients (Table 1).

3.2 *SNAG was associated with carcinogenesis of CCA*

To elucidate the association of SNAG with carcinogenesis of CCA, SNAG expression was determined in liver tissues obtained from the OV-associated CCA hamster model. Four groups with 5 each of hamsters: 1) Non-treated control group, 2) OV-infected group, 3) NDMA-treated group, and 4) OV+NDMA-treated (CCA) group were included. As reported previously, the hyperproliferative bile ducts, HP/DP were observed in hamsters from OV-infected, NDMA-treated, and OV+NDMA-treated groups as early as 1 month post-treatment. CCA was developed in only the OV+NDMA-treated group, at 3-6 months post-treatment. As shown in Figure 2, SNAG was undetectable in normal bile ducts and hepatocytes of non-treated hamsters but was strongly expressed in hyperproliferative, HP/DP bile ducts and CCA. Notably, SNAG expression was detected in all treatment groups as early as one month post-treatment.

3.3 *Serum SNAG is a potential biomarker for diagnosis and prognosis of CCA*.

As SNAG was observed in luminal of CCA tissues, suggesting the possibility of SNAG to be secreted and detected in serum of CCA patients. An in-house double-SJA sandwich ELISA was further developed to determine the level of SNAG in serum samples. SNAG-ELISA levels were tested in 74 sera from CCA patients, of which 41 corresponded to the patients whose tissues were used in SNAG lectin histochemistry study. As shown in Table 2, patients with high levels of serum SNAG also had high SNAG scores in their tissues ($P = 0.003$). In addition, the levels of serum SNAG (mean ± SD) from CCA patients with high tissue-SNAG scores was significantly higher than those from patients with low tissue-SNAG scores ($P = 0.028$, Figure 3A). The correlation of serum SNAG and tissue SNAG may indicate tumor origin of the SNAG detected in the serum.

To evaluate the potency of serum SNAG for diagnosis of CCA, SNAG-ELISA was performed in serum from 74 CCA patients and 144 non-CCA subjects; including 50 HE, 25 OV, 17 BBD, and 52 OCA. Levels of preoperative serum-SNAG (Mean ± SD) from CCA patients were significantly higher than each of the control groups ($P < 0.05$, t-test, Figure 3B) and was considerably reduced after operation (Figure 3C). ROC analysis indicated that serum-SNAG could be used for distinguishing CCA patients from non-CCA controls with the areas under curves (AUC) = 0.702 ($P < 0.001$, Figure 3D). At a cutoff value of 28 AU/ml, serum-SNAG has a power to indicate CCA with 59.5% sensitivity, 73.6% specificity, 53.7% positive predictive value, 22.1% negative predictive

value, 26.4% false positive, 40.5% false negative and 68.81% accuracy. Levels of serum-SNAG were not correlated with clinicopathological data (data not shown).

As serum CA19-9 is the common diagnostic marker for CCA at present, the diagnostic power of serum SNAG and CA-19-9 were compared. Serum CA19-9 of 193 from 218 subjects (88.5%) were obtained from the medical records. Of these, serum CA19-9 of 56 from 74 CCA patients (75.6%) were compared with serum SNAG. Using the normal value of CA19-9 = 37 U/ml, CA19-9 could detect CCA with 60.7% sensitivity and 81.8% specificity, 57.6% and 16.4 % of positive and negative predictive values, 18.2% and 39.3% of false positive and false negative, and with 75.6% accuracy.

The levels of serum-SNAG, according to the mean of serum-SNAG at 69 AU/ml, was not correlated with clinicopathological data (data not shown). There were 32.4% (n = 24) of CCA patients in this cohort who had high serum-SNAG levels ≥ 69 AU/ml with a median survival ± SD = 237 ± 166 days and 67.6% (n = 50) compared to those who had low serum-SNAG (< 69 AU/ml) with a median survival ± SD = 352 ± 618 days. Survival analysis using Kaplan-Meier plot and Log-Rank test revealed a significant of shorter survival of CCA patients with high serum-SNAG than those with low serum-SNAG (P = 0.014, Figure 3E). Multivariate survival analysis using Cox Regression model revealed that level of serum-SNAG and histological type of CCA are independent prognostic indicators for shorter survival (Table 3). CCA patients with high levels of serum-SNAG were predicted to have a 1.85 times higher hazard for death than those with low serum-SNAG (P = 0.039).

4. Discussion

A number of tumor markers such as CEA, CA19-9, *etc*., have been used clinically for diagnosis of CCA [28-30]. Nevertheless, none of these markers is specific and applicable for early diagnosis of CCA. Recently, aberrant expressions of glycans and glycoproteins, such as CCA-CA, MUC1, MUC5AC, CA-S27, *etc*., have been reported to be the biomarkers for CCA [19, 20, 22, 24, 31-33]. The previous study by the present authors using lectin histochemistry of 14 commercially available lectins emphasized the fact of aberrant glycosylation in human CCA tissues and suggested the applicability of using lectins for detection of CCA [18]. In this study, SJA binding glycans, SNAG, were aberrantly expressed in pathological bile duct epithelia and associated with

carcinogenesis of CCA. A SJA based-ELISA was successfully developed to measure the level of SNAG in patient sera and a high level of serum SNAG was an independent prognostic marker of poor survival for CCA patients.

The SJA histochemistry of liver tissues from CCA patients and OV-induced CCA hamsters were determined. SNAG is possibly a unique glyco-phenotype of CCA, as determined by a search, SNAG was found positive only in Burkitt's lymphoma [34] and was negative in equine lymphosarcoma [35], oropharyngeal squamous cell carcinoma [36], colon cancer [37] and as reported in this study, HCC. This information emphasizes the applicability of using SNAG as a marker for diagnosis of CCA and for differentiating CCA from HCC. The results from the OV-associated hamster model showed that SNAG was associated with bile duct epithelial injury regardless of causative agents. SNAG was detected in the early pathogenesis of bile duct epithelia and CCA development. This observation suggests the significant role of SNAG in the early carcinogenesis of CCA and the possibility of using SNAG as an early marker for screening of CCA. It could be interesting to further elucidate the SNAG-conjugated proteins associated with CCA development.

To further reveal the possibility of using SNAG as a diagnostic marker for CCA, these present findings have successfully developed the SJA-sandwich ELISA system to detect SNAG in serum. Serum SNAG should be of tumor origin. Firstly, patients with high tissue SNAG also had high levels of serum SNAG. Secondly, the average level of serum SNAG from patients with high tissue SNAG was higher than those with low tissue SNAG and thirdly, the level of preoperative serum-SNAG was decreased after tumor removal. Based on this evidence, the level of serum SNAG may reflect the SNAG expression in CCA tissue.

The potential of using serum-SNAG as a diagnostic marker for CCA was strengthened by the fact that serum-SNAG from CCA patients was significantly higher than those from non-CCA controls and could differentiate CCA patients from healthy subjects and patients with benign biliary diseases, other gastrointestinal cancers and hepatoma with 60% sensitivity and 74% specificity. The diagnostic values of serum-SNAG for detection of CCA is comparable to those of CA-19-9. Using serum-SNAG or CA19-9 as a single marker for diagnosis of CCA, however, gave high false positive and false negative results. This can be overcome by using suitable combination markers

as demonstrated by [25, 38]. Analysis of serum-SNAG for preliminary diagnosis of CCA, therefore, should be determined in combination with other assays, such as serum alkaline phosphatase or with imaging analysis. Serum-SNAG is beneficial not only for a diagnostic marker but also for a poor prognostic indicator of CCA patients. High levels of preoperative serum-SNAG independently indicated shorter survival of the patients, regardless to age, sex, and tumor staging.

SNAG is probably synthesized by an enzyme of GalNAc-transferases (GalNAcTs), a group of glycosyltransferases involved in transferring of GalNAc to the pre-existing glycan moieties or proteins. Overexpression of the corresponding enzymes is possibly a mechanism that triggers SNAG expression in the pathogenesis of CCA. Studying the expression and function of GalNAcTs in parallel with SNAG expression in CCA may be required to understand the pathogenesis of CCA. Targeting glycosyltransferases is an alternative approach for cancer therapy. Inhibitors of glycosyltransferases have been developed and applied for suppression of many cancer cells [39-43]. A previous study in gastric cancer revealed that suppression of GalNAcT1 by RNA interferences enhanced the sensitivity of JRST, a gastric cancer cell line, to the natural killer and lymphokine-activated killer cell *in vitro* and suppressed the tumor growth *in vivo* [39]. Suppression of GalNAcTs by benzyl-GalNAc analogs, efficiently suppressed proliferation of colorectal cancer cells [42]. Moreover, inhibiting GalNAcT2 expression using RNA interference significantly decreased the migration and invasion of SAS, an oral squamous cell carcinoma cell line [41]. This collective evidence emphasizes the importance of GalNAcTs and GalNAc-associated glycans in cancers, and strongly highlights the potential of using GalNAc-associated glycans and the corresponding GalNAcTs as an alternative therapeutic target for CCA.

Collectively, this is the first report to introduce SNAG and its clinical relevance for detection and prognostic prediction of CCA. The evidence shown in this study emphasizes the biological roles of GalNAc and the sugar moiety recognized by SJA in pathogenesis of CCA. Further experiments are required to complete the understanding of SNAG in pathogenesis of the bile duct epithelia and carcinogenesis of CCA.

Acknowledgements: This work was co-supported by Senior Research Scholar Grant of TRF and Khon Kaen University (KKU) (RTA5780012), and KKU research grant

(592401). CW and WS was grateful to the support from the RGJ-PhD Program, TRF (PHD/0021/2556). We would like to acknowledge Prof. James A. Will, for editing the MS via Publication Clinic KKU, Thailand

References

[1] C.R. Bertozzi, L.L. Kiessling, Chemical glycobiology, Science 291 (2001) 2357-2364.

[2] K. Ohtsubo, J.D. Marth, Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, Cell 126 (2006) 855-867.

[3] A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, Glycobiology 3 (1993) 97-130.

[4] B. Adamczyk, T. Tharmalingam, P.M. Rudd, Glycans as cancer biomarkers, Biochim. Biophys. Acta 1820 (2012) 1347-1353.

[5] J.W. Dennis, M. Granovsky, C.E. Warren, Glycoprotein glycosylation and cancer progression, Biochim. Biophys. Acta 1473 (1999) 21-34.

[6] S. Hakomori, Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 10231-10233.

[7] D.L. Meany, D.W. Chan, Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers, Clin. Proteomics 8 (2011) 7.

[8] C.A. Reis, H. Osorio, L. Silva, C. Gomes, L. David, Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, J. Clin. Pathol. 63 (2010) 322-329.

[9] H.R. Shin, J.K. Oh, E. Masuyer, M.P. Curado, V. Bouvard, Y. Fang, S. Wiangnon, B. Sripa, S.T. Hong, Comparison of incidence of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma--focus on East and South-Eastern Asia, Asian Pac. J. Cancer Prev. 11 (2010) 1159-1166.

[10] B. Blechacz, M. Komuta, T. Roskams, G.J. Gores, Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 8 (2011) 512-522.

[11] I. Endo, M. Gonen, A.C. Yopp, K.M. Dalal, Q. Zhou, D. Klimstra, M. D'Angelica, R.P. DeMatteo, Y. Fong, L. Schwartz, N. Kemeny, E. O'Reilly, G.K. Abou-Alfa, H. Shimada, L.H. Blumgart, W.R. Jarnagin, Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection, Ann. Surg. 248 (2008) 84-96.

[12] B. Sripa, C. Pairojkul, Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand, Curr. Opin. Gastroenterol. 24 (2008) 349-356.

[13] E. Mairiang, J. Chaiyakum, N. Chamadol, V. Laopaiboon, J. Srinakarin, J. Kunpitaya, S. Sriamporn, K. Suwanrungruang, V. Vatanasapt, Ultrasound screening for Opisthorchis viverrini-associated cholangiocarcinomas: experience in an endemic area, Asian Pac. J. Cancer Prev. 7 (2006) 431.

[14] S. Sriamporn, P. Pisani, V. Pipitgool, K. Suwanrungruang, S. Kamsa-Ard, D.M. Parkin, Prevalence of Opisthorchis viverrini infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand, Trop. Med. Int. Health 9 (2004) 588-594.

[15] C.D. Anderson, C.W. Pinson, J. Berlin, R.S. Chari, Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma, Oncologist 9 (2004) 43-57.

[16] H.U. Baer, S.C. Stain, A.R. Dennison, B. Eggers, L.H. Blumgart, Improvements in survival by aggressive resections of hilar cholangiocarcinoma, Ann. Surg. 217 (1993) 20-27.

[17] M. Higashi, S. Yonezawa, J.J. Ho, S. Tanaka, T. Irimura, Y.S. Kim, E. Sato, Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma, Hepatology 30 (1999) 1347-1355.

[18] S. Indramanee, A. Silsirivanit, C. Pairojkul, C. Wongkham, S. Wongkham, Aberrant glycosylation in cholangiocarcinoma demonstrated by lectin-histochemistry, Asian Pac. J. Cancer Prev. 13 Suppl (2012) 119-124.

[19] A. Matsuda, A. Kuno, T. Kawamoto, H. Matsuzaki, T. Irimura, Y. Ikehara, Y. Zen, Y. Nakanuma, M. Yamamoto, N. Ohkohchi, J. Shoda, J. Hirabayashi, H. Narimatsu, Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma, Hepatology 52 (2010) 174-182.

[20] A. Silsirivanit, N. Araki, C. Wongkham, K. Vaeteewoottacharn, C. Pairojkul, K. Kuwahara, Y. Narimatsu, H. Sawaki, H. Narimatsu, S. Okada, N. Sakaguchi, S. Wongkham, CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma, Cancer Sci. 104 (2013) 1278-1284.

[21] A. Matsuda, A. Kuno, H. Matsuzaki, T. Kawamoto, T. Shikanai, Y. Nakanuma, M. Yamamoto, N. Ohkohchi, Y. Ikehara, J. Shoda, J. Hirabayashi, H. Narimatsu, Glycoproteomics-based cancer marker discovery adopting dual enrichment with Wisteria floribunda agglutinin for high specific glyco-diagnosis of cholangiocarcinoma, J. Proteomics 85 (2013) 1-11.

[22] A. Silsirivanit, N. Araki, C. Wongkham, C. Pairojkul, Y. Narimatsu, K. Kuwahara, H. Narimatsu, S. Wongkham, N. Sakaguchi, A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma, Cancer 117 (2011) 3393-3403.

[23] A. Silsirivanit, K. Sawanyawisuth, G.J. Riggins, C. Wongkham, Cancer biomarker discovery for cholangiocarcinoma: the high-throughput approaches, J. Hepatobiliary Pancreat. Sci. 21 (2014) 388-396.

[24] A. Juntavee, B. Sripa, A. Pugkhem, N. Khuntikeo, S. Wongkham, Expression of sialyl Lewis(a) relates to poor prognosis in cholangiocarcinoma, World J. Gastroenterol. 11 (2005) 249-254.

[25] S. Wongkham, A. Silsirivanit, State of serum markers for detection of cholangiocarcinoma, Asian Pac. J. Cancer Prev. 13 Suppl (2012) 17-27.

[26] S.B. Edge, C.C. Compton, The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM, Ann. Surg. Oncol. 17 (2010) 1471-1474.

[27] S. Prakobwong, P. Yongvanit, Y. Hiraku, C. Pairojkul, P. Sithithaworn, P. Pinlaor, S. Pinlaor, Involvement of MMP-9 in peribiliary fibrosis and cholangiocarcinogenesis via Rac1-dependent DNA damage in a hamster model, Int. J. Cancer 127 (2010) 2576-2587.

[28] C.Y. Chen, S.C. Shiesh, H.C. Tsao, X.Z. Lin, The assessment of biliary CA 125, CA 19-9 and CEA in diagnosing cholangiocarcinoma--the influence of sampling time and hepatolithiasis, Hepatogastroenterology 49 (2002) 616-620.

[29] B. Juntermanns, S. Radunz, M. Heuer, S. Hertel, H. Reis, J.P. Neuhaus, S. Vernadakis, T. Trarbach, A. Paul, G.M. Kaiser, Tumor markers as a diagnostic key for hilar cholangiocarcinoma, Eur. J. Med. Res. 15 (2010) 357-361.

[30] X.L. Qin, Z.R. Wang, J.S. Shi, M. Lu, L. Wang, Q.R. He, Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA, World J. Gastroenterol. 10 (2004) 427-432.

[31] W. Bamrungphon, N. Prempracha, N. Bunchu, S. Rangdaeng, T. Sandhu, S. Srisukho, C. Boonla, S. Wongkham, A new mucin antibody/enzyme-linked lectin-sandwich assay of serum MUC5AC mucin for the diagnosis of cholangiocarcinoma, Cancer Lett. 247 (2007) 301-308.

[32] C. Boonla, B. Sripa, P. Thuwajit, U. Cha-On, A. Puapairoj, M. Miwa, S. Wongkham, MUC1 and MUC5AC mucin expression in liver fluke-associated intrahepatic cholangiocarcinoma, World J. Gastroenterol. 11 (2005) 4939-4946.

[33] C. Boonla, S. Wongkham, J.K. Sheehan, C. Wongkham, V. Bhudhisawasdi, N. Tepsiri, C. Pairojkul, Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma, Cancer 98 (2003) 1438-1443.

[34] M. Abe, O. Suzuki, K. Tasaki, K. Tominaga, H. Wakasa, Analysis of lectin binding properties on human Burkitt's lymphoma cell lines that show high spontaneous metastasis to distant organs in SCID mice: the binding sites for soybean agglutinin lectin masked by sialylation are closely associated with metastatic lymphoma cells, Pathol. Int. 46 (1996) 977-983.

[35] P.G. Detilleux, N.F. Cheville, B.J. Sheahan, Ultrastructure and lectin histochemistry of equine cutaneous histiolymphocytic lymphosarcomas, Vet. Pathol. 26 (1989) 409-419.

[36] S.A. Freije, R.S. Mostofi, D.G. Bostwick, Alterations in glycoconjugate expression following malignant transformation of human oropharyngeal squamous mucosa, Laryngoscope 99 (1989) 197-203.

[37] R. Sharma, E. Adam, U. Schumacher, The action of 5-fluorouracil on human HT29 colon cancer cells grown in SCID mice: mitosis, apoptosis and cell differentiation, Br. J. Cancer 76 (1997) 1011-1016.

[38] S. Pattanapairoj, A. Silsirivanit, K. Muisuk, W. Seubwai, U. Cha'on, K. Vaeteewoottacharn, K. Sawanyawisuth, D. Chetchotsak, S. Wongkham, Improve discrimination power of serum markers for diagnosis of cholangiocarcinoma using data mining-based approach, Clin. Biochem. 48 (2015) 668-673.

[39] T. Adachi, Y. Hinoda, I. Nishimori, M. Adachi, K. Imai, Increased sensitivity of gastric cancer cells to natural killer and lymphokine-activated killer cells by antisense suppression of N-acetylgalactosaminyltransferase, J. Immunol. 159 (1997) 2645-2651.

[40] P.E. Goss, M.A. Baker, J.P. Carver, J.W. Dennis, Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents, Clin. Cancer Res. 1 (1995) 935-944.

[41] M.C. Lin, M.J. Huang, C.H. Liu, T.L. Yang, M.C. Huang, GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity, Oral Oncol. 50 (2014) 478-484.

[42] G. Patsos, V. Hebbe-Viton, C. Robbe-Masselot, D. Masselot, R. San Martin, R. Greenwood, C. Paraskeva, A. Klein, M. Graessmann, J.C. Michalski, T. Gallagher, A. Corfield, O-glycan inhibitors generate aryl-glycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines, Glycobiology 19 (2009) 382-398.

[43] G. Patsos, V. Hebbe-Viton, R. San Martin, C. Paraskeva, T. Gallagher, A. Corfield, Action of a library of O-glycosylation inhibitors on the growth of human colorectal cancer cells in culture, Biochem. Soc. Trans. 33 (2005) 721-723.

Table 1 Correlation of tissue-SNAG and clinicopathological parameters of CCA patients

		n	**SNAG-score**		***P***
			Low (< 6)	**High (≥ 6)**	
Age (years)	< 55	45	25	20	0.242
	≥ 55	44	19	25	
Sex	Male	57	29	28	0.717
	Female	32	15	17	
Histopathology	Papillary type	26	14	12	0.593
	Non-papillary type	63	30	33	
Staging	I-III	33	17	16	0.764
	IV	56	27	29	

Tumor size	< 7 cm	36	20	16	0.363
	≥ 7 cm	42	19	23	
Node metastasis	Negative	44	23	21	0.405
	Positive	35	15	20	
Distant metastasis	Negative	73	36	37	0.322
	Positive	10	3	7	

Table 2 Correlation of the levels of serum-SNAG and tissue-SNAG from CCA patients

		n	Tissue-SNAG score		*P*
			Low (< 6)	High (≥ 6)	
Serum-SNAG	Low (< 28 AU/ml)	20	14	6	**0.003**
	High (≥ 28 AU/ml)	21	5	16	

Table 3 Multivariate analysis of serum-SNAG in CCA patients

Variable	n	Adjusted HR	95% CI	*P*
Serum SNAG				
Low (< 69 AU/mL)	50	1	1.031-3.304	0.039
High (≥ 69 AU/mL)	24	1.845		
Age (years)				
< 55	34	1	0.805-2.133	0.277
≥ 55	40	1.310		
Sex				
Male	47	1	0.497-1.491	0.593
Female	27	0.861		
Histopathology				
Papillary type	25	1	1.008-2.943	0.047
Non-papillary type	49	1.722		
Stage				
I-III	23	1	0.758-2.378	0.313
IV	51	1.342		

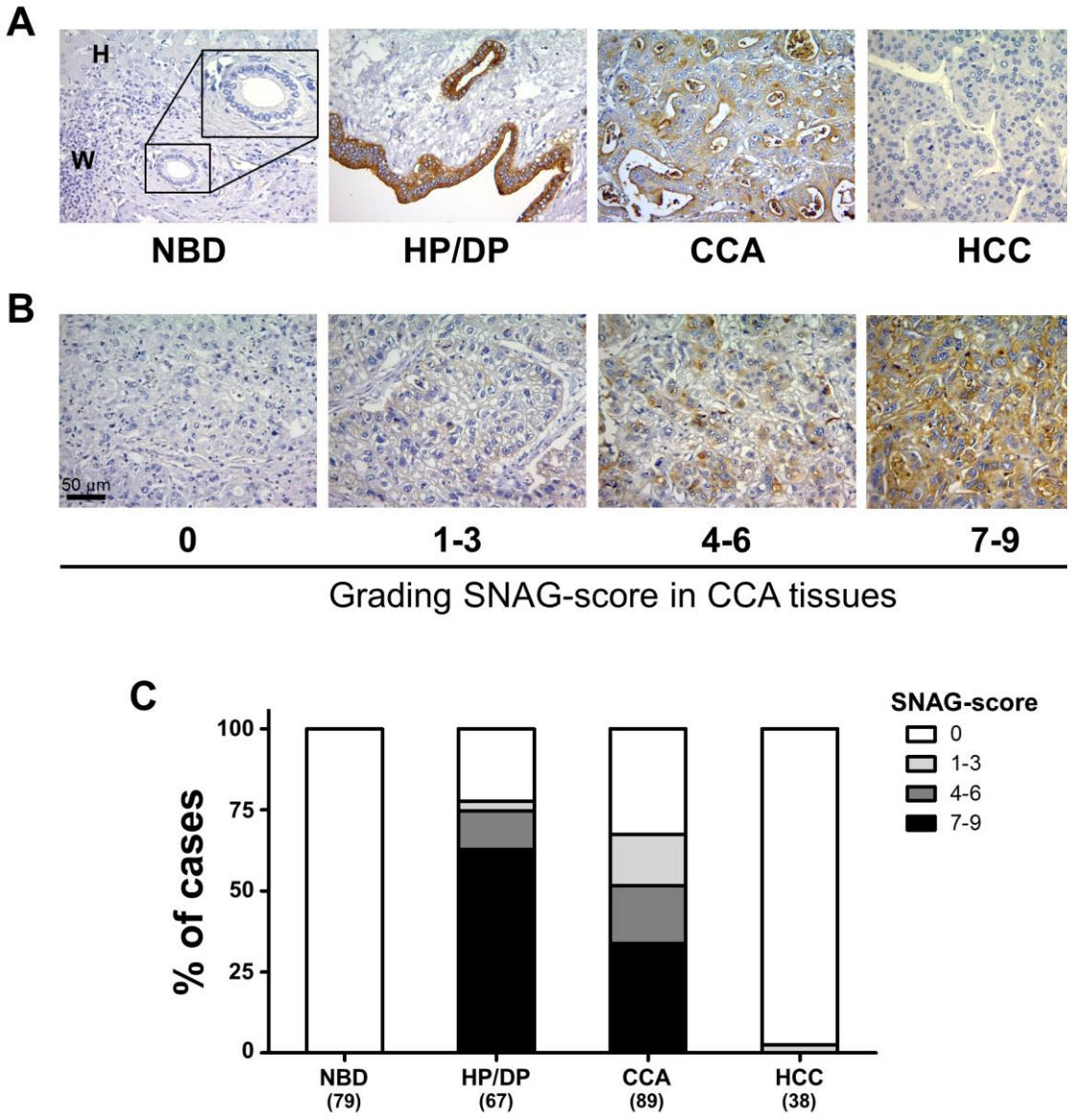


Figure 1. SJA histochemistry staining of human liver tissues

(A) SNAG was not detected in normal bile ducts (NBD), hepatocytes (H) and inflammatory cells (W) and hepatoma (HCC), but was strongly detected in hyperplastic/dysplastic bile ducts (HP/DP) and CCA. (B) The expression of SNAG in CCA tissues was semi-quantitated as SNAG score from 0 to 9; negative = 0, weak = 1-3, moderate = 4-6 and strong = 7-9. (C) Percentage of SNAG-score observed in bile duct epithelia and CCA. Numbers in the parentheses are numbers of cases.

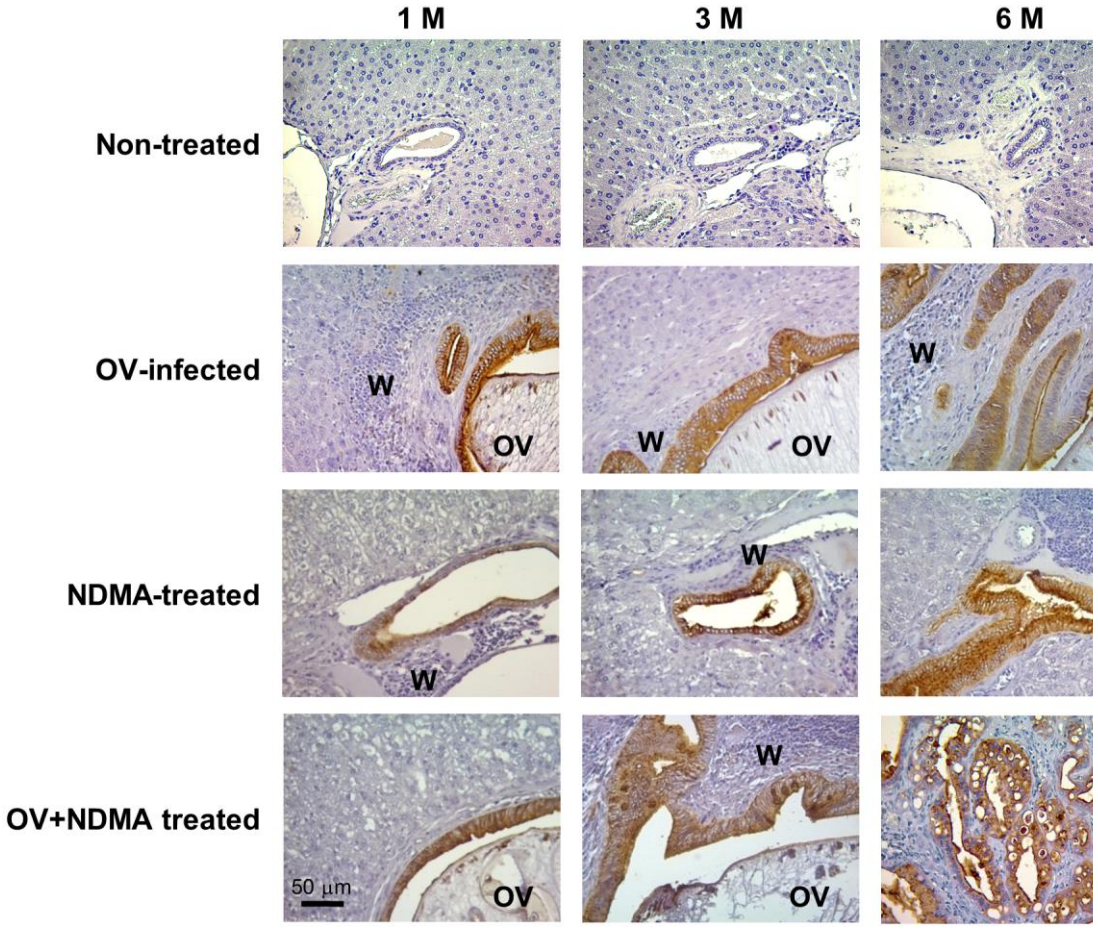


Figure 2. Expressions of SNAG in livers from OV-associated CCA hamsters

SJA histochemistry was performed to determine the SNAG expression in the bile duct epithelia from 4 groups of hamsters in OV-associated CCA hamster model at 1, 3 and 6 months (M) post-treatments. SNAG was undetected in normal bile ducts but strongly detected in pathogenic bile duct epithelia and CCA as early as 1 month in all treated groups. W = inflammatory cells, OV = Opisthorchis viverrini.

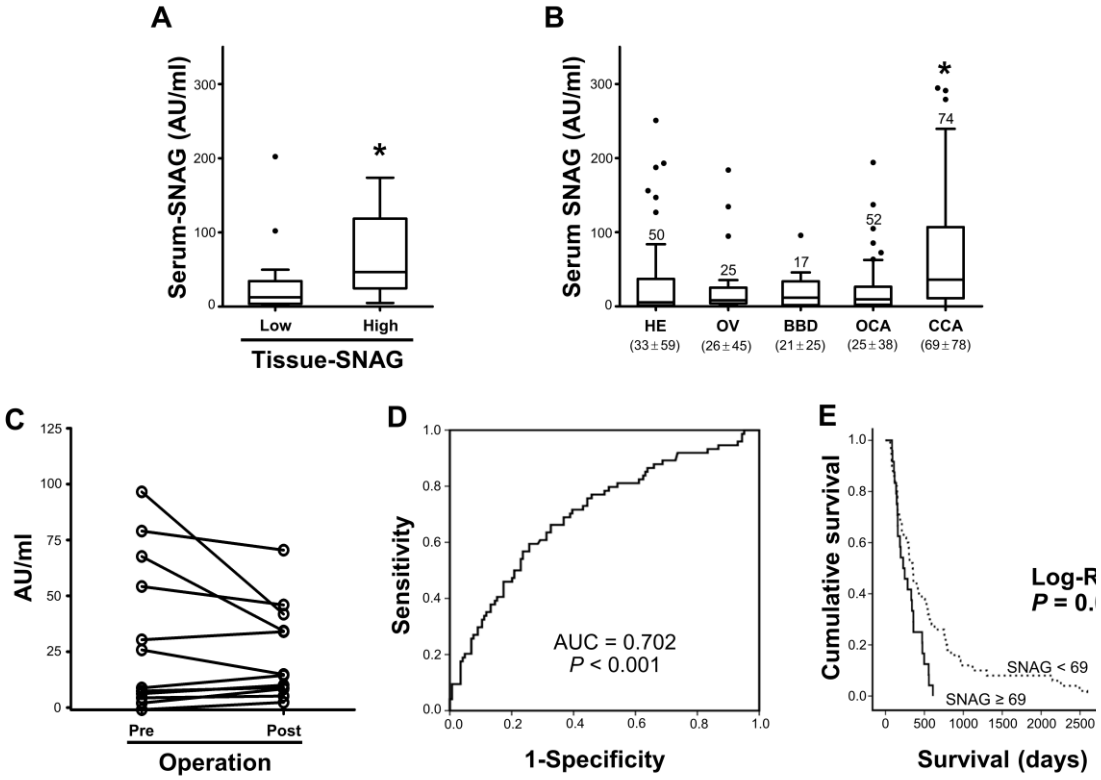


Figure 3. Serum-SNAG is a marker for diagnosis and poor prognostic prediction of CCA

Level of serum SNAG (mean ± SD) from CCA patients with high tissue SNAG score is significantly higher than those from patients with low tissue SNAG score. (B) Comparison of serum-SNAG between CCA patients and non-CCA controls; including healthy (HE), OV-infected (OV), benign biliary disease (BBD), and other gastrointestinal cancer (OCA). The number at the top of each bar indicates cases and the numbers in the parentheses are mean ± SD of serum-SNAG in each group. (C) Levels of pre- and post-operative serum of CCA patients. (D) ROC curve of serum SNAG and (E) Kaplan-Meier plot and Log-Rank test for survival analysis of CCA patients against low and high levels of serum-SNAG. * significantly different from all control groups, $P < 0.05$

Invited speakers:

Associate Prof. Marie-Claude Gingras
Human Genome Sequencing Center,
Baylor College of Medicine, USA.

Dr. Siwanon Jirawatnotai
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Mahidol University, Thailand.

Dr. Somponnat Sampattavanich
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Mahidol University, Thailand.

Dr. Graham Wright
Head of Microscopy Unit, Institute of Medical Biology,
*A*STAR Singapore.*

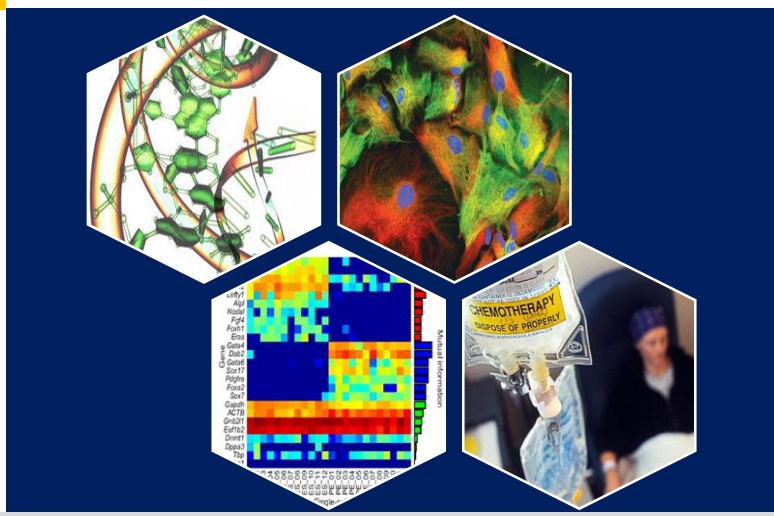
Dr. Anthony M Davies.
Center Director, Translational cell imaging Queensland (TCIQ) , Institute of health BioMedical Innovation, Queensland University of Technology, Australia

Cancer meeting on "Frontier in Cancer Research I: Biology for Systems cancer research"

SAVE THE DATE

7-8 MAY 2015

Meeting room 3A-C, Wechawichakarn Building
Faculty of Medicine, Khon Kaen University



***Supported by**
TRF Senior Research Scholar Grant through S. Wongkham RTA5780012 and GE Healthcare Life Sciences

Report

It is my pleasure to welcome your all to the Frontier in Cancer Research I. I would like to report you of the background of this meeting which is a compulsory activity for the awardee of the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund. Prof. Suthipan Jitpimolmart and his administrative team kindly visited me and my research group for the informal announcement of the Senior Research Scholar Grant award in August, 2014 and I have received the award officially from Her Royal Highness Princess Maha Chackri Sirindhorn on 10thApril, 2015. Our group proposed to use the multi-molecular approaches to discover alternative targets for cholangiocarcinoma treatment. There are 5 junior, 2 senior researchers and many M.Sc.-Ph.D. graduate students joining the project.

This meeting is held on the purpose for updating the new advanced biology and useful information for researchers in cancer research. Not just only for the academic, the networking among researchers in the cancer field is also expected. The theme of the meeting "Systems Biology for Cancer Research" was given to signify the usefulness of Systems Biology in cancer. In the past decade, high-throughput technology has been developed and allow researchers to analyze all interacting molecules in a specified condition as a whole. These technologies may help us to monitor the dynamic and the complexity of cancer behavior and its environment and will accelerate our research in cancer biology. In this meeting there are 3 guest speakers; Associate Marie-Claude Gingras, from Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, TX; Dr. Siwanon Jirawatnotai, and Dr. Somponnat Sampattavanich, from Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mahidol University; 12 oral presentations. There are 60 participants, of which 33 are from the Faculty of Medicine, and 27 from other institutes. The meeting of the second day will focus on the new advanced cellular imaging technologies and analysis of multidimensional imaging data.

Finally, I would like to thank all guest and invited speakers, presenters, participants and my research group members who made this meeting possible. Last but not least, GE Healthcare for supporting the guest speakers for advance imaging technology, The Ph.D.-M.D. program of the Faculty of Medicine, the Research Affairs for providing the space and instrument for demonstration, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for the financial support of this meeting.

Professor Sopit Wongkham

Awardee of the Senior Research Scholar Grant,
Thailand Research Fund and
Khon Kaen University (RTA 5780012),
Khon Kaen, Thailand

Opening Address

It is a great pleasure to be here at the conference of Frontier in Cancer Research I, 2015, at the faculty of Medicine, Khon Kaen University. The theme of this conference is "Systems biology" which is really the frontier research field. It is the study of systems of biological components, which may be molecules, cells, organisms or entire species. This needs to be generated from the multidisciplinary knowledge and techniques.

We have to admit that cancer is one of the leading courses of death and disability in Thailand which needed to be concerned both in diagnosis and treatment. To be able to combat with cancer we need to understand its biology clearly as a system. Therefore, how the systems biology is being approached.

Integration of data from multiple techniques such as imaging and high throughput technologies as well as from bioinformatics may help us to monitor the dynamic and the complexity of cancer's behavior and its environment. This should improve our understanding of cancer biology, its response to environment and drugs. Here at the Faculty of Medicine, we will apply it to cholangiocarcinoma, an epithelium bile duct cancer which is set as our main target for fighting on the 50 year anniversary of Khon Kaen University. Approaching systems biology will increase our knowledge to be able to combat this incurable disease.

Based on the first speaker; "Genetic profiling, a personalized approach of cancer" is a good start for introducing the systems biology as the frontier research knowledge to scientists of the Faculty of Medicine, Khon Kaen University and our collaborators.

I welcome all the participants to the Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Please do yourself at home and enjoy both science and E-san culture. I have to thank all guest speakers, Thailand Research Fund, GE Healthcare and organizer for your contribution and kind support. I wish this meeting resulting in a great success and would like to declare the meeting open.

Associate Professor Charnchai Panthongviriyakul

Dean, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen, Thailand

Frontier in Cancer Research I:

Systems Biology for Cancer Research

7-8 May, 2015

Meeting room 3A-C, Wechwichakarn Building

Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Thu 7 May (tentatively will be held in room 3B and Lunch will be served in room 3C)	
0800-0830	Registration
0830-0845	Opening remarks: Dean, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
0845-0945 (60 min)	**Invited speaker 1**: Genetic Profiling, a personalized approach of cancer **Assoc. Prof. Dr. Marie-Claude Gingras, Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, TX, USA*
0945-1000	Coffee break 1
1000-1200	Oral presentation - "O-GlcNAcylation promotes the progression of cholangiocarcinoma" **Asst. Prof. Kanlayanee Sawanyawisuth, Department of Biochemistry and LFCRC, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Induction of O-GlcNAcylation by glucose is associated with metastasis of cholangiocarcinoma" **Mr. Chatchai Phoomak, Department of Biochemistry and LFCRC, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Identification of therapeutic targets for cholangiocarcinoma using DNA microarray database" **Dr. Wunchana Seubwai, Department of Forensic Medicine and LFCRC, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Effect of high glucose condition and metformin—an anti-diabetic drug on aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma cells" **Mr. Charupong Saengboonmee, Department of Biochemistry and LFCRC, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Roles of tumor releasing factors in CCA-microenvironment interaction and cancer progression" **Dr. Kulthida Vaeteewoottacharn, Department of Biochemistry and LFCRC, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of cholangiocarcinoma" **Dr. Suchada Pimsen, Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand* - "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) as a potential prognostic marker for cholangiocarcinoma patients" **Asst. Prof. Siriporn Proungvitaya, Centre Research and Development Medical Diagnostic, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Dendritic cells pulsed with RNA or protein from cholangiocarcinoma (CCA) cell line induce effector immune cells activation against CCA cells" **Dr. Mutita Junking, Division of Molecular Medicine, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*
1200-1300	Lunch 1

1300-1400 (60 min)	**Invited speaker 2** "Targeted therapy: is it the magic bullet?" **Dr. Siwanon Jirawatnotai, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand*
1400-1500	Oral presentation (15 min x 4) - "Hypomethylation of LINE-1 induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine" **Asst. Prof. Chanchai Boonla, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand* - "Reduced expression of Ring Finger Protein 43 indicates a poor prognosis of cholangiocarcinoma" **Dr. Chutima Talabnin, Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasim, Thailand* - "The relationship between c-myc amplification and human papillomavirus (HPV) infection of oral cancer in Northeast Thailand" *Ms. Jureeporn Chuerduangphui, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand* - "Association of circulating CD64/CD163 monocyte with infiltrating tumor M2 macrophage density and cervical lesion severity" *Mr. Piyawut Swangphon, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*
1500-1515	Coffee break 2
1515-1615 (60 min)	**Invited speaker 3** "Systems approaches for lead and target identification in drug discovery" **Dr. Somponnat Sampattavanich, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand*
1615-1630	Conclusion
Fri 8 May (tentatively will be held in room 3C. Break and Lunch will be served in room 3C)	
0900-1100	**New advancement in cellular imaging technologies:** • 3D structured illumination super-resolution microscopy (3D-SIM) applications in cell and developmental biology ***Dr. Graham Wright, Head of Microscopy Unit, Institute of Medical Biology, A*STAR, Singapore.* • High-content imaging and analysis: New high value assays for translational research ***Dr Ivan Biros, a Cellular imaging leader-Cell Technologies Asia-Pacific, GE Healthcare, Australia*
	Coffee break 3: will be served in the meeting room
1100-1200	Hands-on workshop 1: InCell Analyzer (Image acquisition) ***Dr. Anthony Lim, Field Application Scientist, GE Healthcare, Singapore* **Dr. Wunchana Seubwai*
1200-1300	Lunch 2
1300-1400	Practical approaches for analyzing multidimensional imaging data **Dr. Somponnat Sampattavanich* **Dr. Siwanon Jirawatnotai*
1400-1500	Hands-on workshop 2: Cell Profiler (Data mining)
1500-1515	Coffee break 4
1515-1615	Hands-on workshop 3: Cell Profiler Analyst (Machine learning)
1615-1630	Conclusion

*Supported by TRF Senior Research Scholar Grant through S. Wongkham RTA5780012
** Supported by GE Healthcare Life Sciences

Invited speaker

Genetic Profiling, a Personalized Approach of Cancer.

Marie-Claude Gingras, Ph.D.

Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

e-mail: mgingras@bcm.edu

The origin of cancer has been debated among different theories. The concept has emerged that cancer is caused by mutation in genes regulating cellular growth. However, until the development of advanced sequencing technology, the identification of driver genes was slow and required tremendous human and monetary resources. Next generation sequencing has revolutionized the field of discovery. It is now possible to catalogue exhaustively the mutations in cancer, to identify the regulatory pathways, networks, and cellular functions perturbed in each tumor, to define epigenetic events such as methylation patterns and chromosomal copy number variation, to profile gene expression and identify alternative splice variants and to profile a specific tumor for diagnosis and prognosis markers. The picture that is emerging from the multiple cancer types studied of thousands of patients is one of complexity, heterogeneity, and adaptation that mimics the fundamental logic of evolution defined by genetic selection for survival advantage. Accordingly, cancer treatment will require the identification of the molecular differences unique to each patient to tailor specific personalized treatment including the development of therapeutic cocktails made of multiple drugs to deal with clonal heterogeneity.

Invited speaker

Targeted therapy: is it the magic bullet?

Siwanon Jirawatnotai, Ph.D.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mahidol University, Thailand

e-mail: siwanon.jir@mahidol.ac.th

Cancer targeted therapy is a novel paradigm, and a promising hope for cancer treatment. Accumulated research on the steps that contribute to the tumorigenesis, e.g. immortalization, cellular transformation, angiogenesis, and invasion and metastasis, has resulted in specific sets of gene that apparently can be proposed as suitable targets for cancer treatment. Currently, more than 100 cancer genes are labeled as “actionable” for treatment. With advance in cancer research, a lot more genes will be identified and used as a drug target, in a near future. However, drug resistance and short-term effectiveness are seriously undermining this new paradigm. The shortcomings are supposedly a result of the lack of the “larger picture” of how cancer cells and the cancerous protein networks are operating. We will discuss the promise and the problem of the targeted therapy, hoping to better understand the so-called “magic bullet”.

Invited speaker

3D structured illumination microscopy (3D-SIM): applications in cell and developmental biology

Graham Wright, Ph.D.
Microscopy Unit, Institute of Medical Biology, A*STAR, 8A Biomedical Grove, Singapore
e-mail: graham.d.wright@gmail.com

This presentation will introduce how 3D-SIM superresolution microscopy is being applied at the Institute of Medical Biology (IMB), A*STAR in Singapore. IMB has 3 main research programs in skin research, genetic diseases and stem cell biology - advanced microscopy techniques are critical in furthering the understanding of conditions ranging from fertility to skin fragility disorders. Importantly research projects benefit from the application of varied microscopy techniques, so examples of correlating SIM results with live-cell imaging and FRAP data will be presented.

3D structured illumination microscopy (3D-SIM, on the DeltaVision OMX at IMB) enables microscopy at finer resolution than can be achieved with standard optical microscopes. Abbe's diffraction limit meant that, until recently, lateral resolution had been limited to ~250nm at best. 3D-SIM relies on exciting fluorescent samples with a structured pattern, moved through multiple angles and phase positions. As the structured illumination interacts with the structures inherent in the sample moiré fringes containing higher frequency information are produced. Subsequent computational processing and reconstruction allows a resolution of ~120nm to be attained. Varied applications will be introduced here, along with the practical considerations for executing 3D-SIM imaging experiments.

Whilst 3D-SIM gives us high spatial resolution, it is often advantageous to correlate these result with live-cell imaging data to get finer temporal resolution. Live-cell imaging allows us to observe and quantitate the dynamic processes of cells as they grow, migrate, interact with one another and progress through the cell cycle. By overcoming the challenges of maintaining the cells in culture and, importantly, 'happy' on the microscope stage we gain a greater insight into the biological processes in question. In IMB we routinely combine live-cell imaging with varied microscopy techniques, such as phase contrast, DIC, widefield fluorescence and optical sectioning techniques (deconvolution and confocal).

Keywords: Superresolution microscopy, 3D-SIM, live-cell imaging, cell biology

Invited speaker

Systems approaches for lead and target identification in drug discovery

Somponnat Sampattavanich, Ph.D.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

e-mail: somponnat@gmail.com

Invited speaker

High-content imaging and analysis: New high value assays for translational research

Ivan Biros, Ph.D.

GE Healthcare Life Sciences, Cell Technologies, Asia Pacific

e-mail: ivan.biros@ge.com

Predictive toxicology is a critical area for improvement in drug discovery in order to avoid expensive late-stage clinical failures and the damaging consequences of withdrawing market approved drugs. Early-stage toxicity testing can increase confidence in the progression of drug candidates. The introduction of effective predictive toxicity models will decrease drug toxicity in the marketplace by an order of magnitude.

Cellular research in predictive toxicology typically involves using techniques such as biochemical assays, microscopy, Western blotting and flow cytometry to investigate cell responses to various exogenous agents. Whilst these techniques can be highly valuable, they can also have limitations in throughput, can disrupt the cell's integrity or can be highly labor intensive.

High-content analysis (HCA) is a powerful technique for linking modern cell biology to automated microscopy to enhance extraction and understanding of multi-parameter data from high-throughput, cellular and sub-cellular imaging. The automation and throughput provided by HCA allows you to ask more questions and to answer them more quickly.

Keywords: drug discovery, High Content Analysis

Oral presentation

O-GlcNAcylation promotes the progression of cholangiocarcinoma

Kanlayanee Sawanyawisuth, Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit,
Kulthida Vaeteewoottacharn, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham
Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center,
Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
e-mail address: kanlayanee@kkumail.com, sopit@kku.ac.th

O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification consisting in the addition of a single sugar moiety, N-acetyl glucosamine (O-GlcNAc), to serine/threonine residues of cytosolic or nuclear proteins. The O-GlcNAc cycling process is catalyzed by two enzymes; O-GlcNAc transferase (OGT) which adds O-GlcNAc and O-GlcNAcase (OGA) which removes the O-GlcNAc. O-GlcNAcylation has been shown to play a significant role in cancer development. Increasing of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinoma (CCA) comparing with the normal bile duct counterpart was reported. The elevation of O-GlcNAcylation in CCA was related with increased OGT and decreased OGA expression. Moreover, the aberration O-GlcNAcylation status was associated with poor clinical outcomes of CCA patients. Here, we aimed to explore the roles of O-GlcNAcylation in CCA cell lines. Cell proliferation, migration, and invasion were determined in the CCA cell lines—KKU-M213 and KKU-M214 treated with siOGT and siOGA. The migration and invasion ability of the siOGT treated cells were significantly decreased comparing with the scramble siRNA treated cells. In contrast, suppressed OGA expression by siRNA enhanced cell migration and invasion. The expressions of metalloproteinase (MMP) 2 and MMP 7 were altered according to the level of O-GlcNAcylation. This information emphasizes the role of O-GlcNAcylation in metastasis of CCA without the altering CCA cell growth. The molecular mechanism underlining the involvement of O-GlcNAcylation in metastasis of CCA is under investigation.

Keywords: O-GlcNAcylation, cholangiocarcinoma, metastasis

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University to S. Wongkham (RTA5780012); The Invitation Research Fund, Faculty of Medicine, Khon Kaen University (to CP).

Oral presentation

Induction of O-GlcNAcylation by glucose is associated with metastasis of cholangiocarcinoma

Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham*

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

e-mail: chatchai_phoo@hotmail.com, sopit@kku.ac.th

To support cancer cell growth and development, cancer cells increase glucose uptake. Glucose metabolism generates not only the energy but also the intermediates that require for cancer growth. The intermediates are generated by the bypass pathways of glucose metabolism. The hexosamine biosynthesis pathway (HBP) is one of the pathways in which glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransfrase (GFAT) is the rate-limiting enzyme and UDP-GlcNAc is the product. The O-GlcNAcylation is regulated by two enzymes; O-GlcNAc transferase (OGT) which transfers GlcNAc to serine or threonine to generate O-GlcNAcylated proteins (OGP); and O-GlcNAcase catalyzes the reversed reaction. Moreover, O-GlcNAcylation is also controlled by the level of UDP-GlcNAc, a sugar donor of OGT. Association of hyperglycemic condition and induction of O-GlcNAcylation, together with cancer progression has been reported in many cancers. This study is aimed to investigate whether high glucose condition can regulate O-GlcNAcylation in high metastatic CCA cell. The CCA cells with different metastatic potential; parental and highly metastatic cells were cultured in low (5.6 mM) or high (25 mM) glucose media. The migration and invasion abilities of CCA cell lines cultured in different glucose conditions were compared. The OGP level, enzymes in glycolytic pathway, HBP and OGT expressions were determined. The OGP, migration and invasion of CCA cell lines cultured in high glucose condition were significant higher than those cultured in low glucose condition. The higher expressions of HK-II, GFAT, and OGT of the high metastatic CCA cells than parental cells induced by glucose were detected. The role of GFAT on OGP was further demonstrated with positive correlation between GFAT and OGP found in CCA patient tissues. Using GFAT inhibitor, DON, can effectively reduce OGP level and decrease CCA cell migration. These data suggest the role of glucose in modulating O-GlcNAcylation level in high metastatic CCA cells via GFAT expression.

Keywords: glucose, GFAT, O-GlcNAcylation, cancer metastasis

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University and the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund, Thailand (PHD/0016/2556) to C. Phoomak and S. Wongkham.

Oral presentation

Identification of therapeutic targets for cholangiocarcinoma using DNA microarray database

Wunchana Seubwai[1,3], Ubonrat Thamrongwaranggoon[1,2], Unchalee Thonsri[1,2], Ubon Cha'on[1,2], Sopit Wongkham[1,2]

[1]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002. [2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002. [3]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002.

e-mail: wunchanas@yahoo.com

Cholangiocarcinoma (CCA), an aggressive and lethal cancer, arises from biliary epithelium. It is responds poorly to traditional chemotherapy. Therefore, novel molecular-targeted therapeutics directed against CCA constitutes an urgent need. The present study aimed to identify potential targets for CCA treatment. The differentially expressed genes (DEGs) between CCA and normal cells were assessed using microarray data obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Pathway analysis was performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. In summary, 2530 up- and 578 down-regulated DEGs were identified. DEGs were mainly involved in 25 pathways related to cell proliferation, cell signal transduction and glucose metabolism. The expression of genes in glucose metabolism including glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2) and lactate dehydrogenase A (LDHA) were further verified in CCA patient tissues. The overexpression of GLUT1, HK2, PKM2 and LDHA were observed in CCA tissues compared to normal bile duct epithelium. GLUT1 and LDHA expression were also significantly associated with poor prognosis of CCA patients. In addition, treatment CCA cells with specific inhibitors against GLUT1, HK2, and PKM2 significantly inhibited growth of CCA cell lines. Our results provide novel treatment strategies for further clinical therapeutic studies of CCA patients.

.

Keywords: DNA Microarray, Cholangiocarcinoma, Gene Expression Omnibus, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GLUT1

Oral presentation

Effect of high glucose condition and metformin—an anti-diabetic drug on aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma cells

Charupong Saengboonmee[1,3], Wunchana Seubwai[2,3], Sopit Wongkham[1,3]*

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
[2]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
[3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
e-mail address: scharu@kkumail.com, sopit@kku.ac.th

The effect of diabetogenic conditions, i.e. hyperinsulinemia and hyperglycemia, on increased risk and promoting progression have been reported in several cancers. It is still unclear of these conditions on cholangiocarcinoma (CCA). The national mortality rate of CCA and diabetes mellitus (DM) in Thailand is almost geographically overlapped suggesting the association of DM and CCA. Hence, it is the aims of this study to investigate the effect of high glucose condition on the progression of CCA cells. CCA cells were cultured in normal glucose (NG; 5.6mM) and high glucose (HG; 25 mM) for at least 5 passages prior to assay. CCA cells in HG condition exert higher aggressive phenotypes; namely increased proliferation, adhesion, migration and invasion. Screening the pathways underlying those phenotypes using phospho-kinases array suggested STAT3 as a candidate. The immunoblot confirmed that the phosphorylated STAT3 (Y705 and S727) was increased in cells cultured in HG condition. The downstream targets of STAT3 corresponding to the proliferation (cyclin D1), adhesion and migration (vimentin) and invasion (matrix metalloproteinase 2) were also shown to be up-regulated in HG condition. The immunohistochemistry of CCA tissues from patients with high pre-operative fasting blood glucose (FBG) (>126 mg/dL) also showed higher nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) comparing to those with normal FBG. In addition, the anti-diabetic drug, metformin, significantly suppressed the proliferation of CCA cells. Moreover, the sub-lethal dose of metformin exerts the anti-metastatic potential (migration and invasion) of CCA cells. Altogether, these data suggest the role of glucose on stimulating CCA cells progression *via* STAT3 pathway. The possibility of repositioning of anti-diabetic drug for CCA therapy was shown and may provide more effective treatment of CCA patients with DM.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Diabetes Mellitus, Hyperglycemia, Cancer progression

Oral presentation

Roles of tumor releasing factors in CCA-microenvironment interaction and cancer progression

Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2], Waraporn Saentaweesuk[1], Ryusho Kariya[2], Seiji Okada[2], Chaisiri Wongkham[1] and Sopit Wongkham[1]

[1]Department of Biochemistry and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

[2]Division of Hematopoiesis, Center for AIDS research, Kumamoto University, Japan,

e-mail: kulthidava@kku.ac.th

Increasing evidence has demonstrated the participation of tumor microenvironment in tumorigenesis. The involvement of tumor-associated microenvironment cells has been demonstrated to promote tumor development and progression. This is working partly through the tumor releasing factors in autocrine and paracrine fashions. These factors are not only promoting cancer cell growth but also induce cell invasion and metastasis. In cholangiocarcinoma (CCA), a bile duct cancer, the involvement of chronic inflammation in CCA progression has been well documented. Intensively infiltrated immune cells of both innate and adaptive immune systems were observed. Moreover, cancer associated fibroblasts, which are in abundance in sites of chronic inflammation, were increased in CCA. These cells seem to work as tumor promotors. The factors, that are required for the recruitment of tumor-associated microenvironment cells, however, are largely unknown. Moreover, the roles of CCA cells in the modulations of tumor-associated microenvironment cell functions are also yet to be determined. The knowledge regarding tumor-tumor microenvironment cell interactions might provide an opportunity for identifying a novel target for CCA treatment.

We have previously demonstrated the roles of cancer cell secreted factors on tumor vascularization and immunomodulation. A further observation showed that secreted VEGF from CCA cell lines promoted angiogenesis in the tumor mass and the interactions of CCA cells and tumor associated macrophages have then induced the production of immunosuppressive cytokines. In the current study, we aim to investigate the differentially secreted products from low and high metastatic CCA cells that might play an essential role in CCA progression. Secreted proteins from a pair of low and highly metastatic CCA cell lines were determined by human cytokine arrays. The results showed that highly metastatic cell line produced higher levels of cytokines involved in the inflammation, immune response and angiogenesis. Further functional studies are under investigation to determine the important roles of the cytokines in tumor microenvironment modulation and CCA progression.

Keywords: tumor releasing factors, tumor-tumor microenvironment interaction, cancer progression and metastasis

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Resarch Fund and Khon Kaen University, to S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University (to KV).

Oral presentation

Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of cholangiocarcinoma

Suchada Phimsen[1] , Thirayut Sombun[1], Jeeranan Jantra[1] and Sopit Wongkham[2]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University,
Phitsanulok, Thailand, 65000

[2] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002

e-mail address: tookybc@hotmail.com

Cholangiocarcinoma (CCA) is one of the highly aggressive malignant tumors that arises from the cholangiocytes lining biliary trees. The incidence and mortality of the disease are increasing worldwide, however the highest incidence has been observed in the Southeast Asia, especially in the northeast Thailand. CCA is a high metastatic tumor which is the major cause of death of CCA patients. The prevention of CCA metastasis to improve overall patient survival has provided the rationale for biomarker development. Anterior gradient protein 2 (AGR2) is a protein disulfide isomerase and is highly expressed in several human carcinomas. AGR2 has been liked to endoplasmic reticulum (ER) stress and can be secreted in extracellular fluids representing a signaling intermediate in human cancers. However, little is known about AGR2 with CCA metastasis. Previous study, using a home-made PCR real time PCR array, AGR2 was discovered as the highest up-regulated gene in the high metastatic CCA cells (KKU-M213L5) comparing with the low-metastatic CCA cells (KKU-M213). The expression and its functional roles of ARG2 in metastasis of CCA need to be explored. In this study, we have confirmed that the AGR2 expression was significantly over-expression in KKU-M213L5 comparing with KKU-M213 both in mRNA and protein levels. The effects of AGR2 on the metastatic processes such as proliferation, invasion, migration, adhesion and matrix metalloproteinases (MMPs) activity will be further demonstrated using knockdown technique. In addition the metastatic potential of AGR2 in the mouse model will be observed. We hope that AGR2 might be a novel marker and/or therapeutic target for CCA patients with metastasis.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Anterior gradient-2, Metastasis, Invasion

Oral presentation

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) as a potential prognostic marker for cholangiocarcinoma patients

Proungvitaya S[1,2], Janan M[1], Limpaiboon T[1,2], Proungvitaya T[1,2], Roytrakul S[3], Wongkham C[2], Jearanaikoon P[1,2], Chur-in S[2], Wongkham S[2]

[1] Centre Research and Development Medical Diagnostic, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

[2] Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

[3]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, Thailand

e-mail address: sirpat@kku.ac.th

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of bile ducts with a high incidence of invasion and metastasis. This disease is often detected in advanced stages because of the difficulties of early diagnosis, leading to a high mortality rate. However, biomarkers for early CCA detection are still lacking. In this study, to identify potential biomarker proteins, differential secretome analysis by the GeLC-MS/MS approach was applied with four CCA cell lines and a control immortalized cholangiocyte cell line. Among 78 up-regulated proteins, 53 including ICAM- 1 were exclusively expressed in four CCA secretomes but not in MMNK1. Based on this result, we measured ICAM-1 levels in serum samples of CCA patients and healthy controls and found significantly higher values in CCA patients' sera. Receiver operating characteristic curve analysis suggested that serum ICAM-1 level could be a discriminatory diagnostic marker for CCA and healthy controls (area under curve=0.829) with a sensitivity of 77% and a specificity of 70% at a cut off value of 167 ng/ml. Moreover, the serum ICAM-1 showed positive correlations with alkaline phosphatase and carcinoembryonic antigen levels. Comparison of ICAM-1 levels of paired pre- and post-operative sera of 12 cases revealed significant decrease after tumor resection. However, serum ICAM-1 levels were not significantly different between CCA and benign biliary diseases with mainly inflammatory features.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Serum, Intercellular adhesion molecule-1

Oral presentation

Dendritic cells pulsed with RNA or protein from cholangiocarcinoma (CCA) cell line induce effector immune cells activation against CCA cells

Mutita Junking[1], Chutamas Thepmalee[1,2], Kittikan Sriprommunee[3], Sarina Promthong[3], Pa-thai Yenchitsomanus[1]

[1]Division of Molecular Medicine, Department of Research and Development,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

[2]Graduate Program in Immunology, Department of Immunology,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

[3]Bachelor of Science in Biological Sciences Program, Mahidol University International College,
Mahidol University, Nakhonpathom 73170, Thailand

e-mail address: mjunking@gmail.com

Dendritic cells (DCs) are potent antigen-presenting cells and play central role in T cell-mediated immunity. DCs have been shown to induce antitumor immune responses, and their efficacy is being examined in clinical trials. Compared with therapeutic approaches based on single tumor antigen, total RNA or protein lysate from tumor gives the advantage of inducing a broad immune response against tumor-associated antigens expressed by the tumor. In this study, we develop an in vitro model for investigate effector immune response induced by pulsed DCs. Monocyte-derived DCs from healthy donor were pulsed with total RNA or protein lysate from cholangiocarcinoma (CCA) cell line. The pulsed DCs were activated and analyzed by morphological observation and phenotypic analysis. Autologous lymphocytes were co-cultured with mature DCs. The expression of effector immune cell activation marker could be detected. Effector immune cell-mediated cytotoxicity was assessed. The DCs which were pulsed with RNA from CCA cell line, show higher efficiency to induce cytolytic activity of effector immune cells in comparison to protein-lysate pulsed-DCs. Cytolytic activity against non-target CCA cell line was observed with weaker lysis activity than target CCA cell line. Cytolytic activity against cholangiocyte cell line was weakly observed indicating the specific cytolytic activity. These results suggest that RNA-pulsed DCs effectively stimulate effector immune cell against CCA cell line. This in vitro model can be applied to compare different therapeutic strategies and development of cellular immunotherapy in clinical application for cancer patients.

Keywords: Dendritic cells, Effector immune cells, Bile duct cancer, Cholangiocarcinoma, Cellular immunotherapy

Oral presentation

Hypomethylation of LINE-1 induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of *S*-adenosylmethionine

Chanchai Boonla[1,*], Chiraphat Kloypan[1], Monpicha Srisa-art[2], Apiwat Mutirangura[3],

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

[3]Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

*e-mail address: chanchai.b@chula.ac.th

We previously demonstrated that patients with bladder cancer had increased oxidative stress and hypomethylation of long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1), and the hypomethylation of LINE-1 was induced by reactive oxygen species (ROS) in bladder cancer cells. In this study, we asked if ROS-induced LINE-1 hypomethylation was mediated via the depletion of methyl donor, *S*-adenosylmethionine (SAM). Bladder cancer (UM-UC-3 and TCCSUP) and human kidney (HK-2) cell lines were exposed to H_2O_2 to stimulate oxidative stress. Level of LINE-1 methylation, SAM, and homocysteine (Hcy) were measured in the H_2O_2-exposed cells. Effects of α-tocopheryl acetate (TA), *N*-acetylcysteine (NAC), methionine, SAM, and folic acid on oxidative stress and LINE-1 methylation in the H_2O_2-treated cells were investigated. Viabilities of cells treated with 20 μM H_2O_2 were not significantly altered. Intracellular ROS production and protein carbonyl content were significantly increased, but LINE-1 methylation was significantly decreased in the H_2O_2-treated cells. LINE-1 methylation was restored by TA, NAC, methionine, SAM, and folic acid. SAM level in H_2O_2-treated cells was significantly decreased, while total glutathione was significantly increased. SAM level in H_2O_2-treated cells was restored by NAC, methionine, SAM, and folic acid; while, total glutathione level was normalized by TA and NAC. Hcy was significantly decreased in the H_2O_2-treated cells, but it was successfully restored by NAC. Conclusion, in bladder cancer and normal kidney cells exposed to non-lethal dose of H_2O_2 – SAM and Hcy were decreased, but total glutathione was increased. Treatments with antioxidants (TA and NAC) and one-carbon metabolites (SAM, methionine, and folic acid) restored these changes. This pioneer finding suggests that exposure of cells to ROS activates glutathione synthesis via the transsulfuration pathway leading to deficiency of Hcy, which consequently causes SAM depletion and eventual hypomethylation of LINE-1.

Keywords: Oxidative stress, bladder cancer, DNA methylation, LINE-1, SAM

Oral presentation

Reduced expression of Ring Finger Protein 43 indicates a poor prognosis of cholangiocarcinoma

Chutima Talabnin[1], Patcharee Janthavon[1], Sunisa Thongsom[1], Krajang Talabnin[3], Wipa Suginta[1], Sopit Wongkham[2]

[1]Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khonkaen, 40002, Thailand

[3]School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

e-mail address: chutima.sub@sut.ac.th

Ring finger Protein 43 (RNF43) encodes an E3 ubiquitin-protein ligase that negatively regulates Wnt/β-catenin signaling pathway. RNF43 reduces Wnt signals by selectively ubiquitinating frizzled receptors, thereby targeting these Wnt receptors for degradation. It has been shown that RNF43 is frequently mutated in cholangiocarcinoma (CCA). In this study, we determined RNF43 polymorphisms and expression in CCA tissues and demonstrated the correlation between RNF43 expression and RNF43 mutation status, RNF43 polymorphism, clinicopathological features and prognosis of CCA patients. We found that RNF43 had a reduced expression in CCA. The downregulation of RNF43 mRNA expression was significantly correlated with the presence of RNF43 rs2257205 and RNF43 somatic mutation. In addition, the protein expression of RNF43 was also confirmed that all RNF43 somatic mutations in CCA are inactivated. Overall survival was worst in patients with downregulation of RNF43 protein expression. However, there was no statistically significant association of RNF43 mRNA or protein expression and any clinicopathological features or RNF43 polymorphism (RNF43 rs3744093 and rs2257205 genotypes) respectively. Preliminary studies on biological functions of RNF43 showed that knockdown of RNF43 lacking Wnt protein activation could induce G1-S arrest and inhibit cell migration in CCA cells. These results indicate that RNF43 somatic mutations might cause down regulation of the expression of RNF43 and RNF43 may play a crucial role during development of CCA.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Ring Finger Protein 43 (RNF43), Prognostic marker

Oral presentation

The relationship between c-*myc* amplification and human papillomavirus (HPV) infection of oral cancer in Northeast Thailand

Jureeporn Chuerduangphui[1,6], Tipaya Ekalaksananan[1,6], Natcha Patarapadungkit[2,6], Apinya Chotiyano[3,6], Supanee Promthet[4,6], Bunkerd Kongyingyoes[5], Piyawut Swangphon[1,6] and Chamsai Pientong[1,6]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[2]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[3]Anatomical Pathology Unit, Khon Kean Hospital, Khon Kaen 40002, Thailand.

[4]Department of Epidemiology, Faculty of Public Health, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[5]Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[6]HPV & EBV and carcinogenesis Research Group, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

e-mail address: omdonw99_juree@hotmail.co.th

The malignant progression of HPV-infected cells in the oral cavity is likely to participate with alterations at the cellular genome level, commonly occurs through overexpression or activation of several proto-oncogenes. *c-myc* amplification appears to underlie most of c-Myc overexpression and subsequently moderate *cyclin D1* amplification affecting different aspects of cell behaviors. The strong evidence showed that HPV16 infection is associated with *c-myc* amplification in cervical cancer, whereas in oral cancer is still limited. This study investigated the association of HPV infection with *c-myc* amplification and theirs correlation with c-Myc expression and *cyclin D1* amplification. The extracted DNA from 148 formalin fixed paraffin embedded oral cancer tissue was examined for copy number of c-*myc* and *cyclin D1* gene by real-time PCR (RT-PCR) and normal buccal cells were used as calibrators. c-Myc expression was determined by immunohistochemistry on tissue microarray. HPV infection was investigated by RT-PCR and *in situ* hybridization and reverse line blot hybridization for HPV genotyping. The relationship between HPV infection and c-*myc* amplification was analyzed. c-Myc expression, HPV infection and *cyclin D1* amplification was statistical analyzed with *c-myc* amplification as well as histological grade. The result showed that HPV infection was 58.1% and HPV16 was most common found. Interestingly, HPV infection was not statistic significant associated with *c-myc* amplification (55.4%), whereas associated with *cyclin D1* (27%). c-Myc expression was 74.8% and significant corresponded with c-*myc* amplification (87.1%). Additionally, c-Myc overexpression was more frequently found in *cyclin D1* amplification (76.3%) and HPV infection (76.4%). Only *cyclin D1* amplification was significant associated with poorly differentiated squamous cell carcinoma. This result showed that *c-myc* amplification in oral cancer might be activated by various factors including HPV infection which can promote c-Myc overexpression and *cyclin D1* amplification and suggested that in HPV associated oral cancer, degree of oral malignancy might be more aggressive.

Keywords: c-*myc* amplification, *cyclin D1*amplification, c-Myc expression, human papillomavirus and oral cancer

Oral presentation

ASSOCIATION OF CIRCULATING CD64/CD163 MONOCYTE WITH INFILTRATING TUMOR M2 MACROPHAGE DENSITY AND CERVICAL LESION SEVERITY.

Swangphon Piyawut[1,4], Pienthong Pienthong[1,4], Azuma Miyuki[2], Tungsiriwattana Tumwadee[3], Sungkhomkhamhaeng Usanee[3], Ekalaksananan Tipaya[1,4]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. [2]Department of Molecular Immunology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. [3]Department of Gynecology and Obstetrics, Khon Kaen Central Hospital, Khon Kaen, Thailand. [4]HPV, EBV and Cancer research group, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

e-mail address: s.piyawut@gmail.com

The major cause of cervical cancer (CxCA) is persistent human papillomavirus (HPV) infection. Macrophages that have many functions in innate immune system are considered as important immune effector cells and can be differentiated into distinct macrophage types; M1 and M2 phenotype depending on the microenvironment. M1 are primed for the immune responses, whereas M2 works in tissue repairing and tumor growth process. Recently, it was demonstrated that carcinoma cells prevent monocyte to dendritic cell differentiation and the macrophage count increased linearly with cervical disease severity. The soluble factors secreted from carcinoma cells can also induce a change of M1 into M2 that were considered as anti-inflammatory and correlated with poor prognosis. Because of macrophages originated from blood monocytes, therefore changing of peripheral monocyte sub-population may predict HPV associated cervical disease progression. This study investigated for circulating monocyte and tissue infiltrating M2 in cervical grade lesions and theirs correlation was analyzed. Heparinized blood samples were collected from 23 normal cytology, 20 no-squamous intraepithelial lesions (SILs), 14 low grade-SIL (LSILs), 31 high grade-SIL (HSILs) and 35 CxSCC. Peripheral blood mononuclear cells were separated and analyzed for surface CD14, CD16, CD64, CD163 and intracellular IL10 by flow cytometry. Tissue M2 (CD163) phenotype was investigated by immunohistochemistry and confirmed gene expression by real-time PCR. The result showed that CD16 and CD64 positive monocyte population were significantly increased in HSIL and CxSCC group, whereas CD163 positive monocytes have the trend of decreasing, whereas IL10 positive monocyte was not significant different. The tissue M2 density, mainly found in stroma/peritumor areas, were significantly increased (>score II) in HSIL and CxSCC group. The ratio of circulating CD64/CD163 positive monocyte is correlated with linear increasing density of M2 and the cervical lesion severity. This data indicate that circulating CD64/CD163 ratio may use for prediction of cervical cancer progression.

Keywords: HSIL, Cervical cancer, CD64/CD163, M2 macrophages.

Invited speakers:

***Prof. Dr. Carlito B. Lebrilla**, Department of Chemistry, UC Davis, CA, US.*

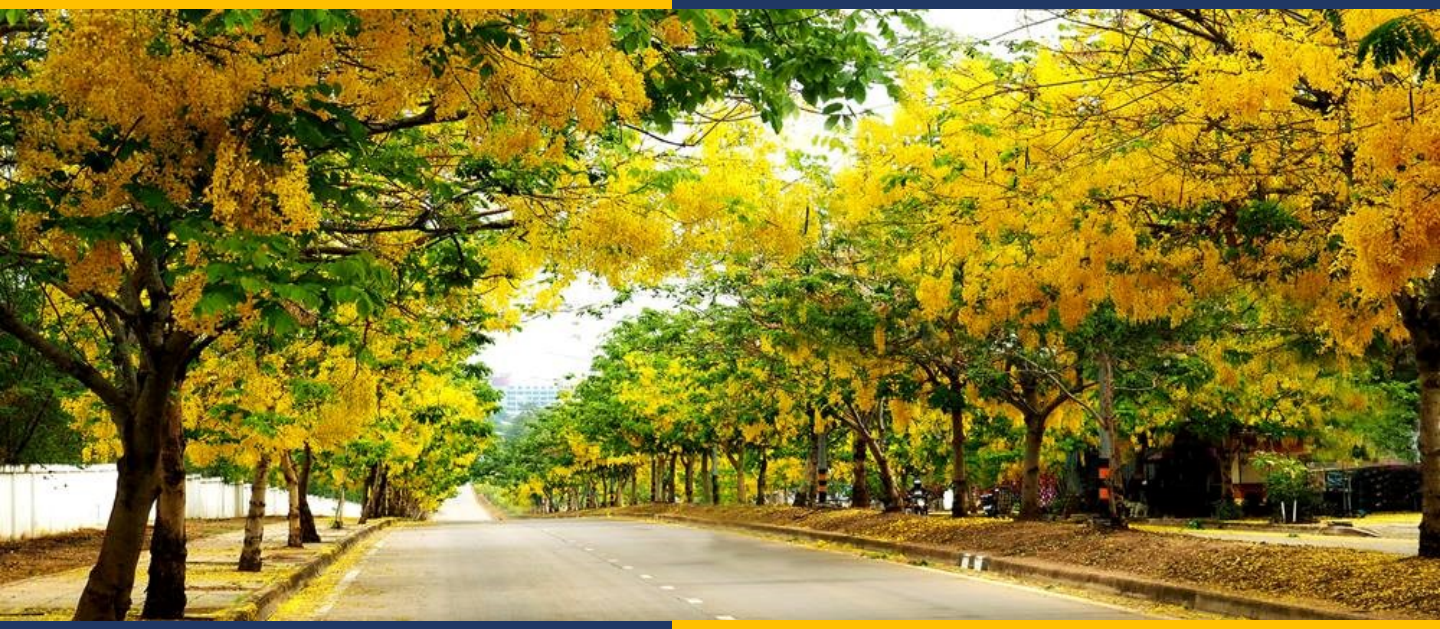
***Assoc. Prof. Dr. Sakda Daduang**, Faculty of Pharmacology, Khon Kaen University, Thailand.*

***Dr. Trairak Pisitkun**, Chulalongkorn University Systems Biology Center, Chulalongkorn University, Thailand.*

***Dr. Goh Lin-Tang**, Product Manager (Southeast Asia) Mass Spectrometry, Thermo Fisher Scientific.*

Frontier in Cancer Research II

"Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications"



18-19 MAY 2016

Meeting room 3A-C,
Wechawichakarn Building
Faculty of Medicine,
Khon Kaen University

Topics:

- **Glycoproteomics in cancer and autoimmune diseases**
- **Application of Systems Biology approaches to disease models**
- **Proteomics of arthropod venom: the therapeutic, pharmaceutic and industrial applications**
- **Proteomics data analysis workshop**

***Supported by**
TRF Senior Research Scholar Grant through S. Wongkham RTA5780012

Report

It is my pleasure to welcome your all to the Frontier in Cancer Research II, 2016. I would like to report you of the background of this meeting that it is a compulsory activity for the awardee of the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund. Professor Suthipan Jitpimolmart and his administrative team kindly visited me and my research group for the informal announcement of the Senior Research Scholar Grant award in August, 2014 and I have received the award officially from Her Royal Highness Princess Maha Chackri Sirindhorn on 10th April, 2015. Our group proposed to use the multi-molecular approaches to discover alternative targets for cholangiocarcinoma treatment. There are 5 junior, 2 senior researchers and many M.Sc.-Ph.D. graduate students joining the project.

This meeting is held on the purpose for updating the new advanced biology and useful information for researchers in cancer research. Not just only for the academic, the networking among researchers in the cancer field is also expected. The theme of this FCRII meeting, "**Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications**" was given to signify the usefulness of the 2-omics, Glycomics and Proteomics in Biomedicine. This omics studies also need the new advances in analytical technologies to monitor the dynamic and the complexity of glycans and proteins in the host of the diseases such as in cancers. Systems biology is a frontier strategy for understanding this complexity as a whole. In this meeting there are 10 oral presentations and 5 guest speakers; Professor Carlito Lebrilla, from the Department of Chemistry, and Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California, Davis, USA, Dr. Trairak Pisitkun, Chulalongkorn University Systems Biology Center, Chulalongkorn University, Thailand, Assoc. Prof. Dr. Sakda Daduang, Faculty of Pharmacology, Khon Kaen University, Thailand, Dr. Goh Lin-Tang, Product Manager (Southeast Asia) Mass Spectrometry, Thermo Fisher Scientific Company, and Mr Tonkla Insawang from the Research Instrument Center, Khon Kaen University. There are 40 participants, of which are from the Faculty of Medicine, and from other institutes.

The meeting of the second day will focus on the glycomics and proteomics data analysis workshop; the recent development and advancement in high resolution MS applications for biomedical proteomics and glycomics and the introduction of proteomics and glycomics facilities and services in Khon Kaen University.

Finally, I would like to thank all guests and invited speakers, presenters, participants and my research group members who made this meeting possible. Last but not least, Thermo Fisher Scientific company for supporting the guest speaker for introducing the Mass spectrometry technology, the Research Affairs for providing the space and instrument for demonstration, Thailand Research Fund, and Khon Kaen University for the financial support of this meeting.

Professor Sopit Wongkham

Awardee of the Senior Research Scholar Grant
(RTA5780012), Thailand Research Fund and Khon
Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Opening Address

It is a great pleasure to be here again at the conference of the second "Frontier in Cancer Research, 2016", at the Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

This conference focuses on the "Glycomics and Proteomics" which are necessary for biomedical research at both basic and advanced levels. Carbohydrate itself is a complex molecule. States of specific glycosylation and diseases has been linked for more than 4 decades. Aberrant patterns of oligosaccharide modification in proteins are found in almost all diseases including cancers. The linkage of proteins and carbohydrate modifications with the progression and metastasis of cancers highlight these technologies in cancer. Under the new advances in analytical technologies of glycomics and proteomics, I hope that this will help us to obtain the markers for early detection and effective treatment of cancer in the future.

Based on the title of the first speaker, Professor Lebrilla, "Glycosylation as indicators of Cancer", this should be an important message for fighting the cancer, especially, bile duct cancer, one of the major health problems in this area. Systems biology and proteomics strategies are also the frontier research approaches that will accelerate us to reach the target to fighting with diseases. I think the meeting will add up the knowledge to the scientists, graduate students and staffs of the Faculty of Medicine, Khon Kaen University, including to our collaborators.

I welcome all the participants to the Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Please take your time, make yourself at home, and enjoy both science and Isan culture. I have to thanks all guest speakers, Thailand Research Fund, Thermo Fisher Scientific, GE Health Care and the meeting organizers for your contribution and kind support. I wish this 2-day meeting resulting in a great success and with this auspicious moment, I would like to declare the meeting open.

Associate Professor Charnchai Panthongviriyakul

Dean, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Frontier in Cancer Research II
"Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications"
May 18-19, 2016
Meeting room 3A-C, Wechawichakarn Building
Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Wed 18 May	
08:00-08:30	Registration
08:30-09.00	Opening remarks: ***Assoc.Prof. Charnchai Panthongviriyakul, MD.*** *Dean, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.*
09.00-10.00	**Invited speaker 1:** **"Glycosylation as indicators of Cancer"** ***Prof. Carlito B. Lebrilla, Ph.D.*** *Department of Chemistry, UC Davis, CA, USA.*
10.00-10:15	Coffee break
10:15-11:45 10:15-10:30 10:30-10:45 10:45-11:00 11:00-11:15 11:15-11:30	**Oral presentation 1** ***Chatchai Phoomak****,* *Faculty of Medicine, Khon Kaen University*, *Thailand.* "High mannose type N-glycan associates with O-GlcNAcylation and progression of cholangiocarcinoma cells" ***Krajang Talabnin, Ph.D.*** *Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Thailand.* "Increased expression of NeuAc3H3N3M3N2F tri-antennary N-glycans in cholangiocarcinoma serum" ***Voraratt Champattanachai, Ph.D.*** *Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute, Thailand.* "Proteomic analysis of extracellular O-GlcNAc-modified proteins in colorectal cancer" ***Kanlayanee Sawanyawisuth, Ph.D.*** *Faculty of Medicine, Khon Kaen University*, *Thailand.* *"Fucosyltransferase-1 promotes cholangiocarcinoma progression"* ***Siriporn Proungvitaya, Ph.D.*** *Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.* *"High expression of coiled-coil domain containing 25 in cholangiocarcinoma tissues"*
11:30-13:00	Lunch
13:00-14.00	**Invited speaker 2:** **"Application of systems biology approaches to disease models"** ***Trairak Pisitkun, MD.*** *Chulalongkorn University Systems Biology Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand.*
14.00-15.00 14:00-14:15 14:15-14:30	**Oral presentation 2** ***Wunchana Seubwai, Ph.D.*** *Faculty of Medicine, Khon Kaen University*, *Thailand.* "Transcriptome analysis for identification of genes related to cholangiocarcinoma progression under hyperglycemic condition" ***Somchai Pinlaor, Ph.D.*** *Faculty of Medicine, Khon Kaen University*, *Thailand.* "Proteomics approach for biomarkers discovery of opisthorchiasis and cholangiocarcinoma: A study from animal to human"

14:30-14:45	***Daraporn Chua-on*** *Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.* "High expression of apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3 (AIFM3) in human cholangiocarcinoma"
14:45-15:00	Coffee break
15:00-16.00	**Invited speaker 3:** **"Proteomics of arthropod venom: the therapeutic, pharmaceutic and industrial applications"** ***Assoc. Prof. Sakda Daduang, Ph.D.*** *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University*, *Thailand*.
16.00-16.45 16:00-16:15 16:15-16:30 16:30-16:45	**Oral presentation 3 (15 min x 3)** ***Raksmont Ubonbal*** *Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand.* "Proteomic patterns of ripening Thai fruits" ***Suchada Phimsen, Ph.D.*** *Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand.* "Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of cholangiocarcinoma" ***Paweena Dana*** *Faculty of Medicine, Khon Kaen University*, *Thailand.* "Cholangiocarcinoma products-treated fibroblast potentiates tumor growth; a promising target for CCA treatment"
Thu 19 May	
9.00-9.45	"Recent Development and Advancement in High Resolution Mass Spectrometry Applications for Biomedical Proteomics and Glycomics" ***Goh Lin-Tang, Ph.D.*** *Product Manager Mass Spectrometry, Thermo Fisher Scientific.*
9.45-10.00	Coffee Break
10.00-10.30	"Introduction of proteomics and glycomics facilities and service in KKU" ***Tonkla Insawang*** *Research Instrument Center, Khon Kaen University, Thailand.*
10:30-12:00	**Hands-on workshop 1:** "How to do biomarker discovery" ***Prof. Carlito B. Lebrilla, Ph.D.***
12:00-13:00	Lunch
13:00-15:00	**Hands-on workshop 2:** "Multiplex quantitative mass spectrometry techniques for cancer proteomic studies" ***Trairak Pisitkun, M.D.***
15:00-15:15	Conclusion and closing

*Supported by TRF Senior Research Scholar Grant through S. Wongkham RTA5780012

Invited speaker

Glycosylation as indicators of Cancer

Carlito B. Lebrilla, Ph.D.

Department of Chemistry, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California, Davis, US.

**Corresponding author:* cblebrilla@ucdavis.edu

Changes in glycosylation is a hallmark of cancer. Glycosylation is a complicated process involving many competing enzymes that produce a diverse group of structures that are readily affected by the health state of patient. Recently developed bioanalytical methods can now provide rapid throughput analysis providing identification and quantitation of distinct structures. Methods including advanced chromatographic separation and accurate mass spectrometry yield small and large changes in glycans and glycoconjugates. Glycan changes have been observed in a host of diseases including ovarian, breast, prostate, lung, liver and other cancers. In this presentation, the changes in glycosylation associated with cancer will be discussed in terms of released glycans and in glycoproteins using site-specific analysis. Understanding cancer progression in cell lines through their glycosylation also provides a novel view of how cancer and glycosylation interconnect.

Keywords: Glycosylation, Cancer, Mass Spectrometry

Invited speaker

Application of systems biology approaches to disease models

Trairak Pisitkun, M.D.

Systems Biology Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

**Corresponding author:* trairak@gmail.com

The success of the "human genome project" has marked the beginning of the 21st century inter-disciplinary field of science called "Systems Biology". It focuses on complex interactions within biological systems, using a more holistic perspective approach to biological and biomedical research. Systems biology is an integration of basic and clinical science standpoints, large-scale "omics" technologies, and high-level computational methods for data analysis and interpretation. In this lecture, we discuss the applications of several state-of-the-art methods in systems biology, viz. protein mass spectrometry and next-generation sequencing, to reveal fundamental mechanisms involved in the pathogenesis of various diseases.

Keywords: Systems Biology, Omics, Mass Spectrometry

Invited speaker

Proteomics of arthropod venom: the therapeutic, pharmaceutic and industrial applications

Sakda Daduang, Ph.D.[1,2]

[1]Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [2]Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

**Corresponding author:* sakdad@kku.ac.th

Venom from arthropods is concentrated aggressive liquid and rich sources of bioactive compounds. It has high possibilities to be a source of novel agents with high activities including proteins and enzymes. In this study, venom from many kinds of local species of arthropod, including scorpions, wasps, centipedes and fire ants, were identified for their proteins and peptides components. Using proteomic approach, 5 groups of proteins, anti-microbial peptides, phospholipases, hyaluronidases, immunoreactive agents and serine proteases were found. Heteroscorpine was identified as anti-microbial peptides with inhibitory activity against *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. For phospholipase, heteromtoxin, Sol gem 1, Ves a 1 and Ves T 1 were named. They hydrolyze phospholipids into fatty acids and other lipophilic substances. It is commonly used to produce emulsifier-like molecules by acting on the phospholipids. Phospholipase-mediated oil degumming is also a well-established process step in the refining process in cook oil industry. Hyaluronidase is an enzymes needed for degrading a big polymer, hyaluronic acid (HA), one components in the cosmetics, pharmaceutics and nutraceutical. HA oral supplement for joint disorders is well-known. Hyaluronidase is used to reduce synovial fluid viscosity before the fluid is clinically in-vitro checked for any disorders.

Keywords: arthropod, venom, anti-microbial peptides, phospholipases, hyaluronidases

Oral Presentation

High mannose type N-glycan associates with O-GlcNAcylation and progression of cholangiocarcinoma cells

Chatchai Phoomak[1], Dayoung Park[2], Kulthida Vaeteewoottacharn1[1], Atit Silsirivanit[1], Chaisiri Wongkham[1], Carlito B. Lebrilla[2]*, Sopit Wongkham[1]*

[1]Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [2]Department of Chemistry, University of California, Davis, CA, 95616, US.

**Corresponding author: cblebrilla@ucdavis.edu, sopit@kku.ac.th*

Metastasis of cancer is a character of the tumor that spreads from the primary site to another site in the body. Several membrane components including glycans are modified during metastasis. This study is aimed to explore the effect of O-GlcNAcylation on membranous N-glycan synthesis that associated with cholangiocarcinoma (CCA) progression. Global O-GlcNAcylation in CCA cells was suppressed using specific siRNA against O-GlcNAc transferase (OGT), the enzyme that transfers GlcNAc to protein, and the expression of membranous N-glycans were determined using HPLC-Chip/Time-of-Flight (Chip/TOF) MS system. The N-glycans associated with O-GlcNAcylation were obtained by comparing the N-glycans obtained from siOGT with those from the scramble siRNA treated cells. In addition, the connection of membranous N-glycans with metastasis were revealed by comparing the membranous N-glycans of the parental cells (KKU-213 and KKU-214) to those of the highly metastatic pairs (KKU-213L5 and KKU-214L5). Suppression of O-GlcNAcylation altered the expression of two specific membranous N-glycans, e.g., high mannose ($Hex_9HexNAc_2$) and complex ($Hex_5HexNAc_4FucNeuAc$) types, which were also presented dominantly in the highly metastatic CCA cells. The association of high mannose type N-glycans with CCA progression were demonstrated in kifunensine (a mannosidase-1 inhibitor) and Concanavalin A (Con A, a mannose specific lectin) treated cells. Increasing of the high mannose type N-glycans significantly enhanced the migration and invasion of kifunensine treated cells. In contrast, the migration and invasion were suppressed when the high mannose type N-glycans were blocked with Con A. This study demonstrates for the first time of the associations of the high mannose type N-glycans with O-GlcNAcylation and progression of CCA cells. The mechanism of O-GlcNAcylation induced high mannose type N-glycans related to CCA progression should be further investigated.

Keywords: N-glycans, O-GlcNAcylation, High mannose, cancer metastasis

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University and the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund, Thailand (PHD/0016/2556) to C. Phoomak and S. Wongkham.

Oral Presentation

Increased expression of NeuAc3H3N3M3N2F tri-antennary N-glycans in cholangiocarcinoma serum

Krajang Talabnin[1,6]*, Chutima Talabnin[2,6], Mayumi Ishihara[3], Parastoo Azadi[3], Sopit Wongkham[4,6], Banchob Sripa[5,6]

[1]School of Pathology, Institute of Medicine; [2]School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand; [3]Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia, Athens, Georgia, 30602, USA; Departments of [4]Biochemistry, [5]Pathology, Faculty of Medicine, and [6]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

**Corresponding author:* krajang.t@sut.ac.th

Alterations in protein glycosylation have been reported in various cancers including cholangiocarcinoma (CCA). Using nanospray ionization-linear ion trap mass spectrometry (NSI-MS^n), we demonstrated the comparative structural glycomics of *N*-linked glycans in serum from CCA patients compared with healthy controls. Five high-mannose and four complex types of *N*-linked glycans were detected. M7N2 was the most abundant structure among the high-mannose types (normal 12.12±2.54%, tumor 9.27±2.66%), while NeuAc2H2N2M3N2 predominated the complex types (viz., normal 61.17±2.55%; tumor 64.67±4.23%). Between the 4 normal and 8 tumor cases, the 3 *N*-glycans with significantly different amounts were M6N2 (*P*=0.044), M9N2 (*P*=0.030) and NeuAc3H3N3M3N2F (*P*=0.002). These 3 glycan structures may be associated with tumor progression and used for clinical diagnosis.

Keywords: Cholangiocarcinoma, *N*-linked glycoprotein, Tri-antennary *N*-glycans

Oral Presentation

Proteomic analysis of extracellular *O*-GlcNAc-modified proteins in colorectal cancer

Voraratt Champattanachai[1,2*], Parunya Chaiyawat[2], Tanin-ek Sriwitool[2] , Pukkavadee Netsirisawan[1], Daranee Chokchaichamnankit[1], Chantragan Srisomsap[1], Jisnuson Svasti[1,2]

[1]Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, [2]Applied Biological Sciences Program, Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok, Thailand.

**Corresponding author:* voraratt@cri.or.th

O-GlcNAcylation is a single sugar attachment of serine and threonine residues on intracellular proteins. Recent reports reveal that it can modify several secretory proteins, however, this modification and its underlying mechanisms are largely unexplored in cancer. In this study, we determined the *O*-GlcNAcylation level from intracellular and extracellular proteins prepared from cell lysates and serum-free conditioned medium of colorectal cancer cells (HT29, SW480, and SW620) and a normal epithelial colon cell (CCD841 Con), respectively. *O*-GlcNAcylation level was dramatically increased in both cell lysate and conditioned medium fractions of all cancer cells compared to those of normal cells. Using an ultracentrifugation preparation, we found that many extracellular *O*-GlcNAc-modified-proteins were carried in extracellular vesicles (EVs). Two-dimensional gel electrophoresis followed by LC-MS/MS and *O*-GlcNAc immunoblotting revealed that the *O*-GlcNAc modification levels of several extracellular proteins obtained from the conditioned medium and EVs of metastatic cells (SW620) was increased in comparison to those of non-metastatic cells (SW480). In addition, we discovered that serum of CRC patients displayed a higher level of *O*-GlcNAcylation compared to those of normal serum. These data, for the first time, demonstrate that proteins carried by EVs are *O*-GlcNAc-modified. Identification of these aberrant extracellular *O*-GlcNAcylation are under investigated.

Keywords: Colorectal cancer, Extracellular vesicles, *O*-GlcNAcylation, Serum

Oral Presentation

Fucosyltransferase 1 promotes cholangiocarcinoma progression

Kanlayanee Sawanyawisuth[1, 3*], Somsiri Indramanee[1,3], Atit Silsirivanit[1, 3], Chawalit Pairojkul[2, 3], Anucha Puapairoj[2, 3], Sopit Wongkham[1, 3]

[1]*Department of Biochemistry,* [2]*Department of Pathology,* [3]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002*

**Corresponding author:* kanlayanee@kkumail.com

Fucosylation is one of the most important glycosylation events involved in malignancy. Increasing fucosylated glycoconjugates has been reported in several types of cancers. Fucosyltransferase 1 (FUT1) adds fucose to the terminal galactose in lactosamine type 2 precursor. *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) is a lectin recognizing Fucα1→2Gal-containing glycans or FUT1 products. UEA-I histochemistry of 84 CCA patient tissues showed negative staining in normal hepatocytes and bile duct epithelia. Survival analysis indicated the patients with highest UEA-I histochemistry score (UHC) had a significant shorter survival than those with lower UHC. Moreover, UEA-I histochemistry revealed high expression of FUT1 glycoconjugates in hyperplastic/ dysplastic bile ducts in liver tissues of liver fluke-induced CCA in hamster. The function of FUT1 in the progression of CCA cell lines was determined. FUT1-siRNA significantly reduced the migration and invasion abilities of CCA cell lines. The insight mechanism underlying the FUT1 action in CCA progression is needed to be explored further. In conclusion, FUT1 may play a role in CCA progression and be an alternative target for CCA treatment.

Keywords: FUT1, UEA-I, Fucosylation, Cholangiocarcinoma

Oral Presentation

High expression of coiled-coil domain containing 25 in cholangiocarcinoma tissues

Siriporn Proungvitaya[1,2], Wachiraya Klinthong[1], Tanakorn Proungvitaya[1,2], Temduang Limpaiboon[1,2], Patcharee Jearanaikoon[1,2], Sittiruk Roytrakul[3], Chaisiri Wongkham[2], Anongporn Nimboriboonporn[2,4], Sopit Wongkham[2]

[1]Centre of Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University, 40002, Thailand. [2]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, 40002, Thailand. [3]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, 12120, Thailand. [4]Department of Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

**Corresponding author: sirpat@kku.ac.th*

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant transformation of biliary epithelial cells. It is a slow growing tumor but highly metastatic with poor prognosis. Bile acids are known to transactivate the epidermal growth factor receptor (EGFR) in cholangiocytes and induce cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. The protein expression profiles of bile acids-treated CCA cells were studied using a proteomic approach. To elucidate the possible mechanisms involved in the bile acid-mediated enhanced migration of CCA cells. Effects of 6 bile acids, cholic acid, deoxycholic acid, taurocholic acid, taurodeoxycholic acid, glycocholic acid and glycodeoxycholic acid, on migration of CCA cells were examined *in vitro* using a wound healing assay. Then, the possible proteins involved in the enhanced CCA cell migration were explored using a proteomic approach. Changes of protein expression profiles of CCA cells after bile acid treatment was examined using two-dimensional electrophoresis (2DE) and mass spectrometry. The results showed that cholic acid and deoxycholic acid enhanced the migration of CCA cells. CCA cells over-expressed 77 protein spots after cholic acid treatment, and 50 protein spots after deoxycholic acid treatment. LC-MS/MS analysis revealed that coiled-coil domain containing 25 (CCDC25) was significantly over-expressed in cholic acid-treated CCA cells. When expression level of CCDC25 protein was investigated by Western blot analysis, CCDC25 was found to be highly expressed in the CCA tissues but not in the adjacent non-cancerous tissues. The identified proteins were further analyzed for protein-chemical interactions using STITCH 3.1 software. CCDC25 protein was predictive signal analyzed to bind to epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR). The present results show that, after cholic acid treatment, CCDC25 was over-expressed in CCA cells in association with enhanced cell migration, suggesting that CCDC25 may be a potential therapeutic target of CCA.

Key words: cholangiocarcinoma, bile acids, migration, CCDC25

Oral Presentation

Transcriptome analysis for identification of genes related to cholangiocarcinoma progression under hyperglycemic condition

Wunchana Seubwai[1,2,4], Ubon Cha'on[1,3], Sopit Wongkham[1,3]

[1]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, [2]Metabolic Disease Research Group, [3]Department of Biochemistry, [4]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand 40002.

**Corresponding author:* wunchanas@yahoo.com

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia. The chronic hyperglycemia of diabetes is associated with long-term damage, dysfunction, and failure of various organs, especially the eyes, kidneys, nerves, heart, and blood vessels. Recent evidence from large cohort studies suggests that this hyperglycemic condition is associated with an increased risk of cancers of the liver, pancreas, colon, breast and bile duct epithelium (cholangiocarcinoma, CCA). However, the potential biological links between DM and CCA are not completely understood. Our previous findings demonstrated the possible role of DM on CCA progression. Diabetogenic glucose concentrations significantly enhance the aggressive phenotypes of CCA cell lines including proliferation, adhesion, migration and invasion via activation of the STAT3 pathway. Transcriptomic analysis using an RNA sequencing technique revealed that nuclear factor kappa B (NF- kB), ERBB and ERK/MAPK signaling pathways are the common pathways in CCA cell lines cultured by diabetogenic glucose concentrations. In addition, metformin, an anti-diabetic drug, displayed anti-tumor activity on CCA cells. Metformin arrested CCA cell growth via regulation of cell cycle regulatory proteins. It also suppressed the migration, invasion and anoikis resistance of CCA cells by reducing the expressions of MMPs and EMT proteins. In further studies we will investigate the effect of diabetogenic glucose conditions on DNA damage/repair, advanced glycation end products, long non-coding RNA and epigenetics of CCA cells. Understanding the link between DM and carcinogenesis/progression of CCA will lead to advancements in therapeutic strategies used to treat CCA with DM and may ultimately improve the therapeutic outcome.

Keywords: Diabetes mellitus, Cholangiocarcinoma, RNA sequencing, NF- kB

Acknowledgments: This work is supported by the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham (RTA5780012) and TRG Researcher grant (TRG5780188) to W. Seubwai.

Oral Presentation

Proteomics approach for biomarkers discovery of opisthorchiasis and cholangiocarcinoma: A study from animal to human

Somchai Pinlaor [1,5], Jarinya Khoontawad[1,5], Rucksak Rucksaken[1,5], Nuttanan Hongsrichan[1,5], Porntip Pinlaor[2,5], Chaisiri Wongkham[3,5], Chawalit Pairojkul[4,5], Sittiruk Roytrakul[6]

[1]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. [2]Centre for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratory, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. [3]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002,Thailand.[4]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [5]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. [6]Proteomics Research Laboratory, Genome Institute Biotechnology, Pathumthani, 12120, Thailand.

[*]*Corresponding author:* psomec@kku.ac.th

In an animal experiment of opisthorchiasis caused by *Opisthorchis viverrrini* (OV) infection and OV-induced cholangiocarcinoma (CCA) are typically used hamsters as a model. Several evidences have been reported that the histopathological changes of OV infection and OV-induced CCA in animal are mimics to the patients. Although the molecular basis of genetic information of hamster is not fully established; however, there are some genetic information are similar between hamster and human. The aim of this study was to investigate for biomarkers discovery of opisthorchiasis and CCA, proteomics approach was used to perform starting in animal and the candidate proteins were verified for their application in the patients by Western blotting, immunohistochemistry and ELISA. Several proteins involved in inflammation and fibrosis were identified and applied in the patients according to the difference degree of diseases progression. In addition, upregulated expression of proteins related to host-parasite interaction and autoantibodies against host proteins were identified and demonstrated as the new markers for diagnostic marker of CCA patients. Moreover, using curcumin, an anti-inflammatory agent, could also provide insight into target proteins for medication in inflammation-related cancer. In conclusion, several proteins involved in OV infection to OV-induced CCA were discovered and served as novel diagnostic markers of opisthorchiasis and CCA in the patients, which will be represented in this meeting.

Keywords: Biomarkers, Proteomics, *Opisthorchis viverrini*, Cholangiocarcinoma

Oral Presentation

High expression of apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3 (AIFM3) in human cholangiocarcinoma

Daraporn Chua-on[1,2], Tanakorn Proungvitaya[1,2], Anchalee Techasen[1,2], Temduang Limpaiboon[1,2], Sittiruk Roytrakul[3], Sopit Wongkham[2], Chaisiri Wongkham[2], Ongart Somintara[2,4], Sakkarn Sungkhamanon[2,5], Siriporn Proungvitaya[1,2]

[1]Centre of Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University, 40002, Thailand. [2]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, 40002, Thailand. [3]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, 12120, Thailand. [4]Department of Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

[*]*Corresponding author:* lekluk_672@hotmail.com

Prognosis of cholangiocarcinoma (CCA) patients is absolutely poor in spite of extensive efforts for the development of chemotherapy. Mitochondrial proteins play key roles in carcinogenesis of various cancers. Therefore, mitochondria are considered as the target organelles for chemotherapy of several cancers including CCA. The purpose of this study is to identify potential candidate proteins for chemotherapy using mitochondrial proteome analysis for CCA tissues. A shotgun proteomic approach using SDS-PAGE coupled with LC-MS/MS was applied to compare the expression of mitochondrial proteins in CCA and the adjacent non-cancerous tissues. Using the proteomic analysis for the pooled mitochondrial proteins purified from three each of papillary and non-papillary types of CCA and their adjacent tissues, 281 proteins were identified as mitochondrial proteins, and 105 of them were significantly different expression compared with the corresponding counterparts. Among 105 proteins, apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3 (AIFM3) was a unique protein commonly over-expressed in both papillary and non-papillary types of CCA tissues but not in the adjacent non-cancerous tissues. In conclusion, AIFM3 was aberrantly expressed only in the mitochondria of CCA tissues. This finding suggests that AIFM3 could be a potential target molecule for CCA chemotherapy.

Keywords: apoptosis-inducing factor, mitochondrial proteins, mass spectrometry, cholangiocarcinoma

Oral Presentation

Proteomic patterns of ripening Thai fruits

Raksmont Ubonbal[1], Saijai Porsoongnoen[1], Withan Teajaroen[1], Wuttichai Chanmoontree[1], Sakda Daduang[1,2*]

[1]Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. [2]Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

[*]*Corresponding author:* sakdad@kku.ac.th

Thailand is abundant with fruit products from its tropical location. Many Thai fruits show unique sweet tastes from high photosynthesis rate concerning with high intensity of sunlight and humidity. Four popular ripe Thai fruits; Nam Dok Mai Mango (*Mangifera indica Linn.*cv Nam Dok Mai), Mon Thong Durian (*Durizio zibethinus Murr*.cv Mon Thong*)*, Jack fruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) and Sapodilla (*Manikara zapota* cv. Malay) were chosen for proteomic studies from their criteria of being chimeric with high content of sugar after ripening. Proteins concerning basic biochemical metabolism, secondary metabolism, stress responses, antioxidant enzymes, cell wall hydrolases and ripening processes were identified in ripe durian. Those playing the main role in depolymerizing starch molecules, producing tantalizing fragrances were mainly found in mango. In jackfruit, the dominant proteins were those concerning oxidation reduction reaction inside the plant cells. Whereas in sapodilla, proteins involved in cell wall degradation were identified. These are the basic information to understanding the unique characters of Thai sweet fruits for plant breeding in the future.

Keywords: fruits proteomics, mango, durian, Jack fruit, sapodilla

Oral Presentation

Roles of Anterior gradient-2 (AGR2) in metastasis of cholangiocarcinoma

Suchada Phimsen[1], Thirayut Sombun[1], Worasak Kaewkong[1] and Sopit Wongkham[2]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000. [2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002

[*]*Corresponding author:* tookybc@hotmail.com

Cholangiocarcinoma (CCA) is one of the highly metastatic cancers and poor prognosis. Thailand is the highest incidence of CCA in the world. Most of the CCA patients are diagnosed at late stage and cannot be cured due to the high metastasis leading to a major cause of death. The Anterior gradient 2 (AGR2) is a protein disulfide isomerase and strongly expressed in various human cancers, and it has been claimed to promote aggressive tumor features such as proliferation, invasion and migration. AGR2 has been liked to endoplasmic reticulum (ER) stress and can be secreted in extracellular fluids representing a signaling intermediate in human cancers. However, little is known about AGR2 with CCA metastasis. Here, we have investigated the expression of AGR2 in low and high metastatic CCA cells and its functional role. Expression of AGR2 was analyzed by real time PCR and western blotting in low (KKU-M213) and high (KKU-M213L5) metastatic CCA cells. The function of AGR2 was examined by knockdown using RNA interference in KKU-M213L5. The role of AGR2 on cell proliferation and cell migration/invasion were determined by MTT and Boyden chamber assay, respectively. AGR2 was over-expressed in KKU-M213L5 cells compared with KKU-M213 cells at the mRNA and protein levels. Knockdown of AGR2 in KKU-M213L5 showed significantly suppressed cell proliferation, cell migration and invasion. Thus, AGR2 is an important molecule for the growth and migration in the metastasis of CCA, it would be strongly considered as a target for cancer therapies.

Keywords: Cholangiocarcinoma, AGR2, Metastasis, Migration and invasion

Oral Presentation

Cholangiocarcinoma products-treated fibroblast potentiates tumor growth; a promising target for CCA treatment

Paweena Dana[1, 2], Kulthida Vaeteewoottacharn[1, 2], Ryusho Kariya[3], Seiji Okada[3], Sopit Wongkham[1,2]

[1]Department of Biochemistry, [2]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, [3]Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

[*]*Corresponding author:* paweenad@hotmail.com

A tumor is composed of the cancerous and non-cancerous cells in the tumor microenvironment (TME). Generally, TME constitutes of stromal cells, endothelial cells, and the immune cells. In cholangiocarcinoma (CCA), a cancer of the bile duct epithelial cells, the major constituent in the CCA TME is a cancer-associated fibroblast (CAF). A role of CAF in the CCA progression has previously shown as it is a facilitator of CCA growth and metastasis, which together potentiate disease progression and yield a poor outcome in the patients. CAF produces the cytokines and growth factors to induce tumor cell proliferation and metastasis. Interleukin-6 (IL-6) is one major cytokine that is highly detected in CCA patients. It has been shown that increased IL-6 was partly explained by the response of cholangiocyte to a liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, products and the adaptation response of CAF as well as the CCA cells. However, the functional significance of IL-6 in the CCA modulated microenvironment has never been investigated. Therefore, we aim to investigate CCA modulated fibroblast differentiation and vice versa. Roles of IL-6 regarding these aspects will be examined. The preliminary results showed the treatment of immortalized non-cancerous derived fibroblasts with CCA product induced fibroblast migration as well as the production of IL-6, *in vitro*. When the CCA cells were co-injected with CCA-derived product treated fibroblast into the subcutaneous area of the mice, the bigger tumor masses were obtained when compared to the CCA injection alone or the fibroblast injected alone. These preliminary results suggested the role of CCA cells in fibroblast modulation and tumor promotion. The molecular mechanism by which the CCA cells promote fibroblast trans-differentiation and CAF induction is under investigation. The role of IL-6 will be emphasized. The interaction of the CCA and CCA-associated fibroblast might be a potential target for the CCA treatment

Keywords: cholangiocarcinoma (CCA), tumor microenvironment (TME), cancer-associated fibroblast (CAF), IL-6, tumor progression

Acknowledgments: This work is supported by the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham (RTA5780012), SHeP-GMS (NRU582010 to KV), and the Royal Golden Jubilee–PhD Program for P. Dana and S. Wongkham (PHD/0192/2552)

Frontier in Cancer Research III

Translational Research: From Bench to Patients

31 JULY 2017

Lecture Hall 4, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University

Special speakers

Prof. Suthipun Jitpimolmard, M.D.,
Director of the Thailand Research Fund (TRF)

Invited speakers

Prof. Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.,
Chulalongkorn University.

Prof. Sarawut Jitrapakdee , Ph.D.,
Mahidol University.

Asst.Prof. Sarin Chimnaronk, Ph.D.,
Mahidol University.

Supported by TRF Senior Research Scholar Grant through S. Wongkham RTA5780012

คำกล่าวรายงาน

เรียน รศ. นพ. ชาญชัย พานทองวิริยะกุล คณบดีคณะแพทยศาสตร์ ศ.นพ.สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ศ. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ศ. ศราวุฒิ จิตภักดี ผศ.ศรินทร์ ฉิมณรงค์ นักวิจัยภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. อาจารย์ นักศึกษา และผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่าน

การจัดประชุม Frontier in Cancer Research ครั้งนี้เป็นครั้งที่สามที่จัดโดยคณะนักวิจัยภายใต้โครงการ "การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล" ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ. โสพิศ วงศ์คำ ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งของโครงการเพื่อรายงานความก้าวหน้าในงานวิจัยแต่ละปี แต่คณะนักวิจัยได้ปรับการประชุมให้เกิดประโยชน์และคุณูปการต่อผู้เข้าร่วมประชุมมากขึ้น โดยจัดให้มีการเสนอความรู้และวิทยาการใหม่ ๆที่เกี่ยวกับการวิจัยด้านมะเร็ง และเพื่อเป็นเวทีพบปะแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ด้านการวิจัยของนักวิจัยและนักศึกษา โดยในสองครั้งแรกเป็นการประชุมนานาชาติและ hand-on workshop 2 วัน ด้าน Systems Biology for Cancer Research และ Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Applications สำหรับการประชุม Frontier in Cancer Research ครั้งที่สามนี้เป็นครั้งสุดท้ายของโครงการ ซึ่งจัดเป็นภาษาไทยโดยเน้นด้าน translational research: from bench to patients ซึ่งเป็นแนวทางการวิจัยที่ประเทศและหน่วยงานภาครัฐสนับสนุนให้มีมากขึ้น เพื่อนำประเทศเข้าสู่ Thailand 4.0 ตามนโยบายของรัฐบาล โดยได้รับเกียรติและความกรุณาจากวิทยากรพิเศษ ศ.นพ.สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย บรรยายในหัวข้อ "การวิจัยเพื่อขับเคลื่อน Thailand 4.0" และผู้ทรงคุณวุฒิ 3 ท่านคือ ศ. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศ. ศราวุฒิ จิตภักดี คณะวิทยาศาสตร์ และ ผศ. ศรินทร์ ฉิมณรงค์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมบรรยายเพื่อให้เห็นตัวอย่างของการนำความรู้และผลงานวิจัยพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ด้านการวินิจฉัยและรักษามะเร็งในมิติที่แตกต่างกัน การนำเสนอผลงานสรุปของแผนงานวิจัยภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 4 ท่าน และการนำเสนอผลงานของศิษย์เก่าหลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุลอีก 5 ท่าน เนื่องจากการจัด Frontier in Cancer Research ครั้งที่สามนี้นอกจากจัดเป็น precongress ของการประชุมวิชาการประจำปีของคณะแพทยศาสตร์แล้วยังเป็นการจัดต่อเนื่องกับการประชุมฉลอง 25 ปีหลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล และ 45 ปี ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นด้วย

ดิฉันขอขอบพระคุณท่านคณบดีเป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาและให้เกียรติเป็นประธานเปิดงานให้ทุกครั้ง ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิและวิทยากรรับเชิญ โดยเฉพาะท่าน ศ.นพ.สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ที่ให้เกียรติเป็นผู้บรรยายพิเศษ และผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่านที่ให้เวลาและร่วมกิจกรรมในวันนี้ และท้ายสุดขอขอบคุณอาจารย์และนักศึกษาทั้งที่อยู่เบื้องหน้าและเบื้องหลังที่ร่วมแรงร่วมใจในการจัดงานครั้งนี้

ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.
ประธานจัดการประชุม

คำกล่าวเปิด

เรียน ศ.นพ.สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, ศ. โสพิศ วงศ์คำ, ศ. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, ศ. ศราวุฒิ จิตภักดี, ผศ. ศรินทร์ ฉิมณรงค์, นักวิจัยภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. อาจารย์ นักศึกษา และผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่าน

วันนี้นับเป็นวันดี ๆอีกวันหนึ่งของคณะแพทยศาสตร์ ที่มีการประชุม Frontier in Cancer Research III: Translational research-from bench to patients ซึ่งจัดเป็น precongress ของการประชุมวิชาการประจำปี คณะแพทยศาสตร์ เวลาผ่านไปเร็วที่ทราบว่าการประชุม Frontier in Cancer Research ครั้งนี้เป็นครั้งที่สามและเป็นครั้งสุดท้ายของโครงการ ก่อนอื่นผมขอแสดงความยินดีกับ ศ. โสพิศ วงศ์คำ และคณะนักวิจัย ที่ได้ทราบจากรายงานของโครงการ "การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล" ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ได้ดำเนินการตามแผน-บรรลุวัตถุประสงค์และได้ KPI เกินเป้าหมาย นอกจากสร้างผลงานตีพิมพ์จำนวนมากกว่า 22 เรื่องใน 3 ปีแล้ว ยังได้ช่วยพัฒนาอาจารย์ทุกท่านในโครงการให้สามารถขอกำหนดตำแหน่งวิชาการที่สูงขึ้น อาจารย์และนักศึกษาได้รับรางวัลมากมาย นับเป็นตัวอย่างของคณะนักวิจัยที่มีศักยภาพและคุณภาพของคณะแพทยศาสตร์

เนื่องจากวิทยาการและเทคโนโลยีด้านชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุลพัฒนาก้าวหน้าอยู่เสมอ การจัดการประชุมเพื่อนำเสนอความรู้และวิทยาการใหม่ ๆที่เกี่ยวกับการวิจัยด้านมะเร็งและเป็นเวทีพบปะแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ด้านการวิจัยของนักวิจัยและนักศึกษาย่อมเป็นประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อผู้เข้าประชุม สำหรับการประชุม Frontier in Cancer Research: translational research-from bench to patients เป็นหัวข้อที่เป็นประโยชน์และทันต่อเหตุการณ์ ตามนโยบายของรัฐบาลเพื่อนำประเทศเข้าสู่ Thailand 4.0 และขอขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับ ศ.นพ. สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการ สกว. ที่ได้ให้บรรยายพิเศษ "การวิจัยเพื่อขับเคลื่อน Thailand 4.0" ซึ่งเชื่อว่าหลังเสร็จสิ้นการประชุม ทุกท่านจะเห็นแนวทางการวิจัยเพื่อพัฒนาสู่การประยุกต์ใช้ชัดเจนขึ้น

ในนามคณะแพทยศาสตร์ ผมขอขอบคุณ ผู้อำนวยการ สกว. วิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิ 3 ท่าน ที่ให้เวลาและให้เกียรติบรรยายประสพการณ์ตรงในการประยุกต์ใช้ผลงานวิจัยพื้นฐานสู่การวินิจฉัยและรักษามะเร็ง ขอขอบคุณผู้ร่วมบรรยายและผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่าน โดยหวังว่าทุกท่านจะได้ใช้เวลาในวันนี้แลกเปลี่ยนเรียนรู้ประสพการณ์กันตามเจตนารมณ์ของการประชุม ขอให้การประชุมนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย และขออำนวยพรให้ท่านที่เดินทางมาจากจังหวัดอื่นกลับสู่ที่พำนักโดยสวัสดิภาพ และขอเปิดการประชุม Frontier in Cancer Research III: Translational research-from bench to patients ณ บัดนี้

รศ. นพ. ชาญชัย พานทองวิริยะกุล
คณบดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กำหนดการ

วันจันทร์ที่ 31 กรกฎาคม 2560	
08:00-08:30	ลงทะเบียน
08:30-08.50	พิธีเปิด: กล่าวรายงาน โดย ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ ประธานคณะกรรมการจัดการประชุม กล่าวเปิด รศ.นพ. ชาญชัย พานทองวิริยกุล คณบดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ่ายภาพหมู่
08.50-09.10	**บรรยายพิเศษ** "การวิจัยเพื่อขับเคลื่อน Thailand 4.0" โดย ศ.นพ.สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
09.10-9.30	**รายงานผลสัมฤทธิ์โครงการ** "การค้นหาเป้าหมายเพื่อการรักษามะเร็งท่อน้ำดีแนวใหม่โดยใช้แนวทางสหวิทยาโมเลกุล" ภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ
09.30-09.50	**โครงการวิจัยที่ 1** มุ่งเป้าที่กระบวนการเติมหมู่น้ำตาล (Glycosylation) ผศ.ดร. กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์
09.50-10.10	**โครงการวิจัยที่ 2** มุ่งเป้าที่กระบวนการสร้างพลังงาน (Energy metabolism) ผศ.ดร. วันชนะ สืบไวย
10.10-10:25	พักรับประทานอาหารว่าง
10:25-11:10	**Invited speaker** "Epigenetic editing human repetitive sequences: Novel models for cancer treatment" ศ.นพ.ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11:10-11:55	**นำเสนอผลงานวิจัย ช่วงที่ 1**
	Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma ดร.อภิญญา จุ๊สกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
	Small Nucleolar Noncoding RNA SNORA23, Up-Regulated in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Regulates Expression of Spectrin Repeat-Containing Nuclear Envelope 2 to Promote Growth and Metastasis of Xenograft Tumors in Mice ดร.สุมาลี อบเชย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
	Expression of interleukin 25 (IL-25) in cholangiocarcinoma tissues รศ.ดร.ศิริพร ปรุงวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
11:55-13:00	พักรับประทานอาหารเที่ยง
13:00-13.20	**โครงการวิจัยที่ 3** มุ่งเป้าที่ระบบนิเวศน์ของมะเร็ง (Tumor environment) ผศ. ดร. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์
13.20-13.40	**โครงการวิจัยที่ 4** การพัฒนายาอื่นที่มีอยู่แล้วเพื่อการรักษามะเร็ง (Drug repositioning) ผศ.ดร. อุบล ชาอ่อน
13:40-14:25	**Invited speaker**

	"Impaired mitochondrial anaplerosis and biosynthesis of highly invasive breast cancer cell line lacking pyruvate carboxylase" ศ.ดร.ศราวุฒิ จิตรภักดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
14:25-14:55	**นำเสนอผลงานวิจัย ช่วงที่ 2**
	LINE-1 ORF1 protein is epigenetically upregulated by reactive oxygen species through altered histone methylation and associated with bladder urothelial carcinoma progression ผศ.ดร.ชาญชัย บุญหล้า คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	Post-Genomic Era of the carcinogenic liver fluke Opisthorchis viverrini ผศ.ดร.สุทัศน์ สุทธิประภา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
14:55-15:15	พักรับประทานอาหารว่าง
15:15-16:00	**Invited speaker** "From Micro RNA Profiling to Point-of-Care Diagnosis of Cancer" ผศ.ดร.ศรินทร์ ฉิมณรงค์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล
16:00-16:10	ปิดการประชุม

Invited speaker

Epigenetic editing human repetitive sequences: Novel models for cancer treatment

Apiwat Mutirangura

Center of Excellence in Molecular Genetic of Cancer and Human Disease, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand

**Corresponding author:* mapiwat@chula.ac.th

Repetitive DNA sequences, both interspersed repeat sequences (IRS) and tandem repeat sequences, although named "junk DNA", are genome-wide targets for epigenetic regulation involving gene expression and genomic stability. Our studies in epigenetic alterations of repetitive sequences in cancer provided an opportunity for several future cancer treatments. LINE-1 hypomethylation is one of the most common epigenomic changes in cancer. Intragenic LINE-1 RNA, promoted by LINE-1 hypomethylation, forms a complex with pre-mRNA and argonaute2 proteins to downregulate gene expression in cancer. Recently, we discovered that long mononucleotide A- and T-repeats possess cis-regulatory function by using argonautes as trans-acting factors. Moreover, we evaluated gene expression profiles reported in the Gene Expression Omnibus and found high density of 13-27 A-T repeats in up-regulated genes in malignancies derived from bladder, cervix, head and necks, valva, breast, colon, liver, lung, prostate, kidney, thyroid, adrenal gland, bone, blood cells, muscle and brain. Therefore, long mononucleotide A- and T-repeats may play a role in maintaining high activity of gene transcription in cancer. Due to the cis-regulatory element roles, epigenetic regulation changes in DNA repeat elements in cancer alter genome-wide transcription levels and consequently promote malignant phenotypes. Currently we engineered an unpublished epigenetic editing complex containing poly U or antisense LINE-1 rna and tested the anticancer activity of both complexes. The epigenetic editing molecules successfully modified the epigenetic regulations of the repetitive sequences and consequently limited cancer growth. Therefore, epigenomic regulations of human repetitive sequences are promising universal targets for cancer treatment.

Invited speaker

Impaired mitochondrial anaplerosis and biosynthesis of highly invasive breast cancer cell line lacking pyruvate carboxylase

[1]Phatchariya Phannasil, [1]Khanti Rattanapornsompong, [2]Mahmound El-Assouni,

[3]Michael MacDonald, [1]Pannapa Pinweha, [1]Udom Lao-On, **[1]Sarawut Jitrapakdee***

GEMS research group, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

Department of Pediatrics, School of Medicine and Public Health, University of Wisconsin, Madison, WI, USA.

The anaplerotic enzyme pyruvate carboxylase (PC) is up-regulated in human breast cancer tissue and its expression is correlated with the late stages of breast cancer and tumor size. The involvement of PC with these two parameters was further studied in four breast cancer cell lines with different metastatic potentials; i.e., MCF-7, SKBR3 (low metastasis), MDA-MB-435 (moderate metastasis) and MDA-MB-231 (high metastasis). We generated multiple stable PC knockdown cell lines from the MDA-MB-231 cell line and used mass spectrometry with $^{13}C_6$-glucose and $^{13}C_5$-glutamine to discern the pathways that use PC in support of cell growth. Cells with severe PC knockdown showed a marked reduction in viability and proliferation rates suggesting the perturbation of pathways that are involved in cancer invasiveness. Strong PC suppression lowered glucose incorporation into downstream metabolites of oxaloacetate, the product of the PC reaction, including malate, citrate and aspartate. Levels of pyruvate, lactate, the redox partner of pyruvate, and acetyl-CoA were also lower suggesting the impairment of mitochondrial pyruvate cycles. Serine, glycine and 5-carbon sugar levels and flux of glucose into fatty acids were decreased. ATP, ADP and NAD(H) levels were unchanged indicating that PC suppression did not significantly affect mitochondrial energy production. The data indicate that the major metabolic roles of PC in invasive breast cancer are primarily anaplerosis, pyruvate cycling and mitochondrial biosynthesis of precursors of cellular components required for breast cancer cell growth and replication. Up-regulation of PC expression in highly invasive breast cancer is partly mediated through transcriptional activation of PC gene and posttranscriptional regulation by microRNAs (miRs).

Keywords: Pyruvate carboxylase, breast cancer, anaplerosis, biosynthesis, metabolism

Invited speaker

From Micro RNA Profiling to Point-of-Care Diagnosis of Cancer

Sarin Chimnaronk, Ph.D.

Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand.

**Corresponding author:* sarin.chi@mahidol.ac.th

Micro RNAs (miRNAs) are a class of 19-23 nucleotide long, endogenous small non-coding RNAs (ncRNAs) that play a key role in post-transcriptional regulation of gene expression by binding the 3´ untranslated region (UTR) of their mRNA target transcripts. The expression patterns of miRNAs have been found to be highly specific in the course of development in specific tissues, thus suggesting the importance of strictly regulated miRNA homeostasis for normal development. In cancer, miRNAs are usually dysregulated to down-regulate tumor suppressor genes for cancer initiation and progression. These oncogenic miRNAs, also known as oncomirs, become attractive novel diagnostic and prognostic biomarkers of cancer with high specificity and sensitivity. The detectable miRNAs in tissue, blood, and other body fluids with high stability provide an abundant source for miRNA-based biomarkers in human cancers. In this presentation, I will show our recent ongoing study to profile miRNA expression in cervical cancer from Thai women at the pre-cancerous stage or cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and reveal a new design of a point-of care (POC) device using RNA biosensor for pre-screening patient with CIN. In addition, to understand the molecular function of miRNA in gene regulation, I will show a new experiment to decode global miRNA–mRNA interaction networks in cell.

Keywords: Micro RNA (miRNA), Point-of-care (POC), Cervical cancer

Oral presentation

Multi-molecular approaches for discovery of alternative targets for cholangiocarcinoma treatment

Sopit Wognkham, Ph.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

**Corresponding author: sopit@kku.ac.th*

The research program "Multi-molecular approaches for discovery of alternative targets for cholangiocarcinoma treatment" was supported by a Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund through S. Wongkham (RTA5780012). The program consisted of 4 different approaches to discover different targets for a better treatment of cholangiocarcinoma. These include: (1) Target the glycosylation process, (2) Target the energy metabolism of cancer, (3) Target the tumor and tumor environment interaction, and (4) Repositioning drugs targeted for cholangiocarcinoma. There are 2 senior and 6 junior researchers, 6 Ph.D. students and 2 M.Sc. students, running the program. During these 3 years, 22 original articles were published and 3 are under preparations. All junior researchers are promoted or being promoted to be assistant professors and many of them got national and institutional awards. All students were or going to be graduated within this year. All of them are still active in their research activities or continuing their higher education. Understanding molecular biology of cancer through different approaches provides a novel target for a better treatment of cholangiocarcinoma. The knowledge and success of each project scheme will be separately presented in this conference by individual investigator. Apart from the academic excellence, the program also activated various research collaborations both in and out country. Hopefully, these linkages will be further connected even the program is ended. The program also held a conference on "Frontier in Cancer Research" annually to convey new and advanced technologies in cancer research and to be a platform for interconnecting among researchers and students. Finally yet importantly, "Working as a Team" can accelerate the research output, generates effective budgeting, promotes individual talent and finally creates happiness in daily life.

Oral presentation

Targeting the glycosylation in Cholangiocarcinoma

Kanlayanee Sawanyawisuth[1, 3*], Chatchai Phoomak[1,3], Somsiri Indramanee[1,3], Atit Silsirivanit[1, 3], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,3], Wunchana Seubwai [2, 3], Sopit Wongkham[1, 3]

[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Forensic Medicine, [3]Cholangiocarcinoma Research Institute, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

**Corresponding author:* kanlayanee@kkumail.com

Glycosylation, an important post-translational modification, plays various biological roles in the development and progression of diseases including cancer. We investigated two glycosylation processes, namely O-GlcNAcylation and fucosylation in Cholangiocarcinoma (CCA). Elevation of O-GlcNAcylation in tumor tissues and poor prognosis of CCA patients have been reported. In this study, the role of O-GlcNAcylation in promoting tumor progression was investigated in CCA cell lines. Suppression of O-GlcNAcylation using siRNA of O-GlcNAc transferase (OGT) reduced cell migration and invasion via decreasing matrix-metalloproteinases (MMPs) in CCA cells. The alteration of O-GlcNAcylation affected the nuclear translocation of NF-κB, the upstream signaling cascade of MMP activation. Additionally, we explored the function of fucosylation in CCA. *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) lectin histochemistry demonstrated α1, 2- fucosylated glycan (AFG) was aberrantly expressed in CCA tissues and correlated with poor prognosis of patients. The expression of fucosyltransferase 1 (FUT1), the enzyme responsible for generating AFG, was knocked down in high FUT1-expressing CCA cell lines using FUT1-specific siRNA. Suppression of FUT1 significantly reduced the migration and invasion abilities of CCA cells through induction of EMT process via activations of Akt and Erk. Taken together, O-GlcNAcylation/ fucosylation and their products play a role in CCA progression and may be the alternative targets for CCA treatment.

Keywords: Glycosylation, O-GlcNAcylation, Fucosylation, Cholangiocarcinoma

Oral presentation

Targeting glucose and its metabolism for cholangiocarcinoma therapy

Wunchana Seubwai,[1,3*], Charupong Saengboonmee,[1,2] Ubonrat Thamrongwaranggoon.[1,2], Unchalee Thonsri[1,2], Ubon Cha'on[1,2], Sopit Wongkham[1,2]

[1] Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002.

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002.

[3]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002.

**Corresponding author: wunchana@kku.ac.th*

Cholangiocarcinoma (CCA), an aggressive and lethal cancer, arises from biliary epithelium. It is responds poorly to traditional chemotherapy. Therefore, novel molecular-targeted therapeutics directed against CCA constitutes an urgent need. Cancer cells differ from normal cells in their metabolic properties. It are addicted to glycolytic anaerobic pathways, in presence or in absence of a functional Krebs' cycle. Moreover, several epidemiological studies have clearly demonstrated hyperglycemia as one of the risk factors of many cancers. Thus, a better understanding of the unique metabolism of cancer cells will help to design of more effective drugs and biomarkers, which will be greatly impact for the effective treatment and diagnosis of cancer patients. In the present study, we demonstrated the glucose addiction phenotype in CCA cells including (1) the overexpression of tumor specific glycolytic enzymes including glucose transporter 1, hexokinase 2, pyruvate kinase M2 and lactate dehydrogenase A were observed in CCA tissues, (2) the aggressive phenotypes of CCA cells were increased under high glucose condition, (3) the geographical mortality surveys in Thailand have shown the overlay of geographical mortality of DM and CCA in northeast Thailand. These information indicate the significant role of glucose and its metabolism in carcinogenesis and progression of CCA cells. Our results provide novel treatment strategies for further clinical therapeutic studies of CCA patients.

Keywords: Cholangiocarcinoma, glucose metabolism, hyperglycemia

Oral presentation

Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma

Apinya Jusakul, Chern Han Yong, Ioana Cutcutache, Jing Quan Lim, Mi Ni Huang, Nisha Padmanabhan, Vishwa Nellore, Sarinya Kongpetch, Alvin Wei Tian Ng, Raluca Gordan*, Steven G. Rozen*, Tatsuhiro Shibata*, Chawalit Pairojkul*, Bin Tean Teh*, Patrick Tan*

The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Division of Clinical Immunology and Blood Transfusion, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

**Corresponding author:* Patrick Tan: gmstanp@duke-nus.edu.sg

Cholangiocarcinoma (CCA) is a deadly hepatobiliary malignancy with wide geographical variation and high incidence in countries with endemic liver-fluke infection. We collectively analysed 489 CCAs from 10 countries, combining whole-genome sequencing (71 cases), targeted/exome sequencing, copy-number, gene expression, and DNA methylation. Integrative clustering defined four CCA clusters, revealing radically different molecular landscapes between Fluke-Positive and Fluke-Negative CCAs. Fluke-Positive CCAs, confined to Clusters 1 and 2, are enriched in *ERBB2* amplifications and *TP53* mutations. Conversely, Fluke-Negative CCAs (Clusters 3 and 4) exhibit high copy-number alterations and *PD-1/PD-L2* expression (Cluster 3), or epigenetic mutations (*IDH1/2*, *BAP1*) and *FGFR/PRKA*-related gene rearrangements (Cluster 4), with whole-genome analysis highlighting *FGFR2* 3'UTR deletion as an additional mechanism for *FGFR2* upregulation. Two clusters (1; Fluke-Positive and 4; Fluke-Negative) exhibit strikingly distinct patterns of DNA hypermethylation, targeting different genomic regions (CpG islands vs shores) - mutation signature and subclonality analysis suggests that these clusters reflect different mutational pathways. Our results exemplify how genetics, epigenetics and environmental carcinogens may interplay across different geographical regions to generate distinct molecular subtypes of cancer.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Whole-genome sequencing, DNA Methylation

Oral presentation

Small Nucleolar Noncoding RNA SNORA23, Up-Regulated in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Regulates Expression of Spectrin Repeat-Containing Nuclear Envelope 2 to Promote Growth and Metastasis of Xenograft Tumors in Mice

Lin Cui,[1] Kenji Nakano,[1,*] **Sumalee Obchoei,[1]** Kiyoko Setoguchi,[1] Masaki Matsumoto,[2] Tsuyoshi Yamamoto,[3] Satoshi Obika,[3] Kazuaki Shimada,[4] and Nobuyoshi Hiraoka[5]

[1]Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University, Fukuoka, Japan; [2]Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan; [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Japan; 4Surgery Division; and [5]Pathology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

**Corresponding author:* kenakano@med.kyushu-u.ac.jp

Small nucleolar noncoding RNAs (snoRNAs) regulate function of ribosomes, and specific snoRNAs are dysregulated in some cancer cells. We investigated dysregulation and oncogenic role of snoRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. We examined snoRNA expression in PDAC cell lines by cDNA microarray and qRT-PCR. The snoRNA expression in PDAC, non-tumor pancreas and liver tissues, from subjects who underwent surgical resection, were measured by qRT-PCR and compared with clinicopathologic parameters and survival times. To examine snoRNA function, PDAC cells were transfected with snoRNA-antisense oligonucleotides flanked with amido-bridged nucleic acids, or snoRNA-expression plasmids, and analyzed in proliferation, colony formation, spheroid formation, and invasion assays. To identify snoRNA-related factors, cells were analyzed by gene expression and proteomic profiling and immunoblot assays. Mice were given intrasplenic injections of MIA PaCa2- or Suit2-HLMC cells; tumor-bearing nude mice were then given 3 weekly injections of an antisense oligonucleotides against SNORA23, a H/ACA-box type snoRNA, and tumor growth and metastasis to liver, blood, and pancreas were analyzed**.** Levels of SNORA23 increased and accumulated at the nucleolus in highly metastatic MIA PaCa2- or Suit2-HLMC cells compared with their parental cells. We detected SNORA23 in human PDAC specimens but not in non-tumor pancreatic tissues. In PDAC tissues, level of SNORA23 correlated with invasion grade and correlated inversely with disease-free survival time of patients. Expression of SNORA23 in PDAC cells increased their invasive activity and colony formation, and spheroid formation was inhibited by SNORA23 knockdown. In gene expression and proteomic profile analyses, we found SNORA23 to increase expression of spectrin repeat-containing nuclear envelope 2 (SYNE2) messenger RNA and protein. Knockdown of SYNE2 in PDAC cells reduced their invasive activities and anchor-independent survival. Administration of SNORA23 antisense oligonucleotides to mice slowed growth of xenograft tumors, tumor expression of SYNE2, tumor cell dissemination, and metastasis to liver. We found expression of the snoRNA SNORA23, which mediates sequence-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs, to be increased in human PDAC tissues compared with non-tumor tissues, and levels to correlate with tumor invasion grade and patient survival time. SNORA23 increases expression of SYNE2, possibly through modulation of ribosome biogenesis, to promote PDAC cell survival and invasion, and growth and metastasis of xenograft tumors in mice.

Keywords: Liver Metastasis; Non-Coding RNA; Oncogene; Pancreatic Cancer

Oral presentation

Expression of interleukin 25 (IL-25) in cholangiocarcinoma tissues

Supakit Kaewsarabhumi, Tankorn Proungvitaya, **Siriporn Proungvitaya**

Center of Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CDML), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, 40002 Thailand, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer of bile duct epithelium, which is found to be the highest prevalence in Northeastern of Thailand. Owing to delay in diagnosis, most patients were diagnosed in late stage and poor prognosis. Our previous study indicated that high expression of interleukin 25 (IL-25) was found in the secretomes of CCA cell lines. In the present study, we aim to investigate the expression of IL-25 in CCA tissues. IL-25 was determined in 20 CCA tissues by immunohistochemistry (IHC). The IHC scoring was performed to compare the expressions of IL-25 between cancerous and adjacent tissues. The results showed that the expressions of IL-25 were higher in cancerous tissues than adjacent tissues in metastasis group with statistically significant ($p<0.0001$). The results suggested that the expressions of IL-25 were higher in cancerous tissues than adjacent tissues in non-metastasis group, although statistically not significant ($p= 0.16$). Moreover, when compared between metastasis group and non-metastasis group we found that the expressions of IL-25 were higher in metastasis group than non-metastasis group with statistically significant ($p< 0.0015$). In conclusion, aberrant expression of IL-25 from CCA tissue could be a potential molecule that can be useful for aiding the prognosis and therapy. However, further instigations including validation in the large numbers of clinical samples and demonstration the mechanism of IL-25 in CCA are still required.

Keywords :IL-25, CCA, Cytokines, IHC

Oral presentation

Roles of CCA-cancer microenvironment interaction on cancer progression and metastasis

Paweena Dana[1], Waraporn Saentaweesuk[1], Kwanthida Uthaisar[2], Norie Araki[3], Seiji Okada[4], Chaisiri Wongkham[1], Sopit Wongkham[1,*], and **Kulthida Vaeteewoottacharn**[1,*]

[1]Department of Biochemistry and Cholangiocarcinoma Institute, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, [2] School of biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Thailand, [3]Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, and [4]Division of Hematopoiesis, Center for AIDS research, Kumamoto University, Japan,

**Corresponding author:* kulthidava@kku.ac.th, sopit@kku.ac.th

Accumulated evidence has demonstrated the significance of cancer and cancer microenvironment interactions in many steps of cancer progression and metastasis. These interactions are working through the cell-cell interactions and through the cancer releasing factors in autocrine and paracrine fashions. In cholangiocarcinoma (CCA), the involvement of the cancer microenvironment including fibroblast and monocyte/macrophage on CCA progression has been documented. The factors that are required for the interactions, however, are largely unknown. Moreover, the roles of CCA cells in the modulations of cancer microenvironment cell functions are also yet to be determined. In the current sub-project, it was aimed to determine the factors that are differentially expressed in low and high metastatic CCA cells and those that might play an essential role in CCA progression.

To achieve our goal, highly metastatic cells, KKU-213L5 and KKU214L5, have been created by *in vivo* selection. The potential uses of these cell lines as the models for mechanistic studies and treatment target screening were demonstrated. Not only acquiring the *in vitro* and *in vivo* migration and invasion properties, highly metastatic cell lines acquire higher levels of CD133, a stem cell marker thus have attained cancer stem cell properties. By using multiple approaches, several targets including anterior gradient protein-2 (AGR2), KISS1, and vimentin were demonstrated to be feasible as the targets for CCA treatment or as the indicators for advanced stages of CCA. Potential membrane proteins and glycans, as well as the secreting factors that might play roles in cancer progression and metastasis were identified. Further functional studies are under investigation to determine their functional importance. The knowledge regarding the cancer-cancer microenvironment cell interactions might provide an opportunity for identifying a novel target for CCA treatment.

Keywords: cholangiocarcinoma, CCA, cancer-cancer microenvironment interaction, cancer progression and metastasis

Oral presentation

Repurposing drugs for treatment of cholangiocarcinoma

Diwakar Guragain[1,3], Wunchana Seubwai[2,3], Chaisiri Wongkham[2,3], Sopit Wongkham[2,3], **Ubon Cha'on[1]***

[1]Departments of Biochemistry, [2]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand [3]Cholangiocarcinoma Research Institue, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

**Corresponding author:* ubocha@kku.ac.th

Cholangiocarcinoma (CCA) is known as a chemo-resistant cancer with a high rate of recurrence and metastasis. Therefore, a new therapeutic regimen such as drug repositioning may be the target of improving the clinical outcomes. Drug repositioning/or drug repurposing is the strategy of using the pre-existing drug for a new indication. The advantage of the repurposing of existing drugs is that their pharmacokinetics, toxicity and safety profile for human are already known. Therefore, it is safer and shorter the time comparing with an introducing a new drug for the same treatment. We aimed to reposition the anti-parasitic drugs, albendazole (ABZ), mebendazole (MBZ) and chloroquine (CQ), as the therapeutic agent for CCA. We explored the anti-metastatic activity of these drugs against highly metastatic human CCA cell lines KKU-M213L5 and KKU-M214L5. We found that both ABZ and MBZ elicited significant inhibition of migration, invasion and adhesion abilities of those CCA cell lines in vitro. However, *in vivo*, as a first trial, did not show a promising result of MBZ for anti-tumor growth activity. We then explored CQ, an anti-malarial drug, in a role of anti-tumor. Results indicated that CQ inhibited proliferation of CCA cancer cell lines KKU-214L0 (a parental cell line) and KKU-214L5 (a highly metastatic cell line) in dose- and time-dependent manner. CQ inhibited higher metastatic KKU-214L5 cells higher than its parental cell line. *In vivo* study is challenged for further study.

Keywords: Repurposing drug, chloroquine, albendazole, mebendazole, cancer

Oral presentation

LINE-1 ORF1 protein is epigenetically upregulated by reactive oxygen species through altered histone methylation and associated with bladder urothelial carcinoma progression

Patcharawalai Whongsiri[1], Chaowat Pimratana[2], Udomsak Wijitsettakul[2], Depicha Jindatip[3], Anapat Sanpavat[4], Wolfgang A. Schulz[5], Michèle J. Hoffmann[5], Wolfgang Goering[6], **Chanchai Boonla**[1,*]

Departments of [1]Biochemistry, [3]Anatomy and [4]Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand. [2]Division of Urology, Buriram Hospital, Buriram Province, 31000 Thailand. Departments of [5]Urology and [6]Pathology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany.

**Corresponding author:* chanchai.b@chula.ac.th

Reactivation of Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1) and oxidative stress have been suggested to have an oncogenic potential to drive tumorigenesis and cancer progression. We previously demonstrated that reactive oxygen species (ROS) caused hypomethylation of LINE-1 elements in bladder cancer cells. In this study, expression and clinical relevance of LINE-1-encoded protein (ORF1p) and oxidative stress marker 4-hydroxynonenal (4-HNE) in human bladder cancer tissues were investigated. We also asked if ROS were able to induce ORF1p expression through epigenetic control and enhance aggressive activity in bladder cancer cell lines. Our findings demonstrated that ORF1p expression and 4-HNE formation was significantly higher in cancerous tissues than adjacent noncancerous bladder tissues. ORF1p expression was positively correlated to 4-HNE expression. ORF1p expression was significantly higher in muscle-invasive tumors than in papillary/non muscle-invasive tumors and in high grade tumors compared to low grade tumors. H_2O_2 provoked oxidative stress and significantly upregulated ORF1p expression in the VM-CUB-1 cells compared with the untreated control, to a lesser degree in TCCSUP cells, but not in UM-UC-3 cells, corresponding to their basal extent of LINE-1 hypomethylation. Co-treatment with antioxidants (tocopheryl acetate and S-adenosylmethionine) significantly inhibited ROS-induced ORF1p expression in VM-CUB-1 and TCCSUP. Treatment with H_2O_2 increased migration of UM-UC-3, TCCSUP and VM-CUB-1 cells; this increase was inhibited by tocopheryl acetate. ChIP result in VM-CUB-1 cells revealed altered histone methylation patterns on LINE-1 elements under H_2O_2 exposure. H3K4me3 increased following H_2O_2 treatment, but decreased after co-treatment with antioxidant. Conversely, H3K9me3 decreased during H_2O_2 treatment, but increased after antioxidant co-treatment. In conclusions, a robust histological evidence of increased ORF1p expression and 4-HNE formation in bladder cancer tissues was obtained. Elevated ORF1p expression was associated with bladder tumor progression. ROS-induced LINE-1 expression in bladder cancer cells was associated with specific histone methylation on lysine residues. Oxidative stress increased H3K4me3 and decreased H3K9me3 on LINE-1 elements correlating with the higher expression of ORF1p in bladder cancer cells. Attenuation of ROS generation and suppression of LINE-1 protein expression might be clinically useful to prevent bladder cancer progression.

Keywords: LINE-1; bladder cancer; immunohistochemistry; ROS; histone methylation; cancer progression

Oral presentation

Post-Genomic Era of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*

Sutas Suttiprapa*, PhD and Banchob Sripa, PhD

Tropical Medicine Graduate Program (International Program), Tropical Disease Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen THAILAND

**Corresponding author:* sutasu@kku.ac.th

Now, the genome, transcriptome, and proteome of *O. viverrini* and some other flukes pathogenic for humans are available. They offer tremendous opportunities to better understand host-parasite interaction and fasten the development of new interventions. Studying single gene or protein one by one is laborious and time consuming. High throughput platform could solve this problem. The future trend is to take advantage of these new high throughput technologies to screen for biomarker, diagnostic markers, and vaccine targets for *O. viverrini* infection. Specifically, generation of protein arrays and then probe with antibody from *O. viverrini* –infected patients in order to identify potential markers for infection. The final is developing new interventions to control helminthic infection.

Keywords: *Opisthorchis viverrini*, high throughput technologies, protein microarray, biomarker screening

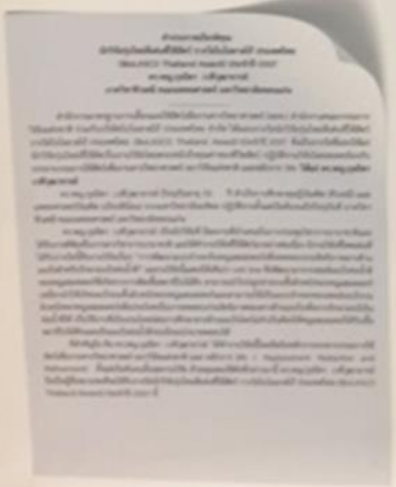
รางวัล ไบโอลาสโก้ ประเทศไทย (BioLASCO Thailand Award) ประจำปี ๒๕๕๗ สำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ดีเด่นที่ใช้สัตว์

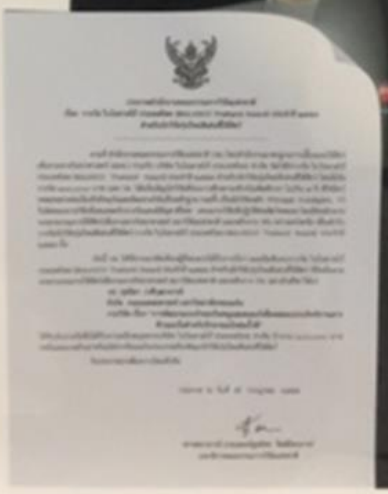
ดร.พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์

ตำแหน่ง | อาจารย์
หน่วยงาน | ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

งานวิจัยที่ได้รับรางวัล
เรื่อง "การพัฒนาแบบจำลองในหนูแฮมสเตอร์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารต้านมะเร็งสำหรับรักษามะเร็งท่อน้ำดี"
(Development of hamster model for cholangiocarcinoma anti-cancer agent testing)

ประวัติการศึกษา
2542 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2548 ปริญญาโท ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2551 ปริญญาตรี แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น





สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.)
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เกียรติบัตร

รางวัลชมเชย นักวิจัยที่ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

รางวัล สพสว. (IAD Award) ประจำปี ๒๕๕๙

มอบแก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุบล ชาอ่อน

ผู้ส่งผลงานวิจัย

เรื่อง "ผลของโมโนโซเดียมกลูทาเมตต่อเซลล์ islets of Langerhans ของตับอ่อนในหนูแรท"

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๙ กรกฎาคม ๒๕๕๙

ขอให้มีความเจริญสิริสวัสดิ์พิพัฒนมงคล ตลอดกาล

(นางสาวสุกัญญา ธีระกูรณ์เลิศ)
เลขาธิการคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

(ดร.ประดน จาติกวนิช)
ที่ปรึกษาการพัฒนางานเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ว/ว G12806

แผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิ"อานันทมหิดล"
1871 อาคารเทิดพระเกียรติ ชั้น 4
สำนักงานบริหาร สภากาชาดไทย
ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน
กรุงเทพฯ 10330

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รับที่ 3044
รับที่ 28 ก.ย. 2559
เวลา 13.34 น.

สำนักงานเจ้าหน้าที่ คณะแพทยศาสตร์
รับที่ 4600/59
รับที่ 28 ก.ย. 2559
เวลา 13.54 น.

20 กันยายน 2559

เรื่อง พระราชทานทุนส่งเสริมบัณฑิตปี 2559

เรียน คณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สิ่งที่ส่งมาด้วย สำเนาหนังสือสำนักงานประสานงานมูลนิธิอานันทมหิดล ที่ มอ. 134/59
ลงวันที่ 7 กันยายน 2559

ตามที่แผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันทมหิดล ได้ขอรับพระราชทานทุนส่งเสริมบัณฑิตปี 2559 จำนวน 10 ทุน แก่ผู้มีนามตามเอกสารที่แนบมาพร้อมนี้ เป็นเงินคนละ 20,000 บาทต่อเดือน เป็นเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 และจะประเมินผลงานเป็นรายปีต่อไป นั้น

บัดนี้ สำนักงานประสานงานมูลนิธิอานันทมหิดล ได้นำความกราบบังคมทูลสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี ทราบฝ่าละอองพระบาทแล้ว พระราชทานพระราชานุมัติ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และแจ้งผู้เกี่ยวข้องทราบด้วย จักขอบคุณมาก

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์วีรพันธุ์ โชวิฑูรกิจ)
กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการแผนกแพทยศาสตร์
มูลนิธิ "อานันทมหิดล"

แผนกแพทยศาสตร์ ฯ
นางวิจิตรา วัชรวราทร
โทร. 081 626 7516
โทรสาร 0-2 255-3064

30 ก.ย. 2559

คำสั่งมหาวิทยาลัยขอนแก่น
ที่ ๑๔๑๗ /๒๕๖๐
เรื่อง แต่งตั้งรองผู้อำนวยการศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตามคำสั่งมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ ๑๔๖๗/๒๕๕๘ ลงวันที่ ๒๐ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๕๘ แต่งตั้งให้ **รองศาสตราจารย์สมบูรณ์ แสงมณีเดช** ดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตั้งแต่วันที่ ๑ เมษายน ๒๕๕๘ ถึงวันที่ ๓๑ มีนาคม ๒๕๖๒ นั้น เพื่อให้การบริหารงานของศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นไปด้วยความเรียบร้อยและบังเกิดผลดีต่อทางราชการ

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๓๒ มาตรา ๓๗ (๑) (๕) และมาตรา ๘๕ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. ๒๕๕๘ ข้อ ๑๕ แห่งระเบียบมหาวิทยาลัยขอนแก่น ว่าด้วย ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. ๒๕๕๓ จึงแต่งตั้งให้ **ผู้ช่วยศาสตราจารย์กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์** สังกัดภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ เป็นรองผู้อำนวยการศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยดำรงตำแหน่งตามวาระของผู้อำนวยการที่แต่งตั้งในคราวเดียวกัน

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๒๑ เมษายน พ.ศ. ๒๕๖๐

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ลิขิต อมาตยคง)
รองอธิการบดีฝ่ายทรัพยากรบุคคล
ปฏิบัติการแทนอธิการบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น

NOBEL LAUREATE MEETINGS
LINDAU ™

This is to certify that

Charupong Saengboonmee

has qualified in a global competition among
young scientists worldwide to participate in the

63rd Lindau Nobel Laureate Meeting

(Chemistry)
Lindau, 30 June - 5 July, 2013

Council for the Lindau Nobel Laureate Meetings

President of the Council

Countess Bettina Bernadotte

Scientific Chairpersons

Astrid Gräslund

Wolfgang Lubitz

กองทุนครูตัวอย่าง
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ขอมอบโล่เกียรติคุณ แด่
ผู้ช่วยศาสตราจารย์กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์
ในฐานะที่ได้รับการยกย่องเชิดชูเป็น อาจารย์ที่เป็นแบบอย่างขั้นปรีคลินิก
ประจำปีการศึกษา ๒๕๕๙
ให้ไว้ ณ วันที่ ๓๑ สิงหาคม ๒๕๖๐
(รองศาสตราจารย์ชาญชัย พานทองวิริยะกุล)
คณบดีคณะแพทยศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ขอมอบโล่เกียรติยศเพื่อแสดงว่า
อาจารย์อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ และคณะฯ
ได้รับรางวัลที่ ๑ ผลงานวิจัยดีเด่น ปี ๒๕๖๐
ประเภท Biomedical research
(นักวิจัยอายุไม่เกิน ๔๐ ปี)
ผลงานวิจัยเรื่อง Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression
of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-KB.
ตีพิมพ์ใน Scientific Reports 2016; 6: number 27853.
ให้ไว้ ณ วันที่ ๒ สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

Cancer
Science
Young Scientists
Award 2014
Atit
Silsirivanit
JCA
WILEY

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ขอมอบไว้ประกาศเกียรติคุณนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า
ศาสตราจารย์ ดร.โสพิศ วงศ์คำ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
เรื่อง ผลของระดับกลูโคสในสภาวะมีภาวะต้านความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดี
หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์
ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ระดับดีเด่น
โครงการวิทยานิพนธ์ดีเด่น ประจำปี 2559
ให้ไว้ ณ วันที่ 10 มีนาคม 2560

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ขอมอบโล่เพื่อยกย่องเชิดชูเกียรติ
และประกาศเกียรติคุณ
แด่
ศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ
ขอแสดงความยินดีและชื่นชม
กับผลงานรางวัลที่ได้รับ
ระดับชาติและนานาชาติ
ขอให้มีความสุขและความเจริญก้าวหน้าในหน้าที่สืบไป
ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๐ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๙

รางวัลเชิดชูเกียรติ
นักวิจัยระดับเพชร มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประจำปีพุทธศักราช ๒๕๕๗
มอบให้
รองศาสตราจารย์ชัยศิริ วงศ์ศา
คณะแพทยศาสตร์
ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๐ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๘

(รองศาสตราจารย์ดิเรกศิษย์ ไตรรัตนสิริชัย)
อธิการบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น

IGO
International Glycoconjugate Organization

GLYCO XXIV Poster Award

We are pleased to present the Poster Award to

Chatchai Phoomak

for the poster entitled

Elevation of O-GlcNAcylation Enhances Progression of Cholangiocarcinoma Cells

that has been presented at the
24th International Symposium on Glycoconjugates

September 1, 2017

Jin Won Cho, Organizer

GLYCAN

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอมอบเกียรติบัตรนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นายจารุพงษ์ แสงบุญมี

ได้รับรางวัลที่ 2

การประกวดผลงานทางวิชาการ Oral Presentation

กลุ่ม บัณฑิตศึกษา

เรื่อง Diabetogenic Glucose Enhances Aggressive Activities of Cholangiocarcinoma Cell Lines

ในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 30 ประจำปี 2557 ระหว่างวันที่ 7-9 ตุลาคม 2557

ณ ห้องบรรยาย 1-4 อาคารเตรียมวิทยาศาสตร์คลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ให้ไว้ ณ วันที่ 9 ตุลาคม 2557

(รองศาสตราจารย์สุรพล วีระศิริ)

ประธานคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการ ครั้งที่ 30 ประจำปี 2557

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มอบเกียรติบัตรนี้ไว้เพื่อแสดงว่า

ดร. จารุพงษ์ แสงบุญมี

เป็นผู้ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ ดีเด่น ระดับปริญญาเอก

หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์

วิทยานิพนธ์ เรื่อง ผลของระดับกลูโคสในสภาวะเบาหวานต่อความรุนแรงของมะเร็งท่อน้ำดี

ในการคัดเลือกผลงานรางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่น/ดี ประจำปี ๒๕๕๙

ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๐ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอมอบเกียรติบัตรนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นางสาวสมสิริ อินทรมณี

ได้รับรางวัล

การประกวดผลงานทางวิชาการ Poster Presentation

เรื่อง Application of Plant Lectins in Cholangiocarcinoma

ในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 29 ประจำปี 2556 ระหว่างวันที่ 8-11 ตุลาคม 2556
ณ ห้องบรรยาย 1-4 อาคารเตรียมวิทยาศาสตร์คลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ให้ไว้ ณ วันที่ 11 ตุลาคม 2556

(รองศาสตราจารย์จินตนา สัตยาศัย)
ประธานคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการ ครั้งที่ 29 ประจำปี 2556

The 5th International Biochemistry and Molecular Biology

CERTIFICATE OF AWARD

This is to certify that

CHATCHAI PHOOMAK

has been recognized for **Outstanding Poster Presentation Award**

in

The 5th International Biochemistry and Molecular Biology Conference
at B. P. Samila Beach Hotel, Songkhla, Thailand

26-27 / May / 2016

Wilaiwan Chotigeat
Assoc. Prof. Dr. Wilaiwan Chotigeat
Conference Chairperson

Prof. Dr. Amornrat Phongdara
Chairperson of Scientific Programs

The 5th International Biochemistry and Molecular Biology

CERTIFICATE OF AWARD

This is to certify that

MARUTPONG DETARYA

has been recognized for **Outstanding Poster Presentation Award**

in

The 5th International Biochemistry and Molecular Biology Conference
at B. P. Samila Beach Hotel, Songkhla, Thailand

26-27 / May / 2016

Wilaiwan Chotigeat
Assoc. Prof. Dr. Wilaiwan Chotigeat
Conference Chairperson

Prof. Dr. Amornrat Phongdara
Chairperson of Scientific Programs

JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION

The 76th Annual Meeting
of the Japanese Cancer Association
Travel Grant Award

is hereby awarded to the excellent paper,

by Dr. Chatchai Phoomak

in recognition of the distinguished contribution to
The 76th Annual Meeting of
the Japanese Cancer Association
September 28th to 30th, 2017, Yokohama, Japan

Hitoshi Nakagama

Hitoshi Nakagama, M.D., D.M.Sc
President, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION

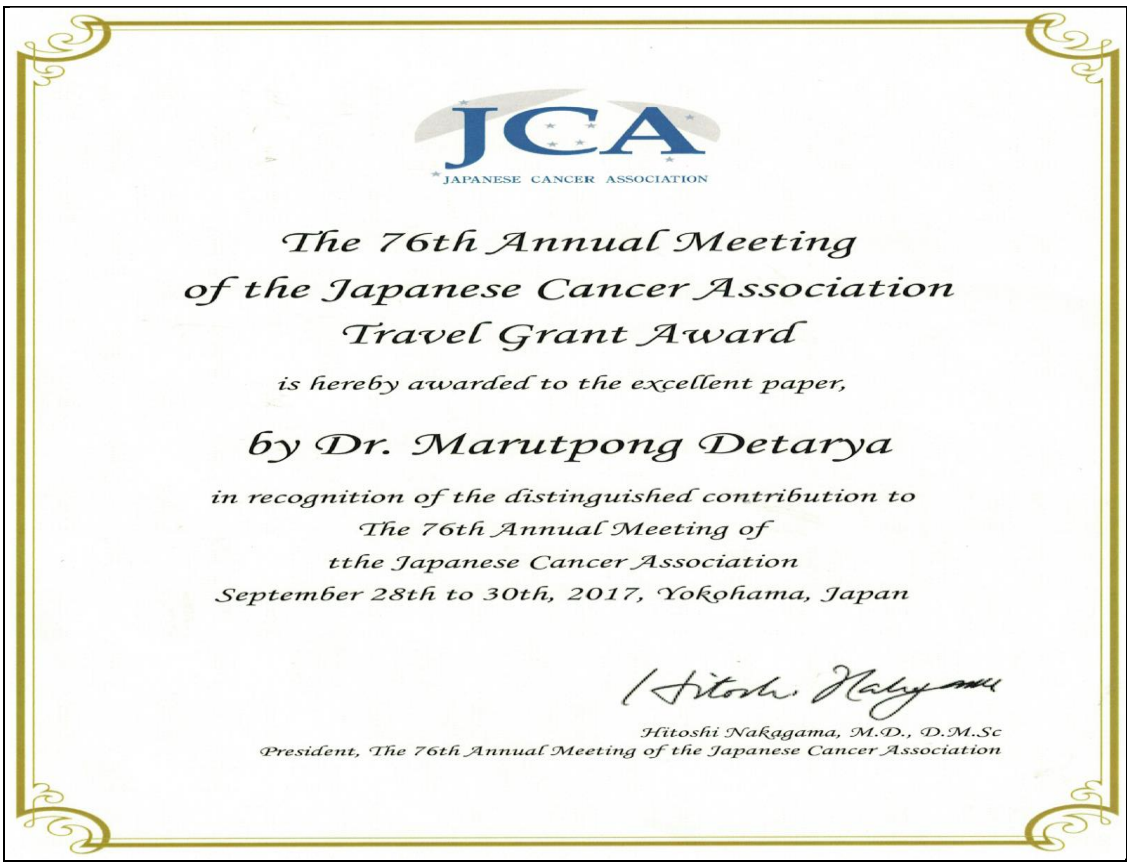
The 76th Annual Meeting
of the Japanese Cancer Association
Travel Grant Award

is hereby awarded to the excellent paper,

by Dr. Somsiri Indramanee

in recognition of the distinguished contribution to
The 76th Annual Meeting of
the Japanese Cancer Association
September 28th to 30th, 2017, Yokohama, Japan

Hitoshi Nakagama, M.D., D.M.Sc
President, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association



JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION

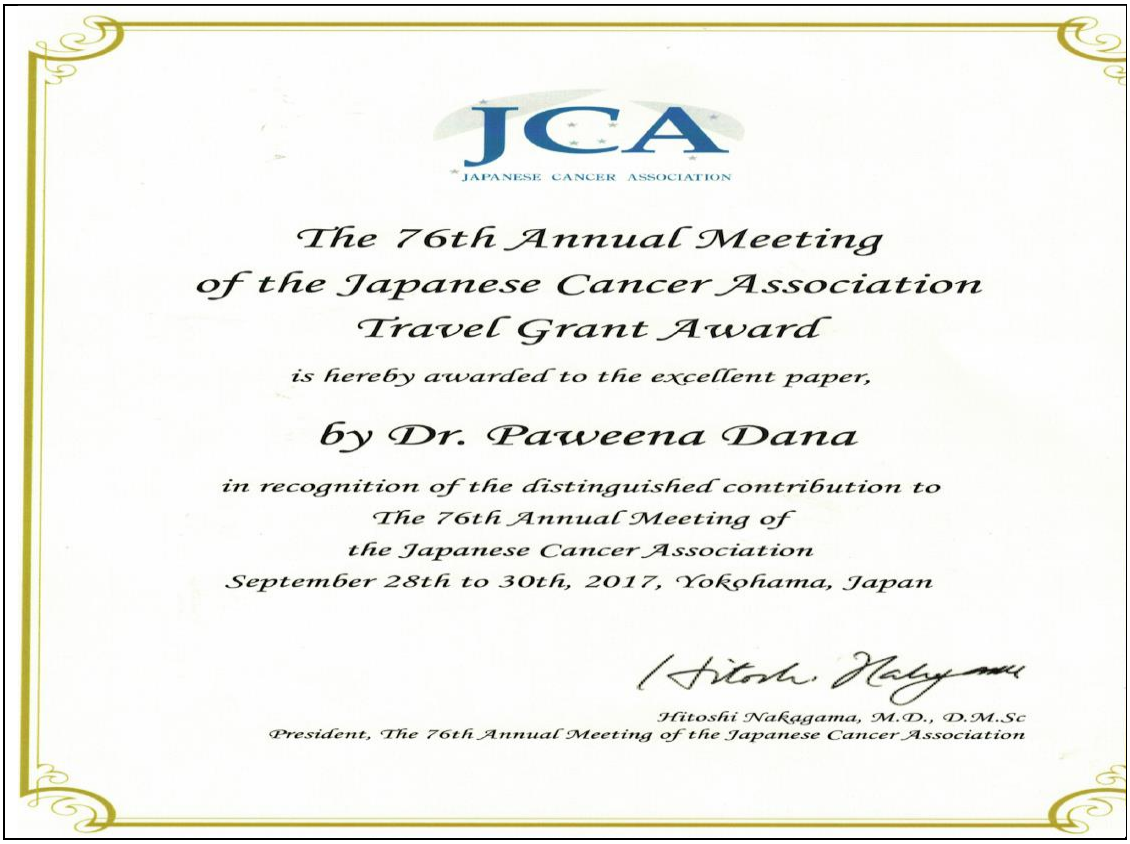
The 76th Annual Meeting
of the Japanese Cancer Association
Travel Grant Award

is hereby awarded to the excellent paper,

by Dr. Marutpong Detarya

in recognition of the distinguished contribution to
The 76th Annual Meeting of
tthe Japanese Cancer Association
September 28th to 30th, 2017, Yokohama, Japan

Hitoshi Nakagama, M.D., D.M.Sc
President, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association



JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION

The 76th Annual Meeting
of the Japanese Cancer Association
Travel Grant Award

is hereby awarded to the excellent paper,

by Dr. Paweena Dana

in recognition of the distinguished contribution to
The 76th Annual Meeting of
the Japanese Cancer Association
September 28th to 30th, 2017, Yokohama, Japan

Hitoshi Nakagama, M.D., D.M.Sc
President, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

JCA 第74回日本癌学会学術総会
The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
会期:2015年10月8日(木)～10日(土) 会場:名古屋国際会議場 会長:直江 知樹(独立行政法人 国立病院機構 名古屋医療センター 院
Date: October 8 (Thu.)-10 (Sat.), 2015 Venue: Nagoya Congress Center President: Tomoki Naoe (Director, Nagoya Medical Center)

The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

Certificate of Travel Grant

This is to certify that

Dr. Kulthida Vaeteewoottacharn

Received travel grant at
the 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
held in Nagoya, Japan From October 8 to 10, 2015,
and presented "High glucose enhances O-GlcNAcylation and metastatic
potentials in the high metastatic CCA cell lines."

Tomoki Naoe
President
The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ขอมอบเกียรติบัตรนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นายมารุตพงศ์ เดชอาญา

ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยระดับดีเด่น
แบบโปสเตอร์ ระดับปริญญาเอก

ในการประชุมวิชาการ 25 ปี "ชีวเคมีทางการแพทย์" สู่
"ชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาโมเลกุล" ในวันที่ 1 สิงหาคม 2560
ณ ห้องบรรยาย 4 อาคารเตรียมวิทยาศาสตร์คลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ให้ไว้ ณ วันที่ 1 สิงหาคม 2560

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุบล ชาอ่อน)
ประธานหลักสูตรบัณฑิตศึกษาภาควิชาชีวเคมี

(รองศาสตราจารย์รศนา วงศ์รัตนชีวิน)
หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี

เกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นางสาววรพร แสนทวีสุข

เป็นผู้นำเสนอผลงานวิจัยดีแบบโปสเตอร์

ในการประชุมวิชาการ Pre-congress Symposium 2013
"วาระคนอีสาน : กำจัดพยาธิใบไม้ตับ ลดมะเร็งท่อน้ำดี"
"Esan Agenda : Eradicate liver fluke to reduce cholangiocarcinoma"
ห้องบรรยาย 3 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วันที่ 7 ตุลาคม พุธศักราช 2556

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ ขันตีแก้ว
ประธานกรรมการจัดประชุมวิชาการ

The Thailand Research Fund (TRF)

In recognition and appreciation to

Mr. Chatchai Phoomak

for outstanding oral presentation in

RGJ - Ph.D. Congress 17

June 8 - 11, 2016

Professor Suthipun Jitpimolmard, MD FRCP
Director
The Thailand Research Fund

Professor Pramuan Tangboriboonrat, Ph.D.
Director
The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program

The Thailand Research Fund (TRF)

In recognition and appreciation to

Marutpong Detarya

for outstanding oral presentation in

RGJ - Ph.D. Congress 18

GLOBAL SUSTAINABILITY: LESSON LEARNED FROM THE ROYAL PROJECTS

June 8 - 10, 2017

Professor Suthipun Jitpimolmard, MD FRCP
Director
The Thailand Research Fund

Professor Pramuan Tangboriboonrat, Ph.D.
Director
The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Pyruvate Kinase M๒ ในมะเร็งท่อน้ำดี

โดย

อัญชลี ต้นศรี

เป็นผลงานที่ได้รับรางวัลการนำเสนอภาคโปสเตอร์ ดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ในการประชุมทางวิชาการ "มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ ๑๒"

วันที่ ๘ – ๙ เดือน กันยายน พุทธศักราช ๒๕๕๙ ณ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ ฤทธิเดช)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประธานคณะกรรมการการจัดการประชุมทางวิชาการ

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของตัวยับยั้ง glucose transporter ๑, phloretin, ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

โดย

อุบลรัตน์ ธำรงวรางกูร

เป็นผลงานที่ได้รับรางวัลการนำเสนอภาคบรรยาย ดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

ในการประชุมทางวิชาการ "มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ ๑๒"

วันที่ ๘ – ๙ เดือน กันยายน พุทธศักราช ๒๕๕๙ ณ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ ฤทธิเดช)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประธานคณะกรรมการการจัดการประชุมทางวิชาการ

เกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นางสาวอุบลรัตน์ ธำรงวรางกูร

เป็นผู้นำเสนอผลงานวิจัยดีเด่นแบบโปสเตอร์

Pre-congress Symposium 2014

การทำงานและวิจัยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ฐานข้อมูล CASCAP Tools

Clinical Research of Cholangiocarcinoma Based on CASCAP Tools

๖ ตุลาคม ๒๕๕๗

ณ ห้องบรรยาย ๓ และ ๔ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ณรงค์ ชันตีแก้ว

ประธานกรรมการจัดประชุมวิชาการ

ฝ่ายวิจัยและการถ่ายทอดเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประกาศเกียรติคุณฉบับนี้มอบให้

Phoomak C., Vaeteewoottacharn K., Silsirivanit A., Saengboonmee C., Seubwai W., Sawanyawisuth K., Wongkham C., Wongkham S.,

เพื่อเป็นเกียรติประวัติในการเป็นผู้นิพนธ์บทความ

เรื่อง High glucose levels boost the aggressiveness of highly metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation

ในวารสาร Scientific Reports Volume 7, 6 March 2017, Article number 43842

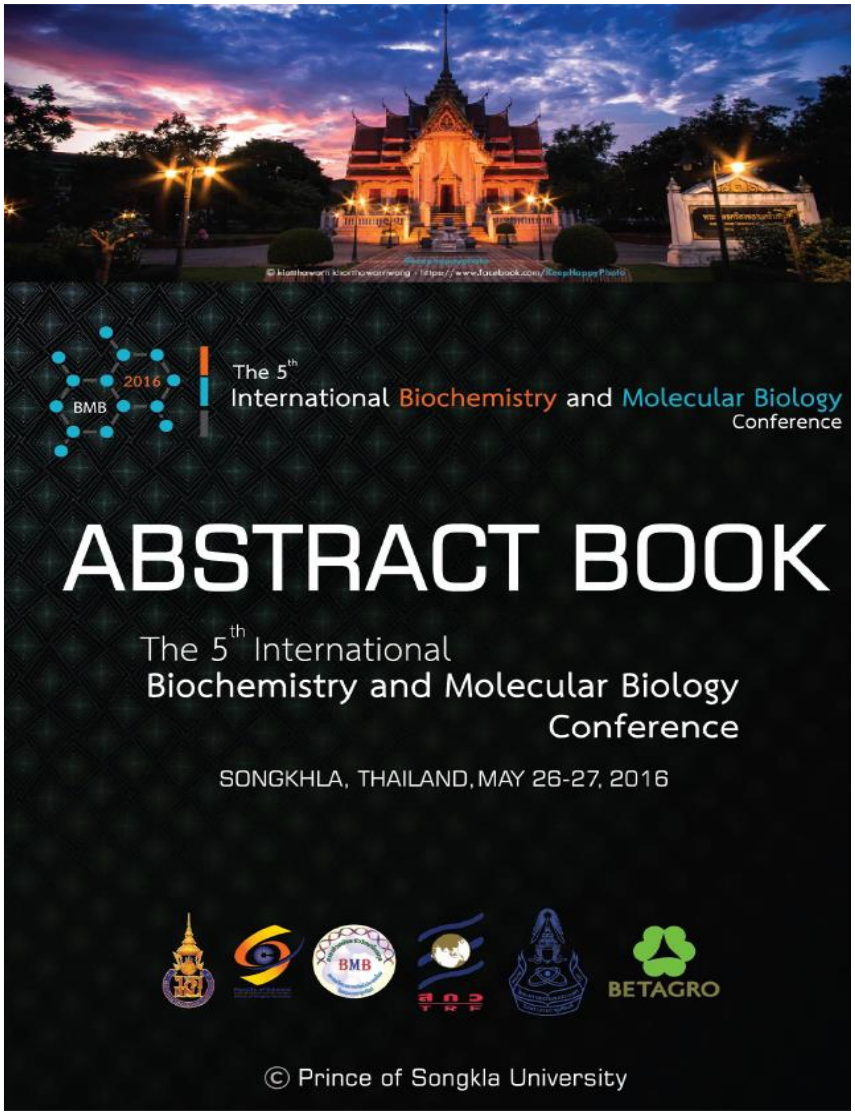
ซึ่งเป็นวารสารในฐาน ISI มีค่า Impact factor เป็น 5.228

ให้ไว้ ณ วันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2560

จึงมอบประกาศเกียรติคุณนี้ เพื่อเป็นเกียรติประวัติสืบไป

(รองศาสตราจารย์กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น



APC-100

High glucose boosts the metastatic ability of high metastasis cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation

Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacham*, Atit Silsirivanit, Chaisiri Wongkham and Sopit Wongkham*

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

**Corresponding author: kulthidava@kku.ac.th, sopit@kku.ac.th*

Abstract

Increased glucose uptake is a key feature of cancer cells and is utilized to produce energy and essential intermediates to support cell survival, proliferation, and metastasis. An association between diabetes millitus and cancer progression has been demonstrated in several cancers including cholangiocarcinoma (CCA), however, the underlying mechanism is not yet clear. Moreover, high glucose induced O-GlcNAcylation that promoted cancer progression has been previously reported. In this study, we aimed to connect the glucose level to the O-GlcNAcylation of proteins and the metastatic potentials in CCA cell lines. The O-GlcNAcylation was regulated by two enzymes; O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) for the addition and a removal of GlcNAc from the O-GlcNAcylated proteins (OGP). UDP-GlcNAc produced from a hexosamine biosynthesis pathway (HBP) also served as a sugar donor for O-GlcNAcylation. The parental and highly metastatic CCA subline were cultured in media with normal glucose (5.6 mM; euglycemic condition) or high glucose (25 mM; hyperglycemic condition). The high glucose condition promoted migration and invasion of both the CCA cells, but the effects were significantly higher in the high metastatic cells. These effects were concomittently observed with the increased global OGP, and the increased expressions of the glycolytic enzymes (hexokinase), HBP enzyme (glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransfrase; GFAT) and OGT. A treatment with a GFAT inhibitor - DON, reduced the global OGP level and alleviated CCA cell migration of the high metastatic cells. Altogether, these results indicated that the roles of high glucose in enhancing metastatic potentials of CCA was via modulation of the O-GlcNAcylation reactions.

Keywords: glucose, GFAT, O-GlcNAc, cancer metastasis.

This work was co-supported by the TRF Senior Research Scholar Grant and Khon Kaen University (RTA5780012), Research grants from KKU (580605), Faculty of Medicine, KKU (IN58139), and the RGJ- TRF Program (PHD/0016/2556) to CP and SW.

Inhibition of CD147 expression suppressed the metastatic activity of cholangiocarcinoma

Paweena Dana[a,c,d], Kulthida Vaeteewoottacharn[a,c], Ryusho Kariya[d], Sumalee Obchoei[a,c], Kanlayanee Sawunyawisuth[a,c], Wunchana Seubwai[a,b,c], Kouki Matsuda[d], Seiji Okada[d,*] and Sopit Wongkham[a,c,*]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen, 40002, Thailand*
[b] *Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen, 40002, Thailand*
[c]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen, 40002, Thailand*
[d]*Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan*

**Corresponding author: okadas@kumamoto-u.ac.jp; sopit@kku.ac.th*

Abstract

CD147 or extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), is a cell surface transmembrane glycoprotein which is highly expressed in several cancers and plays important roles in invasion, proliferation, and angiogenesis. High expression of CD147 in tumor tissues of cholangiocarcinoma (CCA) pateints had been observed. In this presentation, the expression and function of CD147 in CCA cell lines were further explored. We generated two stable CD147 silencing clones (C1 and C7) of the CCA cell line, KKU-213, using the RNAi technique (shRNA). The expression of CD147 in the shCD147 clones were significantly suppressed comparing to the shVector control cells (shV). An MTT assay and Boyden chamber assay were performed to determine cell growth and cell invasion, *in vitro*. Reduction of CD147 had no effect on cell proliferation, however, it significantly suppressed the invasive ability of the shCD147 cells as compared to shV cells. The underlining mechanism of this observation was shown to be due to the decreased expressions and activities of MMP-2 and MMP-9. The roles of CD147 in metastasis were further investigated in animal models. Silencing of CD147 expression suppressed tumor growth of KKU-213 in a subcutaneous transplantation mouse model. In addition, suppression of CD147 significantly reduced the metastasis of CCA cells as demonstrated in the tail vein injection model. The numbers of lung metastatic nodules of shCD147 cells was significantly lower than those of shV cells. Taken together, CD147 seems to play a significant role in promoting metastasis of CCA. Reducing CD147 expression or activity may be a strategy for treatment of metastatic CCA.

Keywords: CD147, metastasis, invasion, MMP2, MMP9

Berberine treatment inhibits phenotype progression in cholangiocarcinoma cells

Piyanard Boonnate, Sumalee Obchoei, Kulthida Vaeteewootthacharn and Sopit Wongkham*

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

**Corresponding author: sopit@kku.ac.th*

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is an epithelial cell malignancy of the bile duct. The occurrence of CCA is highest in the Northeast of Thailand. Delayed diagnosis and treatment of CCA result in the disease progression and high rate of CCA metastasis. Berberine (BBR) is a natural, nontoxic isoquinoline alkaloid compound derived from Berberis species. BBR has been wildly used as anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal drugs. Moreover, BBR has been reported as a potential in anti-cancer activities. In CCA, it has been demonstrated that BBR inhibits cell growth and apoptosis *in vitro*, but the effects of BBR treatment on the metastatic phenotypes of CCA are still unclear. Therefore, functions of BBR treatment on migration, invasion, and cell adhesion were of our interest. The effects of BBR on cell proliferation were tested and the dose of 3.125 μM was selected because it had little effect on cell proliferation. CCA cells treated with 3.125 μM of BBR were significantly decreased of cell migration, invasion, and adhesion when compared to the control. The molecular mechanisms underlying BBR altered the metastatic phenotypes of CCA are under investigation. This suggests that BBR might be a potential adjunct treatment for CCA.

Keywords: cholangiocarcinoma, berberine, cell phenotypes

APA-125

Expression of GalNAc-containing glycoconjugates and GalNAc-transferases in cholangiocarcinoma

Marutpong Detarya[a], Sriwipa Chuangchaiya[c], Kanlayanee Sawanyawisuth[a,b] and Chaisiri Wongkham[a,b,*]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand*
[b]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Thailand*
[c]*Department of Community health and Family health, Faculty of Public health, Kasetsart University Chalermphrakiat Sakonnakhon Province Campus*

**Corresponding author: Chaisiri@kku.ac.th*

Abstract

Mucin (GalNAc)-type O-glycosylation is a posttranslational modification found in intracellular, membrane-bound and secretory proteins. This process is initiated by polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransfereaes (GalNAc-Ts), a family of 20 enzymes, which catalyze the first step of O-glycoproteins synthesis to form GalNAcα1-O-serine/threonine linkage. Many reports demonstrate that the aberrant expression of GalNAc-Ts is associated with cancer progression including cell growth, apoptosis, migration and invasion. We performed the lectin histochemistry of GalNAc-specific lectin, namely *Vicia villosa* lectin (VVL) in 53 human cholangiocarcinoma (CCA) tissues. The result demonstrated that GalNAc-containing glycoconjugates are over-expressed in hyperplastic/dysplastic bile duct epithelia and CCA, but not in hepatocyte and normal bile duct. The expression of VVL-binding glycoconjugates was significantly associated with tumor size ($p = 0.034$). This indicated that abnormal GalNAcylation might occur in CCA and associated with CCA progression through the alteration of specific GalNAc-Ts expression. We further investigated the expression profile of GalNAc-Ts in CCA cell lines using real-time RT-PCR. Among them, GalNAc-T5 was highly expressed in KKU-213 and KKU-214 but weakly expressed in the immortalized cholangiocyte cell line (MMNK1). Suppression of GalNAc-T5 expression using siRNA knockdown reduced GalNAcylated proteins level which detected by VVL lectin blot. The functional roles of GalNAc-T5 in the progression of CCA are under investigation.

This work was finacially supported by Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0169/2554) with the partial support from Khon Kaen University, Invitation research grant (IN59109) from the Faculty of Medicine, Khon Kaen University and TRF-Senior TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund (RTA5780012).

Keywords: GalNAc-containing glycoconjugate, GalNAc-T, VVL, cholangiocarcinoma

APA-117

Overexpression of pyruvate kinase M2 and lactate dehydrogenase A: a potential theraputic target of cholangiocarcinoma

Unchalee Thonsri[a,d], Wunchana Seubwai[b,d], Sakda Waraasawapati[c], Kanlayanee Sawanyawisuth[a,d], Kulthida Vaeteewoottacharn[a,d], Sopit Wongkham[a,d], Chaisiri Wongkham[a,d] and Ubon Cha'on[a,d]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand*
[b]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand*
[c]*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand*
[d]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand*

Abstract

Metabolic alteration is one of the hallmarks of cancer cells which obviously consume glucose at the higher rate than normal cells known as Warburg effect. Glucose uptake in cancer cells is mainly for aerobic glycolysis which generate energy including intermediates for biosynthesis of macromolecules. Pyruvate kinase M2 (PKM2), one of the regulatory enzymes in glycolysis, and lactate dehydrogenase A (LDHA) have been studied since their overexpressions were found in several cancers. However, the role of PKM2 and LDHA expression in *Opisthorchis viverrini* (Ov) associated cholangiocarcinoma (CCA) are still limitted. In the present study, we investigated PKM2 and LDHA expression in hamster- (n=60) and human- (n=80) CCA tissues using immunohistochemistry technique. The effects of shikonin, a PKM2 inhibitor, on the proliferation of CCA cell lines was also investigated for exploring the functional roles of PKM2, using an MTT assay. We further investigated the mechanism by which cell proliferate after shikonin treatment using human phospho-kinase array and western blot analysis. The results showed that PKM2 and LDHA expression were gradually increased during the carcinogenesis of CCA in hamster-CCA model. In addition, overexpression of PKM2 and LDHA were found in human-CCA tissues. Suppression of CCA-cell growth by shikonin treatment showed a reduction of cell growth in a dose-and time dependent manner. The IC50 of a 24 -, 48 - and 72 h for these CCA cell lines are less than 1 μM and the mechanism by which PKM2 plays a role in tumor progression is under investigated.

Keywords: cholangiocarcinoma, pyruvate kinase M2, lactate dehydrogenase A, cancer metabolism

APA-119

Inhibition of glucose transporter 1 (GLUT1) suppresses growth, metastasis and induces apoptosis of cholangiocarcinoma cell lines

Ubonrat Thamrongwaranggoon[a,c*], Wunchana Seubwai[b,c], Ubon Cha'on[a,c], Chaisiri Wongkham[a,c] and Sopit Wongkham[a,c]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand*
[b]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand.*
[c]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand.*

**Corresponding author: tham_ubonrat@kkumail.com*

Abstract

Glucose transporter 1 (GLUT1), a transmembrane protein, is overexpressed in various types of cancers and correlated with poor prognosis of cancer patients. Overexpression of GLUT1 in cancer cells promotes cell proliferation and metastasis. However, the expression and functional significance of GLUT1 in *Opisthorchis viverrini* (*OV*) associated cholangiocarcinoma (CCA) are still unclear. This study is aimed to investigate the expression and functional roles of GLUT1 in CCA. The immunohistochemistry of patient CCA tissues revealed that GLUT1 was rarely expressed in normal bile duct epithelium, whereas GLUT1 was positive in 84% of CCA tissues and significantly correlated with shorter survival of the patients ($P < 0.05$). The association of GLUT1 and carcinogenesis was shown in the *OV* infected-CCA hamster model. GLUT1 was not detected in normal bile duct epithelia but was positive in *OV*-induced CCA hamster tissues at 3 and 6 months. Inhibition of GLUT1 by its specific inhibitor, WZB117, was significantly reduced cell growth of CCA cell lines as dose- and time-dependent fashions. WZB117 also inhibited cell migration and induced cell apoptosis. The western blot analysis of apoptosis-related molecules confirmed the apoptosis effect of WZB117.

Keywords: GLUT1, cholangiocarcinoma, WZB117, growth, apoptosis, metastasis

Acknowledgement: UT is supported by scholar from LiverCare center. The project is under supports of the Invitation research grant, Faculty of Medicine, KKU and TRF-KKU-Senior Research Scholar to SW (RTA5780012).

AOC-105

Inhibition of CD47; "don't eat me", signaling attenuates cholangiocarcinoma growth and metastasis

Kulthida Vaeteewoottacharn[a,*], Ryusho Kariya[b], Sawako Fujikawa[b], Sopit Wongkham[a] and Seiji Okada[b]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand*
[b]*Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Japan*

**Corresponding author: kulthidava@kku.ac.th*

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive cancer subtype of liver. A chronic inflammatory process was recognized as one hallmark of CCA. An increase of tumor infiltrating macrophages was associated with worsening disease outcomes and the induction of proinflammatory cytokines production has been documented. The expression of the CD47 receptor is common among various tumors and serves as a protective or "don't eat me" signal for phagocytes. Blocking the CD47 signaling would be a novel strategy for cancer treatment; however, little is known with regard to CD47 in CCA. Therefore, this work has focused on the functions of CD47 in CCA. CD47 was highly expressed in all CCA cell lines tested. The inhibition of CD47 signaling by neutralizing antibody potentiated the phagocytosis of CCA cells. The effects of the anti-CD47 antibody enhanced CCA phagocytosis were observed in all macrophages subtypes (resting, M1, M2 and tumor-associated macrophages) *in vitro*. The therapeutic potential of CD47 inhibition was demonstrated in a liver metastatic model. KKU-M213 cells were trans-splenic injected to the NOD Rag-2/Jak3 double-deficient mice, and anti-CD47 antibody was delivered intravenously. A significantly lower number of CCA cells was detected in both spleens and livers of the anti-CD47 treated mice. A consistent, increase of peri- and intra-tumoral macrophage infiltrations was detected . Taken together, the CD47 was commonly expressed in CCA cells and protected cells from phagocytic removal by an innate immune system. Blocking of the increased CD47 /CCA phagocytosis *in vitro* and anti-CD47 therapy alleviated the tumor growth and inhibited liver metastasis *in vivo*. CD47 is therefore a promising target for CCA treatment.

Keywords: cholangiocarcinoma, CD47, macrophage, phagocytosis, targeted therapy

7th ACGG Conference

The 7th Asian Community of
Glycoscience and Glycotechnology Conference
November 12-15, 2015
Hotel Taikanso
Matsushima, Miyagi, Japan

S8-2

Alteration of glycosylation related to progression of cholangiocarcinoma

Sopit Wongkham[1], Chatchai Phoomak[1,2], Somsiri Indramanee[1], Kulthida Vaeteewoottacharn[1], Kanlayanee Sawanyawisuth1[1], Atit Silsirivanit[1], Carlito B. Lebrilla[2], Chaisiri Wongkham[1]

[1]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

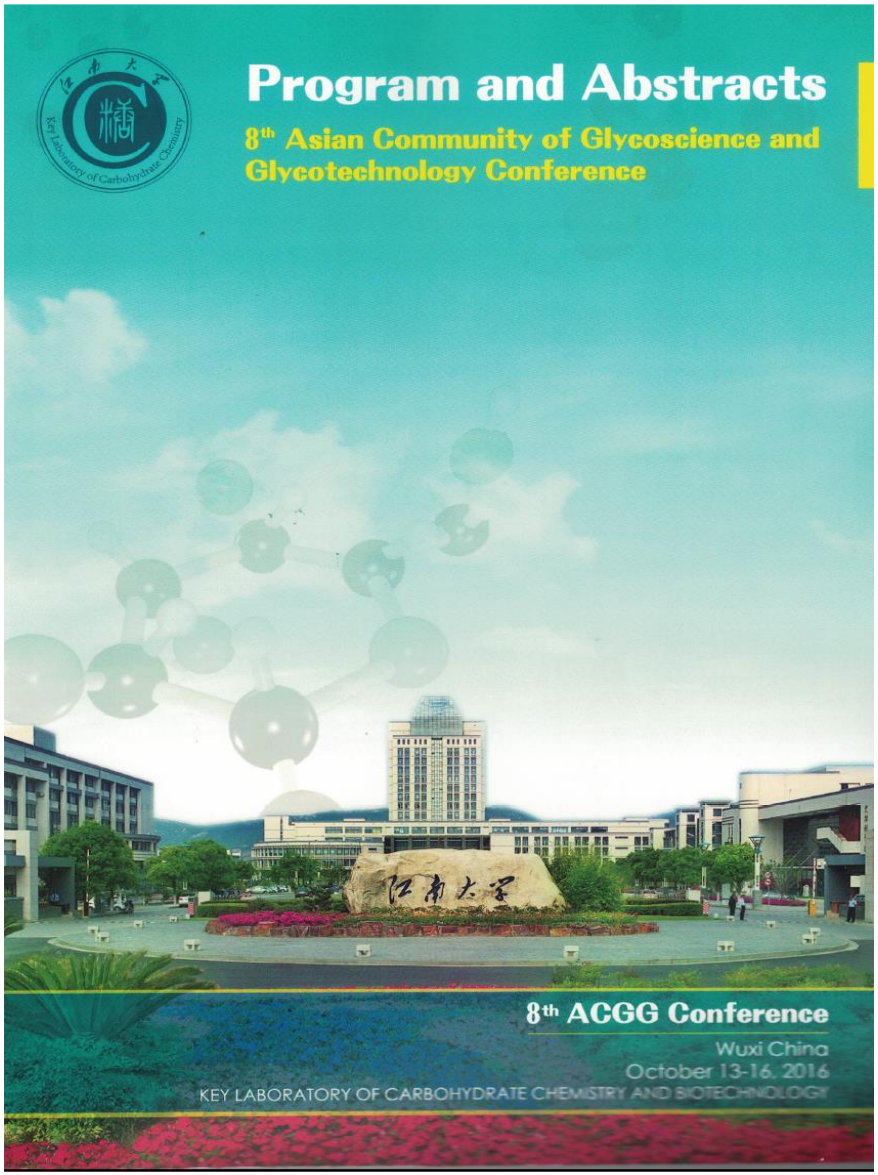
[2]*Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California Davis, California, USA.*

Email addresses: sopit@kku.ac.th

Glycosylation is a post-translational process which has been reported to be altered and associated with development and progression of many cancers. In this presentation, we report the involvement of two glycosylation processes—fucosylation and O-GlcNAcylation on the progression of cholangiocarcinoma (CCA). Using *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I), a lectin recognized the Fucα1→2Gal-containg glycans indicated the aberrant fucosylation in CCA patient tissues. Approximately 30% of CCA tissues highly expressed fucosylated glycans whereas normal bile duct epithelia showed negative UEA-I signal. Patients who harbored high fucosylated glycan in tumor tissues exhibited shorter survival. In addition, suppression of fucosyltransferase 1 (FUT1) significantly reduced motility and invasion activity of CCA cell lines. The similar results were also observed for O-GlcNAcylation, a modification of a single N-acetylglucosamine (GlcNAc) on serine and threonine residues of proteins. The increase of O-GlcNAcylation in CCA patient tissues was indicated and related to poor patient outcomes. Suppression of O-GlcNAcylation significantly reduced the migration and invasion ability of CCA cell lines. Two matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP7) and the two O-GlcNAcylated regulators (NF-κB and AKT) were identified to be associated with the observed phenotypes. Further study is undertaken to elucidate the O-GlcNAcylated proteins related to the progression of CCA.

Acknowledgement: This study was supported by the TRF Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund and Khon Kaen University (RTA5780012), the Royal Golden Jubilee PhD Program, TRF, Thailand (PHD/0016/2556) to C. Phoomak and S. Wongkham, and the assistantship from LFCRC, Khon Kaen University, to S. Indramanee.

Keywords: Bile duct cancer, UEA-I, FUT1, Fucosylation, O-GlcNAcylation



S3-2

High Glucose Enhances Aggressiveness of Cholangiocarcinoma Cells

Chatchai Phoomak, Kulthida Vaeteewoottacharn, Atit Silsirivanit, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

E-mail: chatchai_phoo@hotmail.com

Cancer cells rely mostly on the aerobic glycolysis. Increasing of glucose uptake is not only for energy production but for generating essential intermediates to support cell growth and metastasis of cancer. The association between diabetes mellitus and cancer progression has been demonstrated in several cancers including cholangiocarcinoma (CCA), however, the underlying mechanism is not yet clear. High glucose also enhanced O-GlcNAcylation and induced cancer progression. The O-GlcNAcylation is a reversible process which is regulated by two enzymes; O-GlcNAc transferase (OGT) for addition of GlcNAc and O-GlcNAcase (OGA) for removing GlcNAc from the O-GlcNAcylated proteins (OGP). UDP-GlcNAc produced from a hexosamine biosynthesis pathway (HBP) serves as a sugar donor for O-GlcNAcylation. This study was aimed to demonstrate the linkage of high glucose on metastatic potentials of CCA via O-GlcNAcylation. Two parental CCA cell lines and their high metastatic (L5) sublines were cultured in media with normal glucose (5.6 mM; euglycemic condition) or high glucose (25 mM; hyperglycemic condition). The results revealed that high glucose could increase the migration and invasion as well as O-GlcNAcylation in CCA cells, with a greater extent in L5 cells. Vimentin, a mesenchymal marker was strikingly increased in L5 cells cultured in the high glucose media. This observation was further shown to be due to the enhanced stability of vimentin under O-GlcNAcylation. The mechanism underlying high glucose induced O-GlcNAcylation was shown to be the increases of OGT and Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) in L5 cells. Inhibition of GFAT activity by DON, a GFAT inhibitor, significantly reduced O-GlcNAcylation, migration, and vimentin expression in the L5 cells cultured in the high glucose. Altogether, these results suggested the roles of high glucose in enhancing metastatic potentials of CCA via modulation of O-GlcNAcylation.

Key words:
glucose, HBP, GFAT, O-GlcNAc, cancer metastasis.

Acknowledgements:
This work was co-supported by the TRF Senior Research Scholar Grant and Khon Kaen University (RTA5780012), National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University (NRU582010), and the RGJ-TRF Program (PHD/0016/2556) to CP and SW.

Expression of N-acetyl Galactosamine-associated Glycans Indicates Pathological Changes of Biliary Epithelia and Cholangiocarcinoma.

Atit Silsirivanit[1,2], Marutpong Detarya[1,2], Waraporn Saentaweesuk[1,2], Kanlayanee Sawanyawisuth[1,2], Sriwipa Chuangchaiya[3], Lukkana Sukprasert[1,2], Sopit Wongkam[1,2], Chaisiri Wongkham[1,2]

[1]Department of Biochemistry; [2]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[3]Faculty of Public Health, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon, 47000

Altered glycosylation have been demonstrated in many types of cancer, aberrant expressed glycans are potentially used as biomarkers for diagnosis or prognostic prediction of the diseases. Here, we have analyzed glycan expressions in cholangiocarcinoma (CCA) tissues using lectinhistochemistry of 22 plant lectins with different sugar preferential. Positive staining of cancer cells and negative of normal biliary cells were found in the staining with lectins specific to fucose (UEA-I), N-acetyl galactosamine (GalNAc: SBA, SJA, VVL, and WFA), and N-acetylglucosamine (GlcNAc: sWGA). This data suggested the enhancement of glycosylation with fucose, GalNAc, and GlcNAc in malignant biliary cells. Interestingly, specificity of GalNAc-associated glycans (GNG) with pathological changes of bile ducts was demonstrated by the positive staining of hyperplastic/dysplastic bile ducts and CCA with SBA, SJA, and VVL, while it was not detected in normal bile ducts and other cell types in the tissues. The power in CCA detection of GNG was demonstrated by the positive staining of SBA and VVL in 95 % (42/45) of CCA tissues while SJA was 78%. Similar to those observed in human tissues, the experiments in hamster model revealed that glycans detected by these lectins were specifically detected in abnormal bile ducts as early as the pathological changes have been observed. In contrast with CCA, hepatoma tissues (N=11) exhibited negative staining with these 3 lectins, this information emphasizes the specificity of GNG to abnormal bile ducts. Our collective results enlightened the importance of GalNAcylation during development of CCA, therefore the functional analysis of GNG and GalNAcylation-related enzymes (GalNActransferases) is needed for the more understanding in CCA biology. Moreover, possibility for detection of GNG in serum is a challenged task to be further elucidated.

Key words:
GalNAc, glycans, lectins, lectinhistochemistry

Acknowledgement:
This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University

Membranous High Mannose N-glycans Associate with Metastasis of Cholangiocarcinoma Cells

Sopit Wongkham[1], Chatchai Phoomak[1], Dayoung Park[2], Atit Silsirivanit[1], Kanlayanee Sawanyawisuth[1], Kulthida Vaeteewoottacharn1[1], Chaisiri Wongkham[1], Carlito B. Lebrilla[2]

[1]Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[2]Department of Chemistry, University of California, Davis, CA, 95616, US

E-mail: sopit@kku.ac.th

Glycosylation is one of the most prevalent post-translational modifications which produce various types of glycans that are frequently attached to membranous and secreted proteins. The glycans are involved in numerous biological processes including inflammation, cell–cell interactions, and morphogenesis. Altered glycosylation is a universal feature of malignancy, and some of these alterations contribute to metastatic processes. This study is aimed to explore the effect of O-GlcNAcylation on membranous N-glycan that are associated with cholangiocarcinoma (CCA) metastasis. Global O-GlcNAcylation in CCA cells was suppressed using specific siRNA against O-GlcNAc transferase (OGT), the enzyme that transfers GlcNAc to protein. The expression of membranous N-glycans were determined using HPLC-Chip/Time-of-Flight (Chip/TOF) MS system. The N-glycans associated with O-GlcNAcylation were obtained by comparing the N-glycans obtained from siOGT with those from the scramble siRNA treated cells. In addition, the connection of membranous N-glycans with CCA metastasis was revealed by comparing the membranous N-glycans of the parental cells (KKU-213 and KKU-214) to those of the highly metastatic calls (KKU-213L5 and KKU-214L5). Suppression of O-GlcNAcylation altered the expression of two specific membranous N-glycans, e.g., high-mannose (Hex9HexNAc2) and biantennary complex (Hex5HexNAc4FucNeuAc) types, which were presented dominantly in the highly metastatic CCA cells. The correlation of high-mannose type N-glycans with CCA metastasis was demonstrated in kifunensine (mannosidase-1 inhibitor) and Concanavalin A (Con A, mannose specific lectin) treated cells. Kifunensine treatment increased the high-mannose type N-glycans and significantly enhanced the migration and invasion of the parental CCA cells. In contrast, the migration and invasion were suppressed when the high mannose type N-glycans were blocked with Con A. This study demonstrates for the first time of the associations between the high mannose type N-glycans, O-GlcNAcylation and progression of CCA cells.

Key words:
N-glycans, O-GlcNAcylation, High mannose, cancer metastasis

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University and the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund, Thailand (PHD/0016/2556) to C. Phoomak and S. Wongkham.

S9-2

Upregulation of Lactate Dehydrogenase A is Correlated with Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma

Ubon Cha'on[1,3], Unchalee Thonsri[1,3], Wunchana Seubwai[2,3], Sopit Wongkham[1,3]

1Departments of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 2Departments of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, 3Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

ubocha@kku.ac.th

Lactate dehydrogenase A (LDHA), is a key metabolic enzyme in the final step of anaerobic glycolysis. Overexpression of LDHA has been reported in several human cancers in association with tumor progression. The purpose of this study was to investigate LDHA expression pattern during carcinogenesis in hamster model, and its prognostic value in CCA patients. LDHA expression was investigated using immunohistochemistry technique in both hamster- (n = 60) and human-CCA tissues (n = 82). Plasma LDH from healthy control (n = 40) and CCA patients (n = 29) were determined using an enzymatic based assay. The association of LDHA expression with clinico-pathological findings and prognostic value were evaluated using statistical analysis. In the CCA hamster model, an increase of LDHA expression was associated with the progression of CCA-genesis. Higher LDHA overexpression was associated with shorter survival of CCA patients. Multivariate analysis indicated that LDHA expression including histological type were independent prognostic risk factor of patient's survival. However, there was no difference in plasma LDH level between CCA patients and healthy controls. LDHA expression is involved in cholangiocarcinogenesis. Overexpression of LDHA can be a marker of poor prognosis in CCA patients and it might be a potential target for CCA treatment.

Key words:
lactate dehydrogenase A, cholangiocarcinoma, carcinogenesis, cancer metabolism, poor prognosis

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Pyruvate Kinase M2 ในมะเร็งท่อน้ำดี

Upregulation of Pyruvate Kinase M2 in Cholangiocarcinoma

อัญชลี ต้นศรี[1,4], วันชนะ สืบไวย[2,4], ศักดา วราอัศวปติ[3], อุบล ชาอ่อน[1,4]
Unchalee Thonsri[1,4], Wunchana Seubwai[2,4], Sakda Waraasawapati[3], Ubon Cha'on[1,4*]

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเยื่อบุของท่อทางเดินน้ำดี และถือเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ จากคุณสมบัติของ เซลล์มะเร็ง ที่มีเมแทบอลิซึมแตกต่างจากเซลล์ปกติ เมแทบอลิซึมของกลูโคสจัดเป็นวิถีที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางและเป็นที่ทราบแน่ชัด โดยพบว่าเซลล์มะเร็งมีกระบวนการสร้างพลังงานที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ เพื่อการมีชีวิตรอด รวมถึงกระบวนการพัฒนาและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง (progression and metastasis) การทำความเข้าใจกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์มะเร็งจึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพ แต่ เนื่องจากการศึกษาบทบาทของเอนไซม์สำคัญในวิถีไกโคไลซิสในมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับยังไม่เป็นที่แพร่หลาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษารูปแบบการแสดงออกของ PKM2 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (n = 30) ด้วยวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา และวัดระดับ PKM2 ในซีรัมด้วย ELISA kit ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ PKM2 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี และพบว่าระดับของ PKM2 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (n = 26) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (n = 18) แต่ยังไม่ถึงนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้นเกี่ยวกับบทบาทของ PKM2 ในการวินิจฉัยและการรักษามะเร็งท่อน้ำดี จึงจำเป็นต้องศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น

คำสำคัญ: cholangiocarcinoma, pyruvate kinase M2, cancer metabolism, glycolysis

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA), a cancer of the bile duct that arising from biliary epithelium, is a major public health problem of Thailand, especially in the Northeastern Thailand.[9] Based on the hallmarks of cancer, glucose metabolism is the well establishment of metabolic differences between normal and cancer cells. Alteration of energy metabolism in cancer cells is necessary to cell survive, progression and metastasis. Understanding of this hallmark may help to identify a potential target for cancer therapies. Since the roles of key glycolytic enzymes in CCA are limited, we aimed to investigate pyruvate kinase M2 (PKM2) expression in Ov-associated CCA tissues using immunohistochemistry and determine serum PKM2 levels in CCA patients using ELISA kit. Results indicated that PKM2 expression was associated with CCA carcinogenesis in human CCA tissues (n = 30). Although the changes did not reach statistical significant, serum PKM2 levels in CCA patients (n = 26) was apparently higher compared to healthy controls (n = 18). Greater number needed to be further evaluated to support the significant role of PKM2 in CCA diagnosis and treatment.

Keywords: cholangiocarcinoma, pyruvate kinase M2, cancer metabolism, glycolysis

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของตัวยับยั้ง glucose transporter 1, phloretin, ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Anti-cancer activity of glucose transporter 1 inhibitor, phloretin, in cholangiocarcinoma cells

อุบลรัตน์ ธำรงวรางกูร,[1] วันชนะ สืบไวย,[2] อุบล ชาอ่อน,[3] โสพิศ วงศ์คำ[4]
Ubonrat Thamrongwaranggoon,[1] WunchanaSeubwai,[2] Ubon Cha'on,[3] Sopit Wongkham[4]

บทคัดย่อ

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ glucose transporter 1 (GLUT1) ถูกรายงานในมะเร็งหลายชนิด โดย GLUT1 มีบทบาทสำคัญในการกระบวนการเพิ่มจำนวน, การแพร่ลุกลามและการตายของเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างเช่น มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ และมะเร็งเต้านม เป็นต้นอย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่บ่งชี้ถึงการแสดงออกและบทบาทของ GLUT1 ในมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การศึกษานี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของ GLUT1 และฤทธิ์ต้านมะเร็งของตัวยับยั้ง GLUT1 ที่มีชื่อว่า phloretinในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การวิเคราะห์การแสดงออกของ GLUT โดย serial analysis of gene expression พบว่ามีการแสดงออกของ GLUT1 เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อตับปกติและยังพบว่า GLUT1 มีการแสดงออกสูงในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213L5 และ KKU-214L5 ทั้งในระดับ mRNA และระดับโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าphloretinสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ GLUT1 ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และความเป็นไปได้ในการใช้ GLUT1 เป็นเป้าหมายสำหรับการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

คำสำคัญ: glucose transporter 1, มะเร็งท่อน้ำดี, phloretin

Abstract

Overexpression of glucose transporter 1 (GLUT1) has been reportedin various cancers. GLUT1 plays significant roles in many cellular processes including proliferation, metastasis, and apoptosis of several cancers such as cancer of liver, colon and breast. However, the expression and roles of GLUT1 in Opisthorchisviverrini (Ov)-associated cholangiocarcinoma (CCA) is still unknown. The purpose of this study was to investigate GLUT1expression and anti-cancer activity of glucose transporter 1 inhibitor, namelyphloretin, in Ov-associated CCA. The expression of GLUTs from serial analysis of gene expression demonstrated that GLUT1 was overexpressed in CCA tissues. Similar results were also observed in CCA cell lines using real time-PCR and western blotting techniques. In addition, the inhibition of GLUT1 activity by phloretin significantly inhibited growth of CCA cell lines in adose-dependent fashion. These results suggest the possibility of GLUT1 as a therapeutic target for CCA patients.

Keywords: glucose transporter 1, cholangiocarcinoma, phloretin

Roles of O-GlcNAcylation on the progression of cholangiocarcinoma

Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit, Kulthida Vaeteewoottacharn, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham*

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand; E-mail: sopit@kku.ac.th, Tel/Fax: 66-43-348-386

O-GlcNAcylation is a single sugar (N-acetylglucosamine, GlcNAc) modification on serine and threonine residues of many proteins. It is regulated by two enzymes; O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) which transfers GlcNAc to a hydroxyl group of a serine or threonine; and β-N-acetylglucosaminidase (OGA) which catalyzes the reverse reaction. O-GlcNAcylated proteins (OGP) appear to be important in many cellular processes; such as transcription regulation, signal transduction, and interfering of proteolysis by proteasome. Thus, the aberration of O-GlcNAcylation can alter the functions of proteins contributing in many human diseases including cancer. Increasing of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinoma (CCA) in association with poor patient outcomes was reported. The elevation of O-GlcNAcylation in CCA was related with increased of OGT and decreased of OGA expressions. Here, we further explored the roles of O-GlcNAcylation on cell proliferation, stress induce apoptosis, migration, and invasion in two CCA cell lines, KKU-M213 and KKU-M214, *in vitro*. No effects of O-GlcNAcylation on cell proliferation, stress induce apoptosis were observed when treated cells with siOGT or siOGA. However, suppression of OGT expression significantly decreased migration and invasion abilities comparing with the scramble siRNA treated cells. In contrast, suppression of OGA expression enhanced cell migration and invasion. A set of genes related to migration and invasion activities were determined using PCR-array. Two matrix metalloproteinase (MMP2 and MMP7) expressions were identified to be associated with O-GlcNAcylation level. These data indicates the roles of O-GlcNAcylation on metastatic activities of CCA. Further study is undertaken to elucidate the molecular mechanism underlining the involvement of O-GlcNAcylation in metastasis of CCA.

Keywords: O-GlcNAcylation, metastasis, cholangiocarcinoma

Acknowledgements: We would like to thank the supports from the research grant from KKU and the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund, Thailand (PHD/0016/2556) to CP and SW.

Repurposing anti-parasitic drugs as anti-metastatic agents for treatment of cholangiocarcinoma

Diwakar Guragain[a,b], Wunchana Seubwai[b,c*], Sumalee Obchoei[a,b], Sopit Wongkham[a,b], Patchareewan Pannangpetch[b,d], Vitoon Prasongwattana[a], Yukifumi Nawa[e], Ubon Cha'on[a,b*]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand;* [b]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand;* [c]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand;* [d]*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand;* [e]*Research Affairs Division, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[*]*Corresponding author: E-mail address: ubocha@kku.ac.th; wunchanas@yahoo.com Tel/Fax: 66-43-348-386*

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive and highly metastatic cancer with poor response to conventional chemotherapy. Novel drugs and treatment strategies directed against CCA are urgently needed and are being looked for. Chloroquine (CQ), albendazole (ABZ) and mebendazole (MBZ), commonly used as anti-parasitic drugs, are known to have anti-cancer activity. However, anti-metastasis activity of these drugs has not yet been investigated. In this study, the anti-metastatic effects of these drugs on CCA cells and their molecular mechanism of action were investigated. Sub-lethal dose treatment of CQ, ABZ and MBZ significantly inhibited cell migration, invasion and adhesion of highly metastatic CCA cells KKU-M213L5 & KKU-M214L5. Gelatin zymography study showed MMP 2 & 9 secretion was inhibited in treated cells when compared with control. Supression on MMP 2 and 9 secretions by CQ, suggests that the inhibitory effect of CQ on metastatic activity of CCA cells is, at least in part, is expressed via inhibition of MMPs. Furthermore, ABZ and MBZ treatment down-regulated the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), transforming growth factor beta 1(TGFβ1) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA). The results demonstrated that metastatic inhibition activity of ABZ and MBZ on CCA cells may be expressed via suppression of EGFR, TGFβ1 and VEGFA. Therefore, CQ, ABZ and MBZ might be used as potential anti-metastatic agents for treatment of CCA.

Keywords: chloroquine, mebendazole, albendazole, metastasis, EGFR, TGFβ1, VEGFA, MMPs

Acknowledgements: We would like to thank Faculty of Medicine, Khon Kaen University for giving the Post Graduate Scholarship for Intenational Students (PSIS) to Diwakar Guragain. We would also like to thank Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center (LFCRC).

Suppression of CD147 Expression Reduced Metastatic Activity of Cholangiocarcinoma, *in vitro* and *in vivo*

Paweena Dana[1, 3, 4], Kulthida Vaeteewoottacharn[1, 3], Sumalee Obchoei[1, 3], Kanlayanee Sawunyawisuth [1, 3], Wunchana Seubwai[2, 3], Ryusho Kariya [4], Kouki Matsuda[4], Seiji Okada[4]*, Sopit Wongkham[1, 3]*

[1]*Department of Biochemistry;* [2]*Department of Forensic Medicine;* [3]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen, 40002, Thailand;* [4]*Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan; *E-mail: sopit@kku.ac.th, okadas@kumamoto-u.ac.jp Tel/Fax: 66-43-348-386*

CD147 or extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), is a transmembrane glycoprotein that plays important roles in invasion, proliferation, and angiogenesis in various cancers. This work was aimed to study the CD147 expression and function in cholangiocarcinoma (CCA) cell lines. We developed two stable CD147 silencing clones (C1 and C7) of CCA cell line, KKU-M213, using RNAi technique (shRNA). The expression of CD147 in the shCD147 clones were significantly suppressed when compared to that of KKU-M213 shVector control cells (shV). MTT assay and Boyden chamber assay were performed to determine cell growth and cell invasion study *in vitro*. Suppression of CD147 has no effect on cell proliferation, however, it significantly reduced invasion ability of the shCD147 cells as compared to shV cells. The underlining mechanism of this observation was shown to via the decreasing of MMP-2 and MMP-9 expressions and activities as demonstrated by real time RT-PCR and gelatin zymography. The roles of CD147 in CCA metastasis were further investigated *in vivo*. Silencing of CD147 expression suppressed tumor growth of KKU-M213 in subcutaneous transplantation mouse model. In addition, the metastatic potential of CD147 was investigated in tail vein injection model. The metastatic ability of shCD147 cells was significantly lower than those of shV cells as determined by the numbers of lung metastatic nodules. Taken together, CD147 plays a significant role in promoting metastasis of CCA. Reducing CD147 expression or activity may be a strategy for treatment of metastatic CCA.

Keywords: CD147, metastasis, invasion

Acknowledgement: This work was supported by research grants from the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Health Cluster (SHeP-GMS) and Khon Kaen University and the Royal golden Jubilee Ph.D program to SW/PD (Ph.D 0192/2552).

Association of Lewis Y expression in progression of cholangiocarcinoma

Somsiri Indramanee[1,3], Atit Silsirivanit[1, 3], Chawalit Pairojkul[2, 3], Chaisiri Wongkham[1, 3], SopitWongkham[1, 3*]

[1]*Department of Biochemistry,* [2]*Department of Pathology,* [3]*Liverfluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002* E-mail: somsiri_ind@hotmail.com, Tel: +66-43-348-386

Fucosylation is a posttranslational modification of glycoproteins found in plasma membrane and secretory proteins. Aberrant fucosylation has been reported in many pathological conditions including cancer. We have determined the aberrant fucosylations in cholangiocarcinoma (CCA) patient tissues using *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I), a lectin recognizing Fucα1→2Gal-containg glycans which are the blood type associated antigens, H type 2 and LeY. Lewis Y (LeY) is a difucosylated oligosaccharide [Fucα1→2Galβ1→4 (Fucα1→3) GlcNAcβ1→R]. Approximately 30% of CCA tissues highly expressed UEA-I recognizing fucosylated glycans whereas normal bile duct epithelia showed negative UEA-I signal. To elucidate the significant role of fucosylated glycans in CCA, we next determined the expression levels of 13 fucosyltransferases FUTs in 6 CCA cell lines (K100, M055, M213 L0, M213 L5, M214 L0 and M214 L5) and an immortalized cholangiocytes (MMNK1) by real-time PCR. Comparing to the normal cholangiocytes, FUT1 was found to be highly expressed in almost all CCA cell lines tested and was selected for further functional studies. FUT1 is the enzyme responsible for adding the terminal GDP-fucose to type II lactosamine precursor and yieldedLeY antigen which is highly expressed in various human epithelial originated carcinoma such as cancers of breast, ovary and colon. The association of FUT1 and its product, LeY in carcinogenesis and progression of CCA are under investigated.

Acknowledgements This study is supported by the Thailand Research Fund Senior Research Scholar Grant for S. Wongkham, and the research assistantship from Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University for S. Indramanee.

Keywords: Fucosyltransferase-1 (FUT1), Lewis Y, CCA progression

*Corresponding authors. E-mail: sopit@kku.ac.th

12

Novel Synthetic Mono-Triazole Glycosides Inhibit Growth of Cholangiocarcinoma Cell Lines through G1 Cell Cycle Arrest

Sumalee Obchoei[1], **Rungnapha Saeeng**[2], **Sopit Wongkham**[1]

[1]*Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand and* [2]*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand*

Introduction: The treatment of cholangiocarcinoma (CCA) is still ineffective although many novel therapeutic agents have been explored. 1,2,3-Triazole moiety has been proven to be an important structural scaffold in biomaterials for drug discovery as it has broad range of biological activities including anti-tumor activity. A growing body of evidence indicates that glycoside is a promising anticancer agent. We have developed an efficient method using O-glycosylation-click reaction to synthesize 2, 3-unsaturated-glycosyl triazoles and eight novel mono-triazole glycosides (W1-W8) were obtained in high yields. In the present study, the anticancer activities of these glycosides in CCA cell lines and the underlying cellular mechanisms were explored.

Methods: CCA cell lines (KKU100 and KKU-M213) were treated with various concentrations of the glycosides for 48 h. Cell cytotoxicity assay by MTT assay, cell cycle analysis by flow cytometry, and cell cycle regulatory proteins by western blot were determined.

Results: Among eight glycosides tested, W4 and W5 exhibited the most potent anticancer activity. Both W4 and W5 inhibited cell growth of KKU100 and KKU-M213 in a dose-dependent fashion. After 48-h treatment, the half maximal inhibitory concentration (IC50) values of W4 were 58.6 ± 1.87 (KKU100) and 78.7 ± 4.59 μM (KKU-M213) and that of W5 were 49.4 ± 2.62 (KKU100) and 63.0 ± 0.34 μM (KKU-M213), respectively. Propidium iodide staining and FACS-cell cycle analysis demonstrated that the treated cells were arrested at G1 phase in a dose-dependent fashion. Western blot analysis indicated the reduction of cyclin D1, and cyclin E protein levels and the increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27.

Conclusion: We demonstrated for the first time that W4 and W5 inhibit CCA cell growth through induction of G1 cell cycle arrest.

Keywords: Glycoside, cholangiocarcinoma, cell growth, G1 arrest

Acknowledgements: This study was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Health Cluster (SHeP-GMS), and Khon Kaen University.

Lactate dehydrogenase as a therapeutic target of cholangiocarcinoma

Ubon Cha'on, Unchalee Thonsri, Wunchana Seubwai, Sopit Wongkham*

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand; E-mail: sopit@kku.ac.th, Tel/Fax: 66-43-348-386

Growth and proliferation of cancer cells is highly depending on glycolysis, fatty acid synthesis and glutaminolysis. Aerobic glycolysis or the Warburg effect benefits cancer cells not only setting the microenvironment, but also increase essential intermediates for macromolecule biosynthesis which ultimately support growth, proliferation and survival. The over-expression of lactate dehydrogenase A (LDHA) is associated with tumor cell proliferation, metastasis, and poor prognosis. Therefore, we aimed to examine the LDHA expression at protein level in human CCA tissues by immunohistochemical technique. We also explored the correlation between LDHA expression and clinic-pathological features including tumor size, clinical stage, histological grade, and overall survival in 85 patients with cholangiocarcinoma. Our preliminary results suggested that the protein expression was significantly higher in tumor bile duct than normal bile duct areas of the same patient. However, the LDHA expression level seemed not to associate with clinico-pathological features of CCA patients. A greater number of sample tissues is needed for further investigation.

Keywords: LDHA, cholangiocarcinoma, cancer metabolism

Acknowledgements: We would like to thank LFCRC, Faculty of Medicine, and Khon Kaen University, Thailand, for granting the research funds related to this study.

13

Diabetes mellitus—a missing jigsaw of cholangiocarcinoma

Charupong Saengboonmee[1,3], Wunchana Seubwai[2,3], Sopit Wongkham[1,3]*

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
[2]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
[3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

E-mail address: sopit@kku.ac.th

Although liver fluke (*O. viverrini*) infection is the known risk factor for cholangiocarcinoma (CCA) in the Southeast Asia, however, less than 1% of the infected individuals develop CCA. The *O. viverrini* associated CCA in the hamster model indicates that infection of *O. viverrini* per se may not produce CCA. Other carcinogens or risk factors may also be required to induce CCA development. Recently there are several studies reported that common factors, such as smoking, alcoholic consumption, obesity and diabetes mellitus (DM) as risks of CCA in non-*O. viverrini* related CCA. In this presentation, the molecular mechanisms by which DM may enhance cancer development as well as the possibility of DM to be a factor which promotes CCA development in *O. viverrini* infected persons are elaborated. In addition, the preclinical studies of high glucose condition and aggressive phenotypes of CCA cell lines were explored by our group. Increases of cell proliferation, adhesion, migration and invasion were observed in CCA cells cultured in high glucose media. The phospho-kinases array suggested STAT3 as a candidate pathway activated under high glucose condition. The evidence was supported by the immunohistochemistry of STAT3 in CCA patient tissues. Tissues from patients with high pre-operative fasting blood glucose (FBG) (>126 mg/dL) had higher nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) comparing to those with normal FBG. Whether an anti-diabetic drug, metformin, can suppress the aggressive phenotype of CCA cell lines are discussed.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Diabetes Mellitus, Hyperglycemia, Glucose, Cancer progression

P-27

Increasing of glucose transporter 1 (GLUT1) expression related with early carcinogenesis and poor survival outcome of cholangiocarcinoma patients

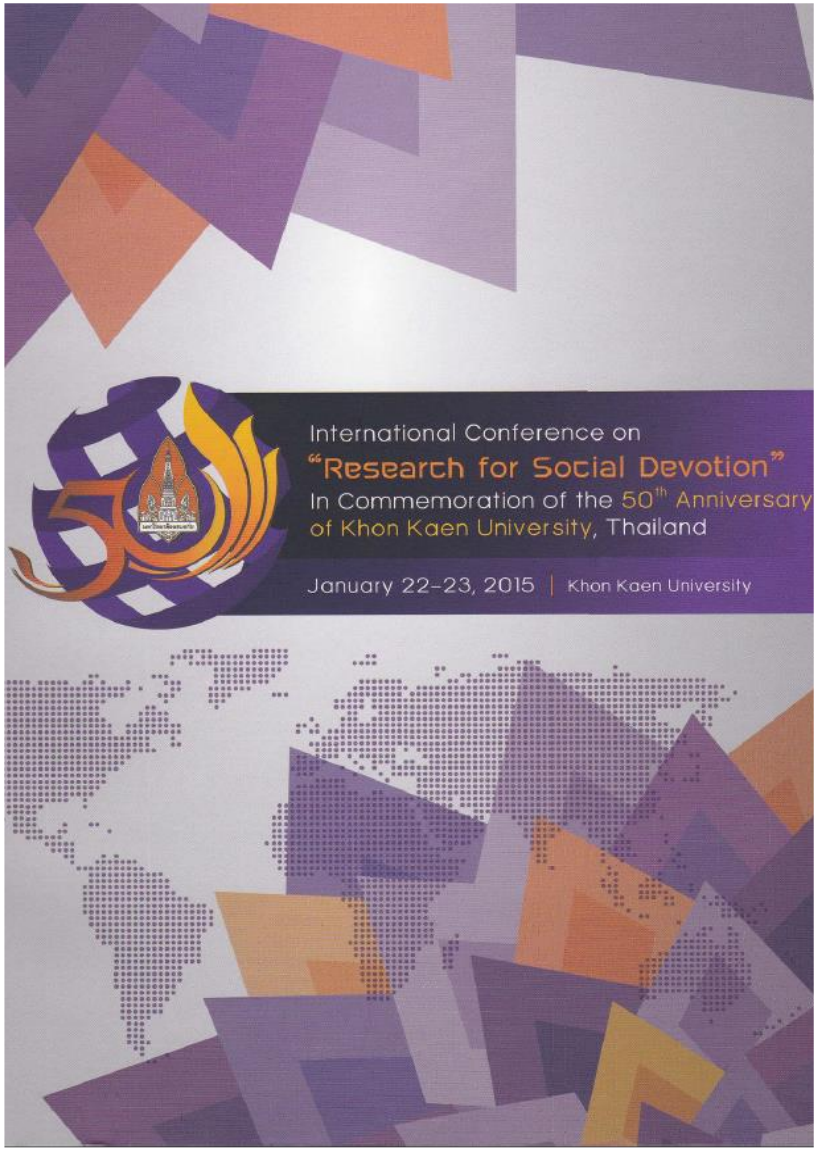
Ubonrat Thamronwaranggoon[1,3], Wunchana Suebwai[2,3], Ubon Cha'on[1,3], Sopit Wongkham[1,3]

[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Forensic, Faculty of medicine, [3]Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, 40002, Thailand

Glucose transporter 1 (GLUT1) is a transmembrane protein that overexpresses in several cancers and correlates with metastasis and poor patient outcomes. We examined GLUT1 expression by immunohistochemistry in 85 cases of human cholangiocarcinoma tissues and evaluated the GLUT1 expression levels with the clinical data of the patients. No GLUT1 expression was detected in normal bile duct epithelia. However, it was detected in proliferative bile duct and cholangiocarcinoma. GLUT1 was positive in 32.5% of hyperplasia, 41.8% of dysplasia and 81.8% of cholangiocarcinoma. High GLUT1 expression was significantly correlated with non-papillary type (P = 0.007) and poor survival of the patients (P = 0.01). Association of GLUT1 expression in carcinogenesis was determined in the *Opisthorchis viverrini* (*OV*) associated hamster model. Expression of GLUT1 was detected in bile duct epithelia of *OV*-infected and of *OV*-induced cholangiocarcinoma hamster tissues as early as 3 months after infection. No GLUT1 expression was found in the non-*OV* and NDMA treated group. The results indicate the associations of GLUT1 in carcinogenesis and progression of cholangiocarcinama. The inhibition of GLUT1 is probably a therapeutic target of *OV*-induced cholangiocarcinoma.

Acknowledgements

This work was supported by the Khon Kaen University research grant, UT is supported by research fellowship of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.



Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
Liver Fluke and
Cholangiocarcinoma Research
Center, Khon Kaen University,
Khon Kaen, THAILAND
Email: sopit@kku.ac.th

Professor Sopit Wongkham, PhD

Prof. Dr. Sopit Wongkham graduated B.Sc. in Medical Technology with a gold medal and honors from Mahidol University in 1976, obtained her M.Sc. and Ph.D. in Biochemistry from Mahidol University in 1978 and 1983. She started her career as a lecturer in the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kean University and has been there until the present. In 1988-1989, Professor Dr. Sopit Wongkham got a Research fellowship from the Fogarty Research Center, National Institute of Health, U.S.A. to conduct her research in reproductive biology at Harvard Medical School and from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) as a visiting professor at Okayama University in 1992.

Professor Dr. Sopit Wongkham started her research on cholangiocarcinoma (CCA) in 1995 and has concentrated on this career since then. Understanding the tumor biology involving carcinogenesis and metastasis of CCA may lead to a novel marker and targeted therapy. Professor Dr. Sopit Wongkham has targeted her research to discover tumor markers for diagnosis and prognosis of CCA at molecular and cellular levels and translating her findings to preclinical and clinical sciences. She collaborated with many international outstanding scientists under the Golden Jubilee Ph.D. program and the research center. The accumulated research information has built up an informative bank of knowledge which has subsequently uncovered various molecules with high potentials as tumor markers and targeted molecules for therapy of CCA. She has published more than one hundred articles in the peer-reviewed journals. With this outstanding record, Professor Dr. Wongkham has been awarded as the "Outstanding academic and research award" from the Graduate School Alumni, and Faculty of Science, Mahidol University, "Outstanding Scientist Award, 2013" from the Foundation for the Promotion of Science and Technology under the Patronage of His Majesty the King, and recently the "Outstanding faculty in Science-Technology, 2014" from Council of the University Senates of Thailand, the Office of Commission on Higher Education, Ministry of Education.

SCIENCE AND FUTURE MEDICINE

Sopit Wongkham

Outstanding Scientist Award, 2013 from the Foundation for the Promotion of Science and Technology under the Patronage of His Majesty the King. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Many external and internal factors influence health status of individual and society as a whole. Global warming has gradually been affecting the ecology in many continents and altering the epidemiology of many endemic diseases. In addition, increase of senior citizens is an emerging problem in many developed and developing countries. These factors enforce a paradigm shift of future medicine. In Thailand, tropical diseases can spread as the environment favors the spreading of vectors and the policy of "One ASEAN" support the translocation of people with diseases among ASEAN countries. The progress of science and technology in the "Omic" era brought about functional genomics, generating high throughput data at different dimensions. "System biology", a framework for conducting quantitative and comprehensive scientific enquiry builds up the understanding of the complexity of biological systems at all levels of cellular organization that contributes to a behavior or phenotype of individuals. As molecular expression and interactions are the basis of all cell biology and functions, pathologies and diseases are now recognized as the outcomes of the defects at the molecular level. In the 21th century, a molecular diagnostic tests and treatment will be based on the molecular signature of the individual and disease to ensure effective and personalized management. Regenerative medicine, gut microbiota and food as drug are the emerging fields of future medicine. As Khon Kaen University is the main institution responsible for the health of northeastern Thai people, KKU has to prepare supports for the advanced technology and the paradigm shift of future medicine.

main bronchus (16, 37.2% and 12, 27.9%). The most common X-ray finding is hyperaeration (17, 39.5%). Complications occurred in 23 patients including pneumonia (14, 32.6%), hypoxia (9, 20.9%). The patients were delayed treatment more than 15 day were found in 7 patients (16.3%).Of these delayed treated patients, there are complication in 5 patients(11.6%). Two patients death from complete airway obstruction and prolonged hypoxia.

Conclusions : Delayed management caused high complication rate in patients with airway foreign body aspiration. All patients should be immediately managed. Proper education for medical personal in primary care unit was important to decrease the complication rate, morbidity and mortality rate.

T13-16 : CD147 PROMOTES TUMOR CELL INVASION AND METASTASIS OF CHOLANGIOCARCINOMA [P]

Dana P[1,2], Vaeteewoottacharn K[1,2], Obchoei S[1,2], Sawunyawisuth K[1,2], Seubwai W[1,2], Kariya R[3], Matsuda K[4], Okada S[4], Wongkham S[1,2]*

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,
[2] Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,
[3] Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,
[4] Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

Introduction: CD147 is a glycosylated transmembrane protein which plays crucial roles in invasion, proliferation and metastasis in several cancers. This study is aimed to examine the expression and function of CD147 in cholangiocarcinoma (CCA) cell lines.

Methods: Two stable CD147 silencing clones (C1 and C7) of CCA cell line, KKU-M213, were generated using RNAi technique (shRNA). MTT assay for cell growth and Boyden chamber assay for cell invasion were determined in vitro. Expressions and activities of MMP-2 and MMP-9 were determined by real time RT-PCR and gelatin zymography, respectively. Roles of CD147 in CCA metastasis was further investigated in mouse model. Comparing to the shV control cells by tail vein injection and checked lung metastasis by CK-19 immunohistochemistry staining.

Results: The CD147 expression of the shCD147 clones were 40% reduced when compared to that of shVector control cells (shV). Silencing of CD147 expression did not affect cell proliferation but suppressed invasive ability of the shCD147 cells as compared to shV cells. This observation was shown to be due to the decreasing of MMP-2 and MMP-9 expressions and activities. In vivo study, shRNA treated cells showed reduction of tumor growth in xenografted mouse model. In addition, the lung metastatic ability of CCA cells was reduced in the shRNA treated cells as shown in the tail vein metastatic model. The lung metastasized nodules and CK-19 positive metastatic cells of shRNA injected mice were significantly lower than those of shV cells.

Conclusions: CD147 might play a crucial role in metastasis of CCA and CD147 is possibly a promising therapeutic target for metastatic CCA.

T13-17 : UP-REGULATION OF O-GLCNACYLATION MODULATED CHOLANGIOCARCINOMA METASTASIS [P]

Phoomak C, Silsirivanit A, Vaeteewoottacharn K, Wongkham C, Wongkham S*

Department of Biochemistry, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

Introduction: O-GlcNAcylation is a reversible protein modification of a single N-acetylglucosamine (GlcNAc) on serine and threonine residues of proteins.

This process regulated by two enzymes; O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) which transfers GlcN4c to a hydroxyl group of a serine or threonine to generate O-GlcNAcylated proteins (OGP); and β-N-acetylglucosaminidase (OGA) which catalyzes the reversed reaction. OGPs appear to be important in many cellular processes; such as transcription regulation, signal transduction, and interfering of proteolysis by proteasome. Thus, the aberration of O-GlcNAcylation can alter the functions of proteins contributing in many human diseases including cancer. Increased OGT and decreased OGA leading to the elevation of OGP in association with poor patient outcomes were reported in cholangiocarcinoma (CCA); here, we further investigated the roles of O-GlcNAcylation on the progression of CCA cells, *in vitro*.

Methods: The OGT and OGA expression of CCA cell lines (KKU-M213 and KKU-M214) were suppressed by specific siRNA. The proliferation, stress-induced apoptosis, migration and invasion were determined. The expressions of genes related to observed function were determined using real-time PCR. The up-stream regulators of selected genes were investigated using immunoblot.

Results: Suppression of OGT expression significantly reduced migration and invasion in both KKU-M213 and KKU-M214. In contrast, suppression of OGA expression enhanced the migration and invasion of CCA cells. However, the alteration of O-GlcNAcylation did not affect the proliferation and stress-induced apoptosis of CCA cell lines. The expressions of 21 metastatic related genes were determined. Two matrix metalloproteinase (MMP2 and MMP7) were identified to be associated with O-GlcNAcylation level. Action of NF-KB and AKT, the O-GlcNAcylated proteins which are the up-stream regulation of MMP2 and MMP7 were investigated. The nuclear localization of NF-KB was reduced in siOGT treated cells and reversed in siOGA treated cells. Moreover, the phosphorylation at ser-473 of AKT was also reduced in siOGT treated cells and resumed in siOGA treated cells.

Conclusions: These data highlight the roles of O-GlcNAcylation on metastatic activities of CCA, at least via modulation of NF-KB and AKT activities. Further study is undertaken to elucidate the O-GlcNAcylated proteins related to the progression of CCA.

T13-19 : MOVEMENT OF THE TYMPANIC MEMBRANE CAUSING PULSATILE TINNITUS [P]

Sriprompoteng S

Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

Introduction: Movement of the tympanic membrane can be a cause of pulsatile tinnitus. There are many etiologies that cause movement of the tympanic membrane, including otogenic pneumocephalus. This is an uncommon presentation after head injury that we may be missed as the diagnosis of the primary cause of the symptoms.

Method: Case report.

Result: We describe the very interesting case of a patient who presented with pulsatile tinnitus due to otogenic pneumocephalus. On examination, we found a moving tympanic membrane. A CT scan revealed pneumocephalus in the right temporo-parietal region which was continuous with the adjacent mastoid air cells and there was a transverse fracture through the mastoid process. A meticulous mastoidectomy with unroofing of the epitympanum was performed and widening of the aditus ad antrum. The mastoid cavity was closed without fat obliteration. After the operation the pulsatile tinnitus ceased completely.

Conclusion: Mastoidectomy and unroofing the epitympanum without fat obliteration is a very simple and effective option for the treatment of pulsatile tinnitus due to pneumocephalus.

High glucose condition enhances aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma

Sopit Wongkham[1,3]*, Charupong Saengboonmee[1,3], Chatchai Phoomak, Wunchana Seubwai[2,3], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,3], Atit Silsirivanit[1,3], Chaisiri Wongkham[1,3]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
[2]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
[3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand
E-mail address: sopit@kku.ac.th

Although cholangiocarcinoma (CCA) is a rare liver cancer, however, its incidence is increasing worldwide. Cholecystitis, smoking, alcoholic consumption are known risk factors of CCA in the western countries, liver fluke (*O. viverrini* and *Clonochis sinensis*) infection is a strong risk factor of CCA in the Southeast Asia. The epidemiology study indicated that less than 1% of the liver fluke infected individuals develop CCA. The infection of *O. viverrini* per se cannot produce CCA as demonstrated in the hamster model. Other carcinogens or risk factors may also be required to induce CCA development. Recently many studies reported diabetes mellitus as a risk factor of CCA in non-*O. viverrini* related CCA. The population base study showed high mortality rates of CCA and diabetes mellitus in the northeast Thailand. Our hospital base data also indicated high prevalence of diabetes mellitus in CCA patients. We proposed that high glucose condition may play role in cancer development and progression of CCA. Increases of cell proliferation, adhesion, migration and invasion were observed in CCA cells cultured in high glucose media. The phospho-kinases array suggested STAT3 as a candidate pathway activated under high glucose condition. This observation was supported clinically by the immunohistochemistry of STAT3 in CCA patient tissues. Tissues from patients with high pre-operative fasting blood glucose (FBG) (>126 mg/dL) had higher nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) comparing to those with normal FBG. High glucose condition also promotes O-GlcNAcylation in CCA cells. The O-GlcNAcylated product (OGP), migration and invasion of CCA cell lines cultured in high glucose condition were significant higher than those cultured in low glucose condition. High glucose also induced expressions of hexokinase-II (HK-II), glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransfrase (GFAT), and O-GlcNAc transferase (OGT) of the high metastatic CCA cells. Using GFAT inhibitor, DON, could effectively reduce OGP level and decrease CCA cell migration. The positive correlation between GFAT and OGP was demonstrated in CCA patient tissues. These data suggest the role of glucose in promoting aggressive phenotypes of CCA at least via activation of STAT3 and O-GlcNAcylation.

Keywords: Bile duct, STAT3, O-GlcNAcylation, Cancer progression

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for S. Wongkham (RTA5780012); National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University and the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund, Thailand (PHD/0016/2556) to C. Phoomak and S. Wongkham.

O-GlcNAylation is regulates diverse cellular processes which extensively modified by O-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) moieties in Nuclear, cytoplasmic, and mitochondrial proteins at serine or threonine residues. O-GlcNActransferase (OGT) and O-linked β-N-acetylglucosaminase (OGA) participate in addition and removal of O-GlcNAc, respectively. Perturbations in protein O-GlcNAcylation are associated with a wide range of human diseases and conditions.
The nuclear peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors. PPARs control the expression of networks of genes involved in adipogenesis, lipid metabolism, inflammation and maintenance of metabolic homeostasis. Among the PPARs, PPARγ is a master regulator of gene expression for metabolism, inflammation, and other pathways in many cell types, especially adipocytes.
Recently, many reports have suggested that PPARγ could be modulated by post-translational modifications (PTMs), and modulation of PTM has been considered as novel approaches for treating metabolic disorders. Although, O-GlcNAylation studied arise a global PTMs. but, O-GlcNAcylation of PPARγ were poorly understood. Here, we report that PPARγ O-GlcNAcylated during adipogenesis. O-glcNAcylation site prediction and mutant studies revealed that novel O-GlcNAcylation residue of PPARγ2 which close in acetylation sites. This O-GlcNAcylation has inverse correlation with acetylation status in PPARγ2. Moreover, inhibitions of O-GlcNAcylation led to attenuation of PPARγ2 in protein level. Our results suggest that the O-GlcNAc state of PPARγ2 influences its stability and is involved in adipocyte differentiation.

219. Alloxan inhibited the enhancing effect of lipopolysaccharide (LPS)-mediated iNOS/NO production by GlcN in RAW264.7 cells

Ji-Sun Hwang[1], Kyung-Hong Kim[1], Ji-Won Park, Sang-Min Kim[1], Jea-Hee Lee[1], Yunkyoung Lee[1], Inn-Oc Han[1]; [1]Inha University, Korea
iohan@inha.ac.kr

Previously, we demonstrated that glucosamine (GlcN) increased LPS-induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) production. In the present study, we investigated that Alloxan (Alx) regulates the enhancing effect of LPS-mediated production of iNOS/NO by GlcN in macrophage cells. Alx suppressed the production of NO in LPS plus GlcN treated cell culture media but not LPS-mediated NO production. Moreover, LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF-α mRNAs expression were enhanced by GlcN. Treatment with Alx, inhibited this enhancing effect. In addition, we found that GlcN enhanced the LPS-induced increase in O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification (O-GlcNAcylation) as well as DNA binding of c-Rel and p65 to the iNOS promoter, which was reversed by Alx. These results suggesting that inhibitory effect of Alx on GlcN-mediated enhancing of iNOS/NO expression in response to LPS is mediated by NF-κB inhibition.

220. Elevation of O-GlcNAcylation enhances progression of cholangiocarcinoma cells

Chatchai Phoomak[2], Atit Silsirivanit[2], Dayoung Park[1], Kanlayanee Sawanyawisuth[2], Kulthida Vaeteewoottacharn[2], Chaisiri Wongkham[2], Carlito B. Lebrilla[1], Sopit Wongkham[2]; [2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand, [1]Department of Chemistry, University of California, Davis, CA, 95616, US
chatchai_phoo@hotmail.com

O-GlcNAcylation is a post-translational modification of nucleocytoplasmic proteins with a single N-acetylglucosamine (GlcNAc). This process is controlled by two enzymes; the O-GlcNAc transferase (OGT) which transfers GlcNAc to serine or threonine of protein yielding the O-GlcNAcylated proteins (OGPs); and O-GlcNAcase (OGA) which catalyzes the reversed reaction. The OGPs are important in many cellular processes including tumor progression. Over-expression of OGT in cholangiocarcinoma (CCA) tissues and its correlation with shorter survival of CCA patients have been reported recently. In addition, knockdown of OGT alleviated the migration/invasion of CCA cell lines. This study, we further elucidate the novel OGPs that modulate the progression of CCA cells. To enhance the OGPs in CCA cells, suppression of OGA using PUGNAc, an OGA inhibitor, was used as the model of study. Increase of O-GlcNAcylation via PUGNAc treatment significantly increased CCA cell migration and invasion in two CCA cell lines. The OGPs related to the progression of CCA were further determined using Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System to label O-GlcNAcylated peptides and identified by Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer. Majority of OGPs found in KKU-213 and KKU-214 cells were nucleocytoplasmic proteins. There were 21 OGPs commonly found in both cell lines with almost similar intensity, of which 12 have not yet been reported for their O-GlcNAcylated forms, *e.g.*, the solute carrier family 3 member 2, meprin A subunit alpha, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, and calnexin, etc. The novel OGP candidates were selected and confirmed for the O-GlcNAcylated forms using immunoprecipitation and sWGA pull-down assay. Further studies are required to

demonstrate the O-GlcNAcylated site of the novel OGP candidate and its role related to cancer progression.

221. Change of localization of the O-GlcNAcylated actin accompanied with diabetic nephropathy

Yoshihiro Akimoto[1], Hayato Kawakami[1], KunimasaYan[2], Yuri Miura[6], Tosifusa Toda[3], Toshiyuki Fukutomi[4], Daisuke Sugahara[1], Akihiko Kudo[1], Gerald W. Hart[5], Tamao Endo[6]; [1]Kyorin University School of Medicine, Department of Anatomy, 181-8611, Tokyo, Japan, [2]Kyorin University School of Medicine, Department of Pediatrics, 181-8611, Tokyo, Japan, [3]Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Research Team for Mechanism of Aging, 173-0015, Tokyo, Japan, [4]Yokohama City University, Advanced Medical Research Center, 36-0004, Yokohama, Japan, [5]Kyorin University School of Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 181-8611, Tokyo, Japan, [6]Johns Hopkins University School of Medicine, Department of Biological Chemistry, 21205, Baltimore, USA
yakimoto@ks.kyorin-u.ac.jp

In the kidney of the non-insulin dependent diabetes model Goto-Kakizaki (GK) rat, an elevation of O-GlcNAcylation occurs in cytoskeletal proteins such as actin, α-actinin 4, tubulin, myosin and mitochondrial proteins such as ATP synthase and pyruvate carboxylase (Akimoto *et al*. Clin Proteomics 2011, 8: 15).
In order to elucidate the role of O-GlcNAcylated actin in diabetic nephropathy, the changes of the localization of O-GlcNAcylated actin in the kidney of the diabetic GK rats were examined immunohistochemically. There are five O-GlcNAcylation sites in the amino acid sequence of actin. We chose one site from them in which not only O-GlcNAcylation but also phosphorylation occurs, which is important for the extension of actin filament. A specific anti-O-GlcNAcylated actin antibody was produce by using synthetic O-GlcNAcylated peptide as antigen.
The antibody against O-GlcNAcylated actin reacted only with G-actin, but did not react with F-actin. It stained moderately both cytoplasm and nucleus. Compared with control normal kidney, O-GlcNAcylated actin was increased in the foot process, cytoplasm and nucleus of podocyte in the glomerulus of diabetic kidney. In the proximal tubule O-GlcNAcylated actin localized in the base of microvilli. O-GlcNAcylated actin increased in the proximal tubule of diabetic kidney in comparison with control normal one.
From these results, it was suggested that O-GlcNAcylation of actin regulates the extension of actin fiber by inhibiting phosphorylation and elevation of O-GlcNAcylation might cause the morphological changes in the foot process of podocyte and microvilli of proximal tubule by inhibiting the extension of actin fiber. The role of O-GlcNAcylated actin in the nucleus remains to be elucidated. This study was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (C-24590260 to Y.A.) and from Japan Diabetes Foundation (to Y.A).

Glycan Binding Proteins

222. Variable lymphocyte receptors (VLRs) of hagfish (Eptatretus burgeri) against glycans of avian influenza virus H9N2

Se Pyeong Im[1], Jung Seok Lee[1], Jaesung Kim[1], Tae Sung Jung[1]; [1]College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 660-70, Jinju, South Korea
arcayze@gmail.com

The adaptive immune system consists of highly efficient cellular mechanisms enables the host to eliminate the pathogens by evoking a more rapid and specific response against their repeated attacks. With respect to invertebrates possessing only the innate immune system, recent studies revealed that jawless vertebrates possess a unique immune receptor system. They possess particular molecules referred to as variable lymphocyte receptors (VLRs) such as VLR-A, VLA-C which are believed to be counterparts of T- cell receptors (TCRs) while VLRB functions as B- cell receptors (BCRs or Ig) of higher vertebrates.
To gain a better understanding of the adaptive immune responses of hagfish, we investigated the transcription profiles of VLRB at various time points after immunized with avian influenza virus (LPAIV) subtype H9N2. Moreover, we isolated and expressed monoclonal VLR-B proteins specific for the target virus confirmed by using a monoclonal antibody against VLR-B. These virus-binding clones showed high affinity and selectivity in ELISA and immunoblotting. Progeny virus from intentionally infected Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell line and chicken tissue were stained by our VLR-B clones, thus indicating specific recognition of antigens in immunocytochemistry (ICC) and immunohistochemistry (IHC) and flow cytometric analysis. To define antigenic determinants of the virus which are recognized by VLR-B clones in terms of glycocalyx, we assessed the selectivity using printed glycan microarray which are featured with 100 synthetic glycans. β-Glc-Sp, GlcNAc-β-1,3-Gal-β-1,4-Glc-β-Sp, Gal-α-1,3-Gal-β-1,3-GlcNAc-β-Sp, Tobramycin were the main reactive structures. However, additional studies will be required to more fully characterize the primary epitopes.
The unique phylogenetic position of VLRs in the evolution of adaptive immunity provides many potential advantages in VLR research. Previous studies have shown that VLR system can be used as specific binding scaffold for hen egg lysozyme,

PP212-119

Glioma pathogenesis-related protein 1 might associated with metastasis in cholangiocarcinoma cells

Waraporn Saentaweesuk[1,2,3], Norie Araki[3], Atit Silsirivanit[1,2,3], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2], Sopit Wongkham[1,2] and Chaisiri Wongkham[1,2]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[2] Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[3] Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan

E-mail: s.waraporn@kkumail.com

ABSTRACT

Metastasis, a multistep process for translocation of primary tumor to other sites in the body, is a major cause of cancer-related death including cholangiocarcinoma (CCA). The mechanism underlying the process is still unclear and needed to be elucidated. Membrane proteomic analysis between high- and low- metastatic CCA cell lines revealed glioma pathogenesis-related protein 1 (GLIPR1) as the most differential membrane protein. Overexpression of GLIPR1 in highly metastatic cell lines KKU-213L5 and KKU-214L5 compared to their parental cells was confirmed by western blot analysis. In addition, GLIPR1 was demonstrated in lymph node-metastatic CCA tissues. However, the roles of the protein in CCA metastasis is still under investigation. In conclusion, GLIPR1 might be a therapeutic candidate for CCA.

This work was co-supported by TRF Senior Research Scholar Grant and Khon Kaen University to SW (RTA5780012) and the RGJ-PhD Program, TRF (PHD/0021/2556) to WS and CW. We also thank the supports from Japan Student Services Organization to WS (JASSO 2015-2016).

Metastasis-associated SJA-GalNAcylated glycan and protein profile in cholangiocarcinoma

Waraporn Saentaweesuk[1,2,3], Norie Araki[3], Atit Silsirivanit[1,2,3], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2], Sopit Wongkham[1,2] and Chaisiri Wongkham[1,2]

[1] Department of Biochemistry, [2]Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand, [3]Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan

Metastasis is a major cause of cancer-related death in many cancers including cholangiocarcinoma (CCA). Exploring for specific markers for diagnosis/prognosis of CCA patients, together with a better understanding of CCA metastasis might improve prognosis of the patients and treatment of CCA. In this study, we determined the expression of *Sophora japonica* agglutinin-specific GalNAc-binding glycans (SNAG) in CCA tissues and sera from the patients. The result showed that the expression of SNAG in CCA cells was higher than those in normal bile ducts and hepatocellular carcinoma. Moreover, SNAG level in sera from CCA patients was significantly higher than healthy volunteers and other diseases. Kaplan-Meier plot, Log rank test and multivariate analysis demonstrated that patients with high serum-SNAG had shorter survival. We further elucidated the metastasis-associated proteins using differential membrane proteomic analysis of high- (KKU-214L5) and low- (KKU-214) metastatic CCA cell lines. A total of 7,016 unique proteins were identified. Vimentin and glioma pathogenesis-related protein 1 (GLIPR1) were selected as candidate proteins. The upregulation of vimentin and GLIPR1 was demonstrated in KKU-214L5 in relative with its parental using western blot analysis and immunohistochemistry. Furthermore, the depletion of vimentin in a highly metastatic CCA cell line using short interfering RNA significantly suppressed migratory and invasive capabilities of KKU-214L5 cells. In conclusion, the detection of SNAG in sera might be applicable as diagnostic and prognostic markers for CCA. Targeting of vimentin might suppress the metastasis of CCA. The combination of these strategies might improve the treatment of CCA and outcomes of the patients in the future.

This work was co-supported by TRF Senior Research Scholar Grant and Khon Kaen University (KKU) to SW (RTA5780012) and the Invitation research grant, Faculty of Medicine, KKU (IN58243). We also thank the supports from the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission through the Center of Excellence in SHeP-GMS cluster of KKU (M54209) and Japan Student Services Organization to WS (JASSO 2015-2016); the RGJ-PhD Program, TRF (PHD/0021/2556) to WS and CW.

Thailand-Japan Student Science Fair 2015

"Seeding Innovations through Fostering Thailand-Japan Youth Friendship"

22-24 December 2015

Princess Chulabhorn Science High School Phetchaburi, Thailand

Prof. Sopit Wongkham

Professor
Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine. Khon Kaen University
Thailand

Professor Sopit Wongkham completedthe Doctor of Philosophy in Biochemistry at Mahidol University. Since then, she has been engaged in the Molecular biology and metastasis of cancer. She is currently a Professor at the Department of Biochemistry, the Associate Dean for Research Affairs at Faculty of Medicine and Secretary of Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center at Khon Kaen University. She received an Outstanding Scientist Award of Foundation for the Promotion of Science and Technology under the Patronage of His Majesty the King in 2013 and was honored a Senior Research Scholarsof The Thailand Research Fund in 2015.

Japanese Proteomics Society
日本プロテオーム学会
2015年会 JHUPO第13回大会

プログラム・抄録集

タンパク質がおりなす
生命システムの全体像を理解する

～プロテオミクスを基盤とした生命科学研究の最前線と医療への応用～

The frontier of proteomics-based life science and its clinical application

～Understanding biological systems through comprehensive analysis of proteins and their networks～

会　期：2015年7月23日(木)・24日(金)

会　場：くまもと森都心プラザ

年会長：荒木 令江 熊本大学大学院生命科学研究部

主　催：日本プロテオーム学会

後援・協力・協賛

熊本大学、公益社団法人 日本生化学会、一般社団法人 日本蛋白質科学会、
日本癌学会、公益社団法人 日本農芸化学会、一般社団法人 日本質量分析学会、
一般社団法人 日本医用マススペクトル学会、クロマトグラフィー科学会、
日本電気泳動学会、公益社団法人 日本分析化学会、
公益社団法人 日本生物工学会、日本臨床プロテオーム研究会、
熊本国際観光コンベンション協会

1A-p1-1 若手奨励賞　　シンポジウム1A-p1

High glucose condition enhances aggressive phenotypes of cholangiocarcinoma

Sopit Wongkham[1,2], Charupong Saengboonmee[1,3], Chatchai Phoomak[1,3], Wunchana Seubwai[2,3], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,3], Atit Silsirivanit[1,3], Chaisiri Wongkham[1,3]

1: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand,
2: Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand,
3: Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
4: Department of Tumor genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, 860-8556, Japan

Although cholangiocarcinoma (CCA) is a rare liver cancer, however, its incidence is increasing worldwide. Cholecystitis, smoking, alcoholic consumption are known risk factors of CCA in the western countries. liver fluke (O. viverrini and Clonorchis sinensis) infection is a strong risk factor of CCA in the Southeast Asia. The epidemiology study indicated that less than 1% of the liver fluke infected individuals develop CCA. The infection of O. viverrini per se cannot produce CCA as demonstrated in the hamster model. Other carcinogens or risk factors may also be required to induce CCA development. Recently many studies reported diabetes mellitus as a risk factor of CCA in non-O. viverrini related CCA. The population base study showed high mortality rates of CCA and diabetes melitus in the northeast Thailand. Our hospital base data also indicated high prevalence of diabetes mellitus in CCA patients. We proposed that high glucose condition may play role in cancer development and progression of CCA. Increases of cell proliferation, adhesion, migration and invasion were observed in CCA cells cultured in high glucose media. The phospho-kinases array suggested STAT3 as a candidate pathway activated under high glucose condition. This observation was supported clinically by the immunohistochemistry of STAT3 in CCA patient tissues. Tissues from patients with high pre-operative fasting blood glucose (FBG) (>126 mg/dL) had higher nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) comparing to those with normal FBG. High glucose condition also promotes O-GlcNAcylation in CCA cells. The O-GlcNAcylated product (OGP), migration and invasion of CCA cell lines cultured in high glucose condition were significant higher than those cultured in low glucose condition. High glucose also induced expressions of hexokinase-II (HK-II), glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransfrase (GFAT), and O-GlcNAc transferase (OGT) of the high metastatic CCA cells. Using GFAT inhibitor, DON, could effectively reduce OGP level and decrease CCA cell migration. The positive correlation between GFAT and OGP was demonstrated in CCA patient tissues. These data suggest the role of glucose in promoting aggressive phenotypes of CCA at least via activation of STAT3 and O-GlcNAcylation.

Acknowledgements: This project was co-supported by the Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund and Khon Kaen University for S. Wongkham (RTA5780012) ; National Research University Project of Thailand through SHeP-GMS; Khon Kaen University and the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund, Thailand (PHD/0016/2556) to C. Phoomak and S. Wongkham.

การประชุมวิชาการ
พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19
"พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์"

National Genetics Conference 2015 (NGC2015)
"Genetics and Genomics: from Molecular Studies to Applications"

15 - 17 กรกฎาคม 2558
โรงแรมเซ็นทาราแอนคอนเวนชันเซนเตอร์ขอนแก่น จ. ขอนแก่น
www.ngc2015.kku.ac.th

สาเหตุการเกิดและสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างส่งผลกระทบต่อรูปแบบพันธุกรรมของมะเร็งท่อน้ำดี

ชุติมา ตลับนิล[1] ชวลิต ไพโรจน์กุล[2] และ โสพิศ วงศ์คำ[3*]**
Chutima TALABNIN[1**], Chawalit PAIROIKUL[2] and Sopit WONGKHAM[3*]

[1]สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี นครราชสีมา
[2]ภาควิชาพยาธิวิทยาและศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น
[3]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น
School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand; [2]Department of Pathology and Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand; [3]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
*E-mails: *sopit@kku.ac.th, **chutima.sub@sut.ac.th*

บทคัดย่อ อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีทั่วโลกมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ซึ่งอาจเนื่องจากความแตกต่างของปัจจัยเสี่ยงและสาเหตุของการเกิดโรค สำหรับพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ พบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรังเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในขณะที่พื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ การอักเสบเรื้อรังที่บริเวณท่อน้ำดี ถุงน้ำดีและตับ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งชนิดนี้ ปัจจุบันการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic alterations) และการควบคุมเหนือพันธุกรรม (epigenetic alterations) ในมะเร็งท่อน้ำดีมีมากขึ้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่มีปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมักมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในรูปแบบของการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น RAS/RAF pathway ในทางตรงกันข้ามมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ มักพบการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับดีเอ็นเอหรือเรียกว่า chromatin modulators นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของการควบคุมเหนือพันธุกรรม โดยพบความผิดปกติในระยะเริ่มแรกของการเกิดมะเร็งซึ่งเชื่อว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยเร่งกระบวนการก่อมะเร็งจากการศึกษาเปรียบเทียบความผิดปกติของการควบคุมเหนือพันธุกรรมในมะเร็งท่อน้ำดีที่มีปัจจัยเสี่ยงและสาเหตุที่แตกต่างกัน พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมักมีความผิดปกติที่เด่นชัดของ DNA methylation ในกลุ่มยีนของ Wnt signaling pathway ขณะที่ความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ค้นกำเนิดปรากฏชัดเจนในมะเร็งท่อน้ำดีที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสาเหตุของการเกิดโรคมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบพันธุกรรมของเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่จำเพาะและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ABSTRACT Incidence of cholangiocarcinoma (CCA) varies widely between geographic regions which reflect the impact of different underlying etiologies. In endemic areas, liver fluke infections represent the major risk factors for CCA, whereas in non-endemic regions, predisposing factors including choledochal cysts, hepatolithiasis and primary sclerosing cholangitis are likely contributors. Genetic, epigenetic and transcriptional abnormalities of CCA have been widely studied. The distinct genetic alteration patterns in liver fluke–related CCA associate with genomic instability and RAS/RAP pathway alterations while the genetics alteration in chromatin modulator from epigenetic regulation process is common in non-infection-related CCA. Aberrant DNA methylation occurs very early during carcinogenesis and it is thought to interact with genetic alteration in driving the tumorigenic phenotype of cancer. Comparison between non-liver fluke and liver fluke-related CCA revealed difference in global alteration patterns of DNA methylation: Wnt Signaling pathway are targeted in the non-liver fluke-related CCA, however stem cell genes is frequently observed in the liver fluke-related CCA. These indicate the impact of different causative etiologies which influence the pattern of genetic and epigenetic alterations, even within the same tumor type. Taking advantage of the different genetic signatures of different etiology CCAs may facilitate the discovery of the specific therapeutic management for this disease.

คำสำคัญ : มะเร็งท่อน้ำดี การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การควบคุมเหนือพันธุกรรม สาเหตุของโรค
Keywords: cholangiocarcinoma, Genetics, Epigenetics, Etiology

P-047

ポスター発表

Cancer stem cells up-regulate O-GlcNAcylation systems to maintain their stemness

Atit Silsirivanit[1,2,3], Akiko Nambu[1], Yoshimune Yamasaki[1], Minako Nagai[1], Megumi Nagayama[1], Daiki Kobayashi[1], Norie Araki[1]

1) Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University.
2) Department Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.
3) International Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS)

Cancer stem cells (GSCs) are considered responsible for the therapeutic resistance and recurrence of malignant tumors. T clarify the molecular mechanism of CSC maintenance-differentiation, we established glioma stem cell (GSC) clones having th potential to differentiate into malignant gliomas, and subjected to DNA microarray/iTRAQ-2D-DIGE based integrated pr teomics. Using iPEACH, newly constructed integration software, followed by KEGG pathway mapping identified the highe level of O-GlcNAcylation, such as O-GlcNAc responsible enzymes and modified proteins, in stem cells (sphere), comparing wit its differentiated form. O-GlcNAc related metabolic pathways (glycolysis, Krebs, and hexosamine biosynthesis) and the er zymes regulating O-GlcNAcylation (OGT, OGA) were predominantly expressed in sphere. Western blot analysis revealed the the higher level of O-GlcNAc modified proteins (OGP) was observed in GSC-sphere and it was dramatically reduced after th FCS-induced differentiation. Suppression of UDP-GlcNAc synthesis by 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) results in globally de crease of OGP and significant suppress the proliferation of GSCs. Moreover, differentiation of GSC was significantly suppresse by treatment of glutamine (Gln) and glucosamine (GlcN). Since Gln and GlcN were known as precursor for O-GlcNAcylatior hence their differentiation-suppressing effect might be due to the reverse effect against declining of O-GlcNAcylation upo differentiation of GSCs. In conclusion, it is strongly demonstrated that the higher level of O-GlcNAcylation is important fo stemness-maintenance of glioma stem cells. Altering O-GlcNAcyalition is potentially affect the self-renewal and differentiatio of the cells, suggesting the possibility of O-GlcNAcylation to be a target for treatment of malignant glioma.

P-017

ポスター発

Differential proteomic profile of a high metastatic cholangiocarcinoma cell line : KKU-M214L5 and its parental : KKU-M214 revealed by a label-free proteomic analysi

Waraporn Saentaweesuk[1,2,3], Atit Silsirivanit[2,3,4], Kulthida Vaeteewoottacha[2,3], Sopit Wongkham[2,3], Norie Araki[1], Chaisiri Wongkham[2,3]

1) Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University,
2) Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand,
3) Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand,
4) International Research Fellow of JSPS

Metastasis is a multistep event for a translocation of cancer cells from a primary site to a distant tissue site to form metastatic nodules. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a first process required for cancer cell dissociation. Metastasis is a most common cause of cancer-related death in many types of cancer including cholangiocarcinoma (CCA), a cancer originated from bile duct epithelia. CCA is a major health problem in northeastern, Thailand. Most of patients are diagnosed at late stage with metastatic lesion because signs and symptoms at early stage are not specific. To understand the mechanism underlying CCA metastasis, a high metastatic CCA cell line; KKU-M214L5, was established by the fifth time serial-intravenous injection of KKU-M214 to immunocompromised mice. The characters of KKU-M214L5 were compared and showed a higher metastatic potential than its parental both in vitro and in vivo. In addition, vimentin, b-catenin, and E-cadherin were elevated in a highly metastatic subline. Moreover, a label-free proteomic analysis has been applied in order to gain a deeper understanding of metastasis. Pilot study revealed 151 specific proteins from KKU-M214L5. Gene ontology analysis showed that some factors related to the transcription, mRNA splicing, and morphology regulations were up-regulated in KKU-M214L5. In contrast, proteins involved in apoptotic process, DNA repairment and oxidative stress response were down-regulated in high metastatic cells. Further repeated quantitative identification and functional analysis of the specific proteins in KKU-M214L5 cells will be performed and discussed on the molecular based mechanisms of CCA metastasis.

Acknowledgements: We thank the supports from TRF Senior Research Scholar Grant to SW (RTA5780012) : NRU Project of Thailand through SHeP-GMS (KKU) and RGJ Ph. D. Program (PHD0021/2556) to WS and CW; JASSO to WS.

P-018

ポスター発表

Functional analysis of chloroquine toxicity

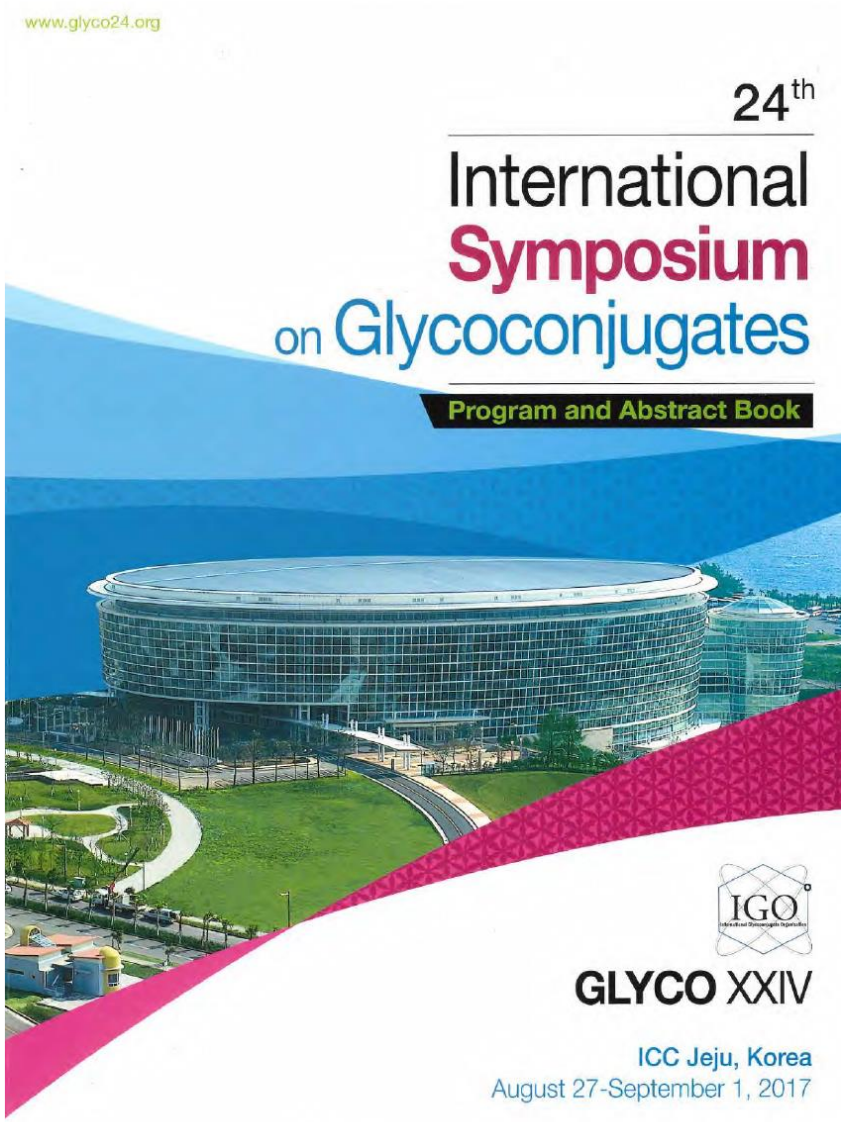
Diwakar Guragain[1,2,5], Atit Silsirivanit[1,2,4,6], Wunchana Seubwai[2,4], Sopit Wongkham[2,4], Ubon Chaijon[2,4], Akira Sasao[1], Ako Sasao[6], Norie Araki[1]

1) Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University,
2) Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand,
3) Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand,
4) Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand,
5) International Research Fellow of JSPS,
6) Department of Forensic Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

Chloroquine (CQ), a widely used antimalaria drug, has been repurposed for treatment of diverse diseases such as rheumatoid arthritis, lupus erythematosus and amoebic hepatitis. Recently, importance has been attached to its anticancer activity. CQ has shown potential of inhibiting cell growth and inducing cell death in various cancer cells. The mechanism of action underlying anticancer activity of CQ is not completely known although it has been shown that CQ blocks autophagy by inhibiting lysosomal proteases and autophagosome-lysosomal fusion events, thereby inducing apoptosis. In this study, anticancer effects of CQ on cholangiocarcinoma (CCA) cells were studied. CQ is cytotoxic to CCA cells and inhibits proliferation as well as metastasis of CCA cells in vitro and in vivo. To elucidate the localization of CQ in CCA cells, a fluorescent CQ derivative was prepared by attaching a fluorescent label, ATTO 520 with a metabolic product of CQ, bisdesethylchloroquine (BDCQ). The fluorescent CQ derivative (BDCQ-ATTO) was localized relatively wider perinuclear area in CCA cells. In addition to this, both BDCQ and BDCQ-ATTO were cytotoxic to CCA cells in dose dependent manner. Whole cell Proteomics and Western blotting revealed that at least MAPKs, vimentin, b-caterin, E-cadherin, MMP's and other migration related proteins are down regulated in the CQ-treated cells.

These results propose that CQ may be a possible therapeutic agent for diminishing the tumor growth, expansion and metastasis in CCA patients.

Acknowledgements: We would like to thank Faculty of Medicine, Khon Kaen University for giving the Post Graduate Scholarship for International Students (PSIS) & Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University for JASSO Scholarship to Diwakar Guragain.



24. Serum GalNAc-associated glycan as a biomarker for diagnosis and prognosis of cholangiocarcinoma

Atit Silsirivanit[1], Waraporn Saentaweesuk[1], Chaisiri[1], Sopit Wongkham[1]; [1]Khon Kaen University, Department of Biochemistry, Research Group for Glycosciences and Glycotechnology, Faculty of Medicine, Cholangiocarcinoma Research Institute, 40002, Khon Kaen, Thailand
atitsil@kku.ac.th

Aberrant glycosylation has been demonstrated in cholangiocarcinoma (CCA), the CCA-associated glycans are potentially used as biomarkers for diagnosis and monitoring of the disease. Our study using lectin histochemistry revealed the specificity of Sophora japonica agglutinin (SJA), an N-acetyl galactosamine (GalNAc) binding lectin, to abnormal bile ducts and cholangiocarcinoma. In this study, SJA-based sandwich ELISA was successfully developed for the detection of serum GalNAc-containing glycan. SJA-specific Glycan (SJG) was highly detected in serum of CCA patients, comparing with patients of other hepatobiliary diseases and healthy persons ($P < 0.05$). Moreover, high level of serum SJG indicates the shorter survival of CCA patients. In conclusion, we have disclosed here the potential of GalNAc-associated glycan as a new diagnostic and prognostic serum marker for CCA, which can be detected by the newly developed sandwich ELISA system.

Acknowledgements: We would like to thank the supports from Senior Research Scholar Grant of TRF and Khon Kaen University (KKU) (RTA5780012); KKU research grant (592401); and Faculty of Medicine, KKU (RG60201). CW and WS was grateful to the support from the RGJ-PhD Program, TRF (PHD/0021/2556).

220. Elevation of O-GlcNAcylation enhances progression of cholangiocarcinoma cells

Chatchai Phoomak[2], Atit Silsirivanit[2], Dayoung Park[1], Kanlayanee Sawanyawisuth[2], Kulthida Vaeteewoottacharn[2], Chaisiri Wongkham[2], Carlito B. Lebrilla[1], Sopit Wongkham[2]; [2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand, [1]Department of Chemistry, University of California, Davis, CA, 95616, US
chatchai_phoo@hotmail.com

O-GlcNAcylation is a post-translational modification of nucleocytoplasmic proteins with a single N-acetylglucosamine (GlcNAc). This process is controlled by two enzymes; the O-GlcNAc transferase (OGT) which transfers GlcNAc to serine or threonine of protein yielding the O-GlcNAcylated proteins (OGPs); and O-GlcNAcase (OGA) which catalyzes the reversed reaction. The OGPs are important in many cellular processes including tumor progression. Over-expression of OGT in cholangiocarcinoma (CCA) tissues and its correlation with shorter survival of CCA patients have been reported recently. In addition, knockdown of OGT alleviated the migration/invasion of CCA cell lines. This study, we further elucidate the novel OGPs that modulate the progression of CCA cells. To enhance the OGPs in CCA cells, suppression of OGA using PUGNAc, an OGA inhibitor, was used as the model of study. Increase of O-GlcNAcylation via PUGNAc treatment significantly increased CCA cell migration and invasion in two CCA cell lines. The OGPs related to the progression of CCA were further determined using Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System to label O-GlcNAcylated peptides and identified by Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer. Majority of OGPs found in KKU-213 and KKU-214 cells were nucleocytoplasmic proteins. There were 21 OGPs commonly found in both cell lines with almost similar intensity, of which 12 have not yet been reported for their O-GlcNAcylated forms, *e.g.*, the solute carrier family 3 member 2, meprin A subunit alpha, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, and calnexin, etc. The novel OGP candidates were selected and confirmed for the O-GlcNAcylated forms using immunoprecipitation and sWGA pull-down assay. Further studies are required to demonstrate the O-GlcNAcylated site of the novel OGP candidate and its role related to cancer progression.

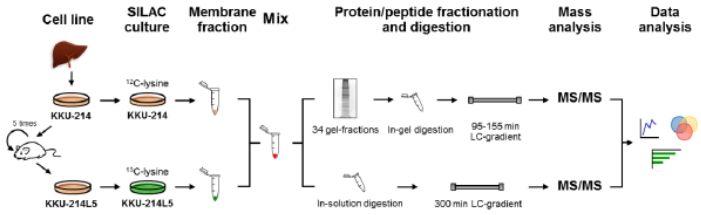
Membrane proteomic analysis revealed glioma pathogenesis-related protein 1 as a key protein for metastasis of cholangiocarcinoma

Waraporn Saentaweesuk,[a,b,c] Norie Araki,[c] Atit Silsirivanit,[a,b,c] Kulthida Vaeteewoottacharn,[a,b] Sopit Wongkham,[a,b] and Chaisiri Wongkham[a,b,*]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*
[b]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*
[c]*Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan.*

s.waraporn@kkumail.com

Metastasis is a translocation process of cancer cells from a primary site to colonize at a secondary site. It is a major cause of cancer-related death in many solid tumors including cholangiocarcinoma (CCA). Many studies attempt to explore the mechanisms underlying CCA metastasis but the understanding of entire processes is still unclear. Here, membrane proteomic profiles of a highly metastatic CCA cell line, KKU-214L5 had been compared with its parental, KKU-214. Totally, 7,016 proteins were identified from two proteomic preparation methods; gel-based and liquid chromatography-based mass spectrometry. Both approaches revealed common 3,002 proteins and further bioinformatics analysis indicated that glioma pathogenesis-related protein 1 (GLIPR1) may be a potential candidate. The expression of GLIPR1 was verified using western blotting. GLIPR1 was upregulated in highly metastatic CCA cells, KKU-213L5 and KKU-214L5 in relative with their parental cells. Immunohistochemistry of GLIPR1 have been performed in human CCA and mouse transplanted CCA tissues. Moreover, the function of GLIPR1 in association with CCA metastasis is under investigation. In conclusion, GLIPR1 expression was firstly discovered in CCA using membrane proteomic analysis. A better understanding in GLIPR1 functions might fulfil a missing knowledge in CCA metastasis.



Keywords: bile duct cancer; GLIPR1; mass spectrometry; membrane protein; RTVP1

References:

1. Awasthi, A.; Woolley, A. G.; Lecomte, F. J.; Hung, N.; Baguley, B. C.; Wilbanks, S. M.; Jeffs, A. R.; Tyndall, J. D. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 225.

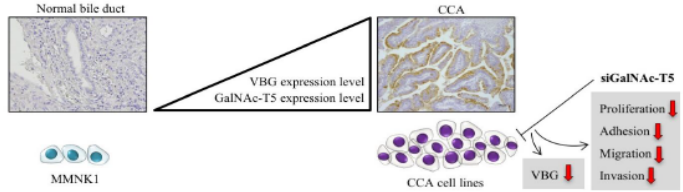
Polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 5 regulates GalNAc-associated glycans expression and facilitates growth and metastasis of cholangiocarcinoma

Marutpong Detarya,[a,b] Atit Silsirivanit,[a,b] Kanlayanee Sawanyawisuth,[a,b] Sopit Wongkham,[a,b] and Chaisiri Wongkham[a,b,*]

[a]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*
[b]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*

Marutpong.D@kkumail.com

Mucin type *O*-glycosylation was generally found in membrane-bound and secretory proteins. Complex glycan structures begin with the addition of serine/threonine with *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) as the first sugar residue. The process is initiated by the function of different 20 polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts) to form GalNAcα1-O-serine/threonine linkage. Several studies revealed that aberrant expression of GalNAc-Ts is associated with growth and metastasis of many cancers. Lectin histochemistry of cholangiocarcinoma (CCA) tissues revealed the aberrant GalNAcylation in cancer cells, comparing with normal adjacent bile ducts. GalNAc-associated glycans were analyzed by lectin histochemistry using *Vicia villosa* lectin (VVL) in 53 human CCA tissues. The result demonstrated that VVL-binding glycans (VBG) were over-expressed in hyperplastic/dysplastic bile ducts and CCA, but not in hepatocyte and normal bile ducts. It suggested that elevation of GalNAcylation might occur in CCA through the increasing of GalNAc-Ts expression. Therefore, the expression of GalNAc-Ts were investigated in 4 CCA cell lines (KKU-055, KKU-100, KKU-213, KKU-214) by real-time RT-PCR, comparing with normal cholangiocyte (MMNK1). Among seven different GalNAc-Ts, GalNAc-T5 was highly expressed in KKU-213 and KKU-214 compared with KKU-055, KKU-100 and MMNK1. The roles of GalNAc-T5 were examined for growth and metastasis of CCA cell lines using specific siRNA. VBG expression of KKU-213 and KKU-214 was dramatically reduced after siGalNAc-T5 treatment. The abilities in proliferation, adhesion, migration and invasion of siGalNAc-T5 treated cells were significantly decreased, comparing with siControl treated cells. This information suggested the association of GalNAc-T5 and its product, VBG, with CCA progression and the possibility of GalNAc-T5 as a novel therapeutic target of CCA.



Keywords: GalNAc-T5; cholangiocarcinoma; mucin *O*-glycosylation

References:

1. Beaman, E. M.; Brooks, S. A. *Histol. Histopathol.* **2014**, *29*, 293-304
2. Bennett, E. P.; Mandel, U.; Clausen, H.; Gerken, T. A.; Fritz, T. A.; Tabak, L. A. *Glycobiology* **2012**, *22*, 736-756

S3-1

Pyruvate kinase M2: a potential therapeutic target of cholangiocarcinoma

Unchalee Thonsri [1,5], Wunchana Seubwai [2,5], Sakda Waraasawapati [3], Thidarut Boonmars [4,5], Sopit Wongkham [1,5], Ubon Cha'on [1,5]

1:Dept. of Biochemistry, Faculty of Med., Khon Kaen Univ., 2:Dept. of Forensic Med., Faculty of Med., Khon Kaen Univ., 3:Dept. of Path., Faculty of Med., Khon Kaen Univ., 4:Dept. of Parasitology, Faculty of Med., Khon Kaen Univ., 5:Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Res. Ctr., Khon Kaen Univ.

Cancer cells consume glucose at the higher rate than normal cells. Up taken of glucose in cancer cells is mainly for aerobic glycolysis which its products are converted to building blocks of macromolecule biosynthesis. Pyruvate kinase M2 (PKM2) has been identified as being necessary for aerobic glycolysis. However, the role of PKM2 in *Opisthorchis viverrini* (*Ov*) associated cholangiocarcinoma (CCA) is still unclear. At present study, we examined the expression of PKM2 in hamster-and human-CCA tissues using immunohistochemistry technique. The effect of PKM2 inhibitor namely shikonin on proliferation of CCA cell lines was also determined using MTT assay. PKM2 expression was gradually increased during the carcinogenesis of CCA in hamster model. In addition, the overexpression of PKM2 was found in human-CCA tissues. Inhibition of PKM2 using shikonin decreased the proliferation of three CCA cell lines in a dose-dependent manner. Our study indicated that PKM2 might be the potential target for CCA treatment.

S16-8
Annexin A1 promotes cholangiocarcinoma aggression

Kanlayanee Sawanyawisuth [1], Kwuntida Uthaisar [1], Sumalee Obchoei [1], Kulthida Vaeteewoottacharn [1], Seiji Okada [2], Sopit Wongkham [1]

1:Dept. of Biochem., LFCRC, Fac.of Med., Khon Kaen Univ.、2:Div. of Hematopoiesis, Ctr. for AIDS Res., Kumamoto Univ.

Annexin A1 (ANXA1) is a calcium-dependent phospholipid-binding protein, involved in proliferation, cancer progression and metastasis. Our preliminary study indicated the up-regulation of ANXA1 in high metastatic cholangiocarcinoma (CCA) cell line (KKU-M213L5). We aimed to investigate the role of ANXA1 in CCA. The expression of ANXA1 was examined in 48 histological proven intrahepatic CCA patient tissues. Most of the CCA tissues expressed ANXA1 more intensely than the bile duct epithelium in the non-tumorous patient tissues ($P<0.001$). The significant association of high ANXA1 expression and lymphatic invasion was observed. The role of ANXA1 in the progression of CCA cell line was determined. ANXA1-siRNA significantly reduced KKU-M213L5 cell proliferation, migration and invasion. Taken together, ANXA1 may play a role in CCA aggression and be an alternative target treatment of metastatic CCA.

This work is co-supported by the Higher Education Research Promotion and NRU Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through SHeP-GMS-KKU; TRF and KKU funding through RGJ-Ph.D. Program (PHD/0211/2550) to KU and SW; and TRF Senior Research Scholar Grant (RTA5780012) to SW.

P-1212
Comparative proteomics of cholangiocarcinoma cell lines, KKU-M214 and KKU-M214L5 with different metastatic potentials

Waraporn Saentaweesuk [1,2,3], Atit Silsirivanit [1,2,3], Kulthida Vaeteewoottacharn [1,2], Sopit Wongkham [1,2], Chaisiri Wongkham [1,2], Norie Araki [3]

1:Dept. of Biochem., Faculty of Med., Khon Kaen Univ., Thailand、2:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr., Khon Kaen Univ., Thailand、3:Dept. of Tumor Genetics & Biol., Kumamoto Univ., Japan

Metastasis is a major cause of death in many types of cancer including cholangiocarcinoma (CCA). To study the mechanism underlying CCA metastasis, a high metastatic CCA cell line; KKU-M214L5, was established by taking five repeated purifications of KKU-M214 cells from the lung metastatic focus formed after the sequential intravenous injection in NOD/SCID/JAK3^{null} mice. KKU-M214L5 was in vitro and in vivo shown to gain metastatic capabilities obviously above its parental cells. Here, a comparative proteomic analysis has been used to explore a differential protein profile between the cells. Pilot study from label-free gel-based mass spectrometry partially identified 151specific proteins from KKU-M214L5. Gene ontology analysis showed that some factors related to the transcription, mRNA splicing, and morphology regulations were up-regulated, on the other hand, proteins involved in apoptotic process, DNA repairment and oxidative stress response were down-regulated in KKU-M214L5. Further repeated quantitative identification and functional analysis of the specific proteins in KKU-M214L5 cells will be presented and discussed on the molecular based mechanisms of CCA metastasis.

P-2169

The overexpression of GLUT1 in cholangiocarcinoma patients related with early carcinogenesis and poor prognosis

Ubonrat Thamrongwaranggoon [1,3], Wunchana Seubwai [2,3], Ubon Cha'on [1,3], Sopit Wongkham [1,3]

1:Dept. of Biochem., Faculty of Med., Khon Kaen Univ., Thailand、2:Dept. of Forensic Med., Khon Kaen Univ., Thailand、3:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr., Khon Kaen Univ., Thailand

Glucose transporter 1 (GLUT1) is a transmembrane protein that overexpresses in several cancers. At present study, we examined GLUT1 expression by immunohistochemistry in 112 cases of human CCA tissues and evaluated the GLUT1 expression levels with the clinical data of the patients. No GLUT1 expression was detected in normal bile duct epithelia. However, it was detected in CCA (83.93%). The overexpression of GLUT1 was significantly correlated with shorter survival of the patients ($P > 0.05$). Association of GLUT1 expression in carcinogenesis was determined in the *Ov* associated CCA hamster model. Expression of GLUT1 was detected in bile duct epithelia of *Ov*-infected and of *Ov*-induced CCA hamster tissues as early as 3 months after infection. Moreover, we investigated the effect of GLUT1 inhibitor namely phloretin in 6 CCA cell lines and MMNK1. Phloretin could decrease growth of 6 CCA cell lines in a dose dependent manner. The results indicate the associations of GLUT1 in carcinogenesis and progression of cholangiocarcinoma. The inhibition of GLUT1 is probably a therapeutic target of *Ov*-induced cholangiocarcinoma.

P-2172

Cimetidine inhibits growth of cholangiocarcinoma cells by induction of G0/G1 arrest and apoptosis

Paweena Dana [1,2,3], Kulthida Vaeteewoottacharn [1,2], Ryusho Kariya [3], Kouki Matsuda [3], Sopit Wongkham [1,2], Seiji Okada [3]

1:Dept. of Biochem., Faculty of Med., Khon Kaen Univ., Thailand 、2:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr., Khon Kaen Univ., Thailand 、3:Div. of Hematopoiesis, Ctr. for AIDS Res., Kumamoto Univ., Japan

Cimetidine is an antagonist of histamine 2 receptor which commonly used for peptic ulcer treatment. However, the anti-tumor activity of cimetidine was documented in a number of malignancies both in vitro and in vivo and has been clinically demonstrated to improve survival of colorectal cancer patients. In this study, we have demonstrated that cimetidine inhibited growth of cholangiocarcinoma (CCA) cells as dose and time dependent manner by inducing apoptosis and G0/G1-cell cycle arrest. In addition, western blotting analysis revealed that cimetidine activated caspase cascade both intrinsic and extrinsic pathways. In a CCA xenograft mice model, cimetidine significantly inhibited growth of CCA and there was no appearance of adverse effect. Taken together, this is the first report showing the growth inhibitory effect of cimetidine in CCA both in vitro and in vivo.

P-2173

High glucose level promotes progression in human cholangiocarcinoma via the induction of STAT3 pathway

Wunchana Seubwai [1,2], Charupong Saengboonmee [1,3], Sopit Wongkham [1,3]

1:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr.,Khon Kaen Univ.,Thailand.、2:Dept. of Forensic Med., Khon Kaen Univ., Thailand、3:Dept. of Biochem., Khon Kaen Univ., Thailand.

High glucose level have been reported as a risk factor in poor prognosis of several cancer patients including cholangiocarcinoma (CCA). However, the effects of high glucose level and CCA have not yet been elucidated in detail. Therefore, the present study we investigated the effects of high glucose level on proliferation and metastasis in CCA cell lines. CCA cell lines cultured in high glucose condition exerted significantly higher proliferation than those cultured in normal glucose. In addition, the adhesion, migration and invasion of CCA cell lines were increased in high glucose condition. The level of phosphorylated STAT3 and its downstream target proteins were activated in high glucose condition and the nuclear localization of STAT3 and p-STAT3 (S727) were significantly higher in CCA patients with high preoperative fasting blood glucose than those who had normal level. In conclusion, our results provide evidence that high glucose level promotes proliferation and metastasis of CCA cells via STAT3 pathway which reveal a novel therapeutic strategy for CCA patients who simultaneously suffer from either diabetes or hyperglycemia.

P-2174

5-fluorouracil treatment induced Tβ10 and ABC transporters expression in cholangiocarcinoma cells

Sopit Wongkham [1,2], Sirinapa Sribenja [1,2], Nichapavee Natthasirikul [3], Kulthida Vaeteewoottacharn [1,2], Patcharee Jearanaikoon [2,3], Chaisiri Wongkham [1,2]

1:Dept. of Biochem., Khon Kaen Univ., Thailand.、2:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr., Khon Kaen Univ., Thailand、3:Faculty of Associated Med. Sci., Khon Kaen Univ., Thailand

Cholangiocarcinoma (CCA) is a known cancer with low response to chemotherapy. 5-Fluorouracil (5-FU) is the basic chemotherapeutic drug used for chemotherapeutic treatment of CCA. Better understanding in the mechanism of 5-FU resistance may improve the efficacy of 5-FU in CCA therapy. In the current study, we shown that 5-FU treatment could induce Tβ10 expression in CCA cells in a time dependent fashion. A 5-FU resistant CCA cells exhibited high expression of Tβ10 and ABC transporters compared to the parental cells. The association of Tβ10 and ABC transporters was demonstrated as suppression of Tβ10 expression with si-RNA in the 5-FU resistant CCA cells significantly reduced the expression level of ABC transporters and increased the sensitivity of CCA cells to 5-FU. In conclusion, Tβ10 may mediate 5-FU resistance and involve with the expression of ABC transporter family in CCA. Tβ10 may serve as a candidate prognostic marker to predict responsiveness of CCA to 5-FU.This work is supported by the TRF senior Research Scholar Grant from Thailand Research Fund and Khon Kaen University to SW (RTA5780012)

P-2175

High glucose enhances O-GlcNAcylation and metastatic potentials in the high metastatic CCA cell lines

Kulthida Vaeteewoottacharn [1,3], Chatchai Phoomak [1,3], Atit Silsirivanit [1,3], Charupong Saengboonmee [1,3], Wunchana Seubwai [2,3], Sopit Wongkham [1,3]

1:Dept. of Biochem., Faculty of Med., Khon Kaen Univ.、2:Dept. of Forensic Med., Faculty of Med., Khon Kaen Univ.、3:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr., Khon Kaen Univ.

Cholangiocarcinoma (CCA), a bile duct cancer, is a deadly disease. No potential curative treatment is available except liver resection. Several approaches are investigated for a better treatment. Cancer metabolism is of our interest. Positive correlations between diabetes mellitus and CCA development and progression have been revealed; however, the mechanism is unclear. We therefore aimed to investigate roles of glucose levels on the metastasis of CCA cell lines. We compared the effects of glucose concentrations (5.6 mM vs. 25 mM) on two pairs CCA cell lines with different metastatic potentials. The results showed that high glucose promotes migrations and invasions of all CCA cell tested, but the effects were more pronounced in highly metastatic cells. These effects were related to increased global O-GlcNAcylated proteins. Increased expression of proteins in glycolysis, hexosamine biosynthesis and an epithelial to mesenchymal transition were observed. Functional significances of these alterations are currently investigated. This work is supported by the NRU-KKU Project of Thailand through SHeP-GMS (to KV, NRU572012) and the TRF senior Research Scholar Grant (to SW, RTA5780012)

P-3328

Lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma

Ubon Cha'on [1,5], Unchalee Thonsri [1,5], Wunchana Seubwai [2,5], Sakda Waraasawapati [3], Thidarut Boonmars [4], Sopit Wongkham [1,5]

1:Dept. of Biochem.、2:Dept. of Forensic Med.、3:Dept. of Path.、4:Dept. of Parasitology、5:Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Res. Ctr.

Reprogramming of energy metabolism is one of the hallmarks of cancer and it is elevated in several malignancies. Lactate dehydrogenase (LDH) is a key molecule in a final step of anaerobic glycolysis, converting pyruvate into lactate in normal cells under hypoxic condition. However, in cancer cells, pyruvate is always converted into lactate even when the present of oxygen also know as Warburg effect. We aimed to investigate the expression of LDHA in hamster- and human-CCA tissues using immunohistochemistry technique. Results indicated that LDHA expression was increased during the carcinogenesis in hamster-CCA model, including increased in human-CCA tissues. Univariate analysis indicated that LDHA expression is associated with patient's survival. Patients with high LDHA expression had shorter survival than those with low LDHA expression. Therefore, LDHA expression can be a predictor of poor prognosis in cholangiocarcinoma.

P-1166
GalNAcylated glycans specific to Sophora japonica agglutinin: Values for diagnosis and prognosis of cholangiocarcinoma

Lead Presenter：Kanlayanee Sawanyawisuth
Dept. of Biochem.

Co-author：Waraporn Saentaweesuk[1]、Atit Silsirivanit[1]、Kulthida Vaeteewoottacharn[1]、Chawalit Pairojkul[2]、Ubon Cha-on[1]、Somsiri Indramanee[1]、Somchai Pinlaor[3]、Thidarut Boonmars[3]、Sopit Wongkham[1]、Chaisiri Wongkham[1]
[1]Dept. of Biochem.

Aberrant glycosylation results in expression of glycans which are the potential biomarkers for diagnosis and monitoring of disease. We used *Sophora japonica* agglutinin (SJA) lectin which is a carbohydrate binding protein for detection of *N*-acetyl galactosamine (GalNAc) modified glycans using lectin histochemistry in cholangiocarcinoma (CCA). SJA-specific GalNAcylated-Glycan (SNAG) was undetectable in normal bile ducts but highly detected in 77.6% of precancerous lesions and 67.4% of CCA. Experimental CCA in hamsters revealed that SNAG is elevated in pathologic bile ducts. Additionally, SNAG in serum of CCA patients was significantly higher than non-CCA controls. Moreover, high level of serum SNAG indicated short survival of CCA patients. In conclusion, SNAG displays as a glyco-biomarker for diagnosis and prognosis of CCA. Association of SNAG with CCA development and its role as the early marker for CCA was suggested.
This work is co-supported by the KKU research grant (592401); Invitation research grant, Fac. of Medicine, KKU (IN58243); TRF and KKU funding through RGJ-Ph.D. Program (PHD/0021/2556) to WS and CW; and TRF Senior Research Scholar Grant (RTA5780012) to SW.

P-3287
O-GlcNAcylation promotes metastasis of cholangiocarcinoma cells via suppression of FOXO3 expression

Lead Presenter：Chatchai Phoomak
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Co-author：Atit Silsirivanit、Kanlayanee Sawanyawisuth、Kulthida Vaeteewoottacharn、Chaisiri Wongkham、Sopit Wongkham
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

O-GlcNAcylation, a reversible protein modification with an addition of a single N-acetylglucosamine (GlcNAc), is important in many cellular processes. The aberration of O-GlcNAcylation alters protein functions in many diseases including cancer. The alteration of Forkhead box protein (FOX) expression have been shown to associate with cancer progression. Here, we reported the crosstalk between O-GlcNAcylation, and FOX on promotion of cholangiocarcinoma (CCA) progression. Suppression of O-GlcNAcylation using siRNA against O-GlcNAc transferase (OGT), the enzyme that transfers GlcNAc to protein, significantly reduced CCA cell migration and invasion. Increased level of O-GlcNAcylation and decreased expression of FOXO3 were shown in highly metastatic CCA cells. Suppression of O-GlcNAcylation in siOGT treated cells significantly reduced FOXO3 expression. The linkage between FOXO3 expression and O-GlcNAcylation was shown to be through the activation of Akt and Erk signaling pathways, which consequently lower the level of FOXO3 by increasing FOXO3 degradation.

P-1175
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 regulates growth and metastasis of cholangiocarcinoma

Lead Presenter：Marutpong Detarya
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Co-author：Sriwipa Chuangchaiya[1]、Lukkana Sukprasert[2]、Atit Silsirivanit[2]、Kanlayanee Sawanyawisuth[2]、Sopit Wongkham[2]、Chaisiri Wongkham[2]
[1]Faculty of Public health, Kasetsart University SakonNakhon Province Campus, Thailand.、[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Mucin type O-glycosylation is posttranslational modification found in membrane-bound and secretory proteins. The glycan structures are initiated by transfer of N-acetylgalactosamine (GalNAc) as the first sugar to serine or threonine residue of target proteins. This reaction is catalyzed by 20 isoforms of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts). Aberrant GalNAc-Ts expression are associated with growth and metastasis of many cancers. GalNAc-associated glycans in cholangiocarcinoma (CCA) tissues were analyzed by lectin histochemistry using Vicia villosa lectin (VVL). Over-expression of VVL-binding glycans (VBG) were demonstrated in hyperplastic/dysplastic bile ducts and CCA, but not in hepatocytes and normal bile ducts. The expression of GalNAc-Ts were investigated in CCA cell lines by real-time RT-PCR. GalNAc-T5 was highly expressed in KKU-213 and KKU-214. The roles of GalNAc-T5 were examined for growth and metastasis. siGalNAc-T5 treated cells show reduction of proliferation, migration and invasion capabilities. GalNAc-T5 modified proteins associated with metastasis are under investigation.

P-1227
High CD47 expression correlates with a shorter survival and lymph node metastasis of cholangiocarcinoma subgroup

Lead Presenter：Phattarin Pothipan
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Co-author：Supawadee Bunthot[1]、Sakda Waraasawapati[2]、Kanlayanee Sawanyawisuth[3]、Kazuhiko Kuwahara[4]、Sopit Wongkham[3]、Seiji Okada[5]、Kulthida Vaeteewoottacharn[3]
[1]The National Science and Technology Development Agency, Thailand、[2]Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University, Thailand

CD47 is a transmembrane glycoprotein with well-known anti-phagocytic activity. Increased CD47 supports cancer immune evasion. An involvement of chronic inflammation and increased tumor-associated macrophage has been reported in cholangiocarcinoma (CCA), a bile duct cancer. We investigated CD47 and CD68 expressions in CCA and hepatoma (HCC) tissues. CD47 expression was categorized into low and high expressing group based on H-score. Macrophage (Mϕ) infiltration was determined by the intensity of CD68 expressing cells in cancer area. The results showed CD47 was differentially expressed in CCA but almost undetectable in HCC. In CCA subgroup, high CD47 was significantly correlated with shorter survival and lymph node metastasis of the patients. Moderate to dense Mϕ infiltration was associated with shorter survival. However, the CD47 expression is not correlated with Mϕ infiltration suggesting the non-immunological functions of CD47 in CCA. To prove that, the functions of CD47-knockout cells are under investigation. In conclusion, CD47 might play the immune, and non-immune related roles in CCA and the inhibition of CD47 might be useful for CCA treatment.

P-1239
Blocking of CD47 promotes MDM-mediated phagocytosis and suppresses the growth and metastasis of cholangiocarcinoma

Lead Presenter：Kulthida Vaeteewoottacharn
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Co-author：Kazuhiko Kuwahara[1]、Sopit Wongkham[2]、Seiji Okada[3]
[1]Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Japan、[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer of bile duct. The progression of CCA is associated with an immune response and a chronic inflammation. A CD47 receptor is commonly expressed in various cancers and serves as a protective signal for phagocytic elimination. Blocking of CD47 signaling is a new treatment strategy; however, little is known regarding CD47 in CCA. Therefore, the roles of CD47 in CCA were focused. CD47 was highly expressed in CCA cell lines. The blocking of CD47 signaling by a neutralizing antibody promoted CCA phagocytosis by all monocyte-derived macrophages (MDMs) subtypes including M1, M2 and tumor-associated macrophages. Therapeutic potential of CD47 in CCA treatment was supported by a liver metastatic mouse model. Barely detectable CCA was observed in anti-CD47 treated livers whereas increased macrophage infiltrations were demonstrated. Taken together, CD47 is commonly expressed in CCA and serves as a protective signal for phagocytic removal. Blocking of CD47 could promote phagocytosis of CCA by MDMs and suppress the tumor growth and liver metastasis in vivo. Hence, CD47 is a potential target for CCA treatment. The underlying mechanism is under investigation.

E-2072
Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a diagnostic and prognostic marker for cholangiocarcinoma

Lead Presenter：Atit Silsirivanit
Dept.Biochemistry, Fac.Medicine, Khon Kaen University,Thailand

Co-author：Siriporn Tangwiboonpanich[1]、Waraporn Saentaweesuk[2]、Samrit Kamapatte[3]、Danaipong Chetchotesak[1]、Sopit Wongkham[2]、Chaisiri Wongkham[2]
[1]Dept.Industrial Engineering, Fac.Engineering, Khon Kaen University, Thailand、[2]Dept.Biochemistry, Fac.Medicine, Khon Kaen University,Thailand

Complete blood count (CBC), a general blood parameter used in every hospitals worldwide for diagnosis and monitoring of human diseases. Ratio between neutrophil and lymphocyte (NLR) was recently reported to be a valuable prognostic indicator in many types of cancer. Our study in cholangiocarcinoma (CCA) found that NLR of CCA patients (n-108) were significantly higher than control groups (n=514, $P<0.05$), including patients with other gastro-intestinal cancers (63), benign biliary diseases (n=108) and healthy persons (n=343). Power of NLR in discriminating CCA patients from other controls was demonstrated by ROC analysis with area under curve of 0.833 ($P<0.001$), revealing the 78% sensitivity and 72% specificity at the cut-off NLR > 2.2. Moreover, CCA patients with higher NLR (>6.4) had shorter survival than those with lower NLR (<6.4). Cox regression analysis emphasized the significance of high NLR as an independent poor prognostic indicator for CCA. In conclusion, our study has demonstrated the application of simple and general blood parameter, NLR, to be a diagnostic and poor prognostic marker for CCA.

P-3107
Alpha-1, 2-fucosylated glycan promotes progression of cholangiocarcinoma via activation of Akt and Erk

Lead Presenter：Somsiri Indramanee
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Co-author：Kanlayanee Sawanyawisuth[1]、Atit Sisirivanit[1]、Paweena Dana[1]、Chatchai Phoomak[1]、Chaisiri Wongkham[1]、Seiji Okada[2]、Sopit Wongkham[1]
[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Membranous glycans play important roles in development and progression of many cancers. In this study, expression of alpha-1,2-fucosylated glycan (AFG) was determined in cholangiocarcinoma (CCA) tissues using UEA-I (an AFG-specific lectin) histochemistry. AFG was increased in hyperplasia/dysplasia and CCA, comparing with normal bile ducts. High AFG in CCA was correlated with shorter survival (Log-rank, $P < 0.05$) and can be used as a poor prognostic indicator for the patients (Cox-Regression, $P < 0.05$). In hamster model, AFG was elevated in abnormal bile ducts as early as once months and gradually increased until CCA has been developed at 6 months. Role of AFG in CCA had been explored in CCA cell lines (KKU-213 and KKU-214), suppression of surface-AFG by UEA-I masking or siRNA specific to fucosyltransferase-1 showed significant reduction of cell migration and invasion. Mesenchymal to epithelial transition (MET) was activated after AFG suppression as shown by the reduction of vimentin, slug, phosphorylated-Akt and -Erk with the elevation of E-cadherin and claudin-1. Our results suggested the roles of AFG in regulation of CCA metastasis via MET, Akt and Erk activation.

P-3118
HMGA1 correlates with metastasis and short survival of cholangiocarcinoma patients

Lead Presenter：Saowaluk Saisomboon
Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen Univ., Thailand

Co-author：Anucha Puapairoj[1]、Kulthida Vaeteewoottacharn[2]、Sopit Wongkham[2]、Kanlayanee Sawanyawisuth[2]
[1]Dept. of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen Univ., Thailand、[2]Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen Univ., Thailand

High mobility group A1 (HMGA1) is a non-histone protein which binds to AT-rich regions of DNA. It modulates the transcriptional regulation of many target genes related to cancer progression. HMGA1 is overexpressed in several cancers including cholangiocarcinoma (CCA) which is a public health problem in the Northeast Thailand. In the current study, we investigated the expression of HMGA1 in 81 human cholangiocarcinoma (CCA) tissues using immunohistochemistry technique and evaluated the HMGA1 expression with the clinico-pathological data of the patients. The result demonstrated that high expression of HMGA1 significantly correlated with metastatic status and short survival of CCA patients. Moreover, the expression level of HMGA1 in CCA was higher than those of hepatocellular carcinoma tissues (n=22). Taken together, HMGA1 may play a role in CCA metastasis and served as a differential diagnostic marker of liver cancers. The functions of HMGA1 in CCA progression is further investigation.This work is supported by the Cholangiocarcinoma Res. Inst. to SS and KS; and the TRF senior Research Scholar Grant to SW (RTA5780012).

P-3119
Heterogeneity of E-cadherin and vimentin expressing cells is essential for highly metastatic cholangiocarcinoma cells

Lead Presenter：Waraporn Saentaweesuk
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University、Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University、Department of TGB, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Co-author：Norie Araki[1]、Atit Silsirivanit[2]、Kulthida Vaeteewoottacharn[3]、Sopit Wongkham[3]、Chaisiri Wongkham[3]
[1]Department of TGB, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University、[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Metastasis is a major cause of death in cancers. Cholangiocarcinoma (CCA) is a bile duct cancer mostly diagnosed at the advance stage. The mechanism underlying metastasis is needed to be explored to improve the treatment of the patients. Epithelial-mesenchymal transition is an initial process for metastasis event. Here, overexpression of E-cadherin and vimentin were demonstrated in KKU-214L5, a highly metastatic CCA cell line, compared to its parental, KKU-214. It has been observed that KKU-214L5 composed of mixed population of E-cadherin and vimentin expressed cells. Single limiting dilution was performed to get E-cadherin-, vimentin- and mixed-expressing cells from KKU-214L5. Clones which expressed either E-cadherin or vimentin had slower growth rate than clone that expressed both proteins. However, after several sub-passages, both clones had gradually changed to be mixed population. This phenomenon is under investigation. In conclusion, the expression of E-cadherin and vimentin might be pivotal for survival of highly metastatic CCA cells.

P-3120
Deletion of CD147 gene inhibited invasion ability of cholangiocarcinoma cells by regulating monocarboxylate transporter

Lead Presenter：Paweena Dana
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand 、Cholangiocarcinoma Research Institute , Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand、Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Japan

Co-author：Kulthida Vaeteewoottacharn[1]、Seiji Okada[2]、Sopit Wongkham[1]
[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

It is a hallmark that cancer cells have high glycolytic rate and high lactic acid production, of which is exported via monocarboxylate transporters (MCT-1/MCT-4). CD147 or extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) serves as the chaperone for fully function of these MCTs. It has been shown that suppression of MCT-1/MCT-4 or CD147 expressions reduced the invasion ability of several cancer cells. This study is aimed to reveal the crosstalk between CD147 and MCTs on invasion ability of cholangiocarcinoma (CCA) cell lines. CRISPR cas-9 system was used to generate 2 CD147 knockout clones (KO-CD147) in a CCA cell line. CD147 knockout cells exhibited significantly lower invasion ability than the parental cells in three dimensional invasion assays. The expressions of MCT-1 and MCT-4, and the activities of matrix metalloproteinase (MMP) in KO-CD147 cells were markedly reduced compared with those of the parental cells. The molecular signaling under this observation was explored. Taken together, CD147 may play a significant role in promoting metastasis of CCA via regulating MCTs and MMPs actions. Hence CD147 may be a target for treatment of metastatic CCA.

6th International Translational Cancer Research Conference

Prevention and Treatment of Cancer:Hypes and Hopes

February 04-07, 2016

Organized by:
International Society of Translational Cancer Research (ISTCR)
The Gujarat Cancer & Research Institute (GCRI), The Gujarat Cancer Society (GCS)

December 01, 2015

Dear Dr. Sopit Wongkham,
Professor,Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Thank you very much for your kind consent to participate in **"6th International Translational Cancer Research Conference – Prevention and Treatment of Cancer: Hypes and Hopes"** to be held during **February 04-07, 2016 at Hyatt Regency, Ahmedabad, Gujarat, INDIA**. The key feature of this international conference is to discuss and explore translational opportunities of novel therapeutic strategies to combat cancer by active involvement of academicians, scientists and clinicians. Most importantly, this conference will make an attempt to bring together distinguished scientists around the globe and budding researchers to discuss and deliberate on the emerging trends and future prospects of prevention and treatment of cancer.

The organizing committee is well aware about your highly appreciable contribution in Cancer Research which has gained international fame for you. On behalf of organizing committee, it is our proud privilege to welcome you to the conference as **Invited Faculty.** We are extremely delighted to note that you will spare your valuable time to impart your profound knowledge as **Invited Faculty.** Your cordial presence in the conference will greatly encourage zeal and enthusiasm of young deletes and grace the conference. Your invited talk entitled, **"Multi-molecular approaches for discovery of alternative targets against metastasis of cholangiocarcinoma"** is scheduled for presentation. The Scientific Programme of the conference will be shortly uploaded on the website (www.tcr2016.com).

Please let us know for further inputs as and when needed for the conference.

We are looking forward to greet you at the conference.

Thanking you,

With best regards

Dr. Prabhudas S. Patel
Chair, Local Organizing Committee

for NGhosh
Dr. Hemangini H. Vora
Co- Chair, Local Organizing Committee

International Committee
Dr. Bharat B. Aggarwal, Dr. Varsha Gandhi, Dr. Kapil Mehta, Dr. Sen Pathak
The University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Texas, USA
Local Organizing Committee
Dr. Prabhudas S. Patel, Dr. Hemangini H. Vora, Dr. Nandita R. Ghosh,
Dr. Rakesh M. Rawal, Dr. Trupti I. Trivedi, Dr. Jayendra B. Patel, Dr. Franky D. Shah
Department of Cancer Biology, The Gujarat Cancer & Research Institute, Ahmedabad, INDIA
Conference Venue: Hyatt Regency, Ahmedabad, INDIA

Multi-Molecular Approaches for Discovery of Alternative Targets against Metastasis of Cholangiocarcinoma

Sopit Wongkham[a],
KanlayaneeSawanyawisuth[a], SumaleeObchoei[a], PaweenaDana[a],
KulthidaVaeteewoottacharn[a], Chaisiri Wongkham[a], ChawalitPairojkul[b],
Gregory J Riggins[c], NorieAraki[d], ChangyiChen[e], Seiji Okada[f]

sopit@kku.ac.th
[a]Departmentof Biochemistry, [b]Department of Pathology, Faculty of Medicine and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[c]Department of Neurosurgery, Johns Hopkins University, USA
[d]Department of Tumor genetics and Biology, Graduate school of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan
[e]Molecular Surgeon Research Center, Michael E. De Bakey Department of Surgery, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA
[f]Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

Cholangiocarcinoma (CCA) is an unusual subtype of liver cancer but is the most common fatal cancer in the northeastern Thailand.CCA is a slow growing but highly metastatic cancer which is the main cause of mortality of CCA patients. Benefit of systemic chemotherapy is limited and hence, better treatment options are required. The uniqueness of molecular signature may provide an opportunity for identifying molecular targets for therapy of CCA. To search for multi-targeted therapy for CCA, serial analysis of gene expression (SAGE) from primary tissues and metastatic nodules from a CCA patient were established. Candidate genes involvedin metastasis and with known inhibitors were selected for validation of the possibility as targeted therapy for CCA. Methionine aminopeptidase 2 (MetAP2),cyclophilin A (CypA, target product of MetAP2) and CD147 (a known receptor of CyPA) were validated as multi-targets for treatment of CCA. Immunohistochemistry demonstrated a strikingly over-expressed of these 3 proteins in CCA patient tissues. Fumagillin (MetAP2 inhibitor), cyclosporine A (CypA inhibitor) or siRNA significantly inhibited cell proliferationof CCA cell lines in vitro and in the xenograft-nude mouse model. Blocking surface CD147 orsuppression of CD147 expression using siRNA significantly reduced cell proliferation, migration and invasion of CCA cell lines. With a series of molecular studies in CCA cell lines, several new drug targets were explored. Many known drugs with clinical experiences, e.g., Fumagillin and its analogs, cyclosporine A and Metuximab, an antibody specific to CD147, are proposed as multi-targeted therapy for CCA.

Acknowledgement This work was co-supported by the Senior Research Scholar Grant to S. Wongkham, Thailand Research Fund (RTA5780012) andKhon Kaen University;S. Obchoei and P. Dana were supported under the Royal Golden Jubilee PhD Program, Thailand Research Fund to S. Wongkham.

Sopit Wongkham

เรื่อง การวิจัยเพื่อค้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีเพื่อการตรวจคัดกรอง วินิจฉัยและพยากรณ์โรค

โดย ศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ และคณะ

e-mail: sopit@kku.ac.th

การที่ประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตของประชากรจากมะเร็งท่อน้ำดีสูง ส่วนหนึ่งเกิดจากการขาดตัวบ่งชี้ชีวภาพที่บอกภาวะของมะเร็งท่อน้ำดี ทั้งในระดับการตรวจคัดกรองเพื่อบอกความเสี่ยง การวินิจฉัยเพื่อยืนยัน การพยากรณ์โรคเพื่อเลือกแนวทางการรักษาที่เหมาะสม การเกิดเป็นซ้ำเพื่อรับการรักษาได้ทันท่วงที และการสนองตอบต่อยาเพื่อเลือกยาที่มีประสิทธิผล ตัวบ่งชี้ชีวภาพเหล่านี้มักตรวจหาได้ในสิ่งส่งตรวจที่สามารถนำมาทดสอบได้โดยไม่มีความเสี่ยงเช่น ซีรัม ปัสสาวะ อุจจาระ และเม็ดเลือดขาว การตรวจตัวบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งโดยทั่วไปมีราคาถูก ดำเนินการวิเคราะห์ได้ง่าย ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ และให้ผลตรวจเร็ว ปัจจุบัน ยังไม่มีตัวบ่งชี้ชีวภาพต่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ความจำเพาะและความไวเพื่อการวินิจฉัยอย่างที่พอใจ ส่วนหนึ่งเกิดจากธรรมชาติของมะเร็งท่อน้ำดี ที่มีความหลากหลายและแตกต่างกันทั้งทางกายวิภาคและจุลภาค ดังนั้นตัวบ่งชี้ชีวภาพเพียงชนิดเดียวจึงมิอาจใช้บ่งบอกภาวะมะเร็งที่ครอบคลุมมะเร็งท่อน้ำดีทุกชนิด การใช้ตัวบ่งชี้ชีวภาพหลากหลายที่แสดงตัวตนหรืออัตลักษณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีในภาพรวม จึงเป็นกลยุทธ์ที่นักวิจัยควรได้พิจารณาเพื่อระบุภาวะมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยต่างสถานะได้อย่างครอบคลุม นอกจากนี้การใช้ตัวบ่งชี้ชีวภาพหลากหลายประเภททั้งระดับโปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ รวมทั้งเมแทบอไลท์อย่างเต็มรูปแบบจะเพิ่มความจำเพาะและความไวในการตรวจหาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในแต่ละระยะได้ การแสวงหาตัวบ่งชี้ชีวภาพในหนูแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งแล้วตรวจสอบกลับในตัวอย่างจากผู้ป่วย หรือในทางตรงข้ามการแสวงหาตัวบ่งชี้ชีวภาพในผู้ป่วยแล้วตรวจสอบกลับในหนูทดลองเพื่อให้ทราบระยะของการตรวจพบ เป็นข้อได้เปรียบของการวิจัยตัวบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งชนิดนี้ จากประสบการณ์การวิจัยตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีมากว่า 20 ปี คิดว่าน่าจะถึงเวลาแล้วที่จะทำการศึกษาหาตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีในภาพรวมอย่างจริงจัง เพื่อให้ได้ตัวบ่งชี้ชีวภาพที่เป็นอัตลักษณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี และเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งต้องได้รับความร่วมมือจากนักวิจัยที่มีความชำนาญหลากหลายสาขา การตรวจวัดในตัวอย่างจำนวนมากทั้งกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและกลุ่มควบคุมที่ต้องมีความหลากหลายเสมือนภาวะจริง การวิเคราะห์ผลที่ใช้ข้อมูลหลายมิติเพื่อหาความเหมือนและความแตกต่าง รวมทั้งการรวบรวมตัวอย่างชีวภาพที่มีคุณภาพพร้อมด้วยข้อมูลทางคลินิกที่สมบูรณ์

Kulthida Vaeteewoottacharn, Ph.D. M.D.
e-mail: kulthidava@kku.ac.th

Pathology of Cholangiocarcinoma;
From the basic researches toward the clinics

Kulthida Vaeteewoottacharn[*,1,5], Sopit Wongkham[1,5], Thidarat Boonmars[2,5], Puangrat Yongvanit[1,5], Chawalit Pairojkul[3,5], Vajarabhongsa Bhudhisawasdi[4,5]

[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Parasitology, [3]Department of Pathology, [4]Department of Surgery, [5]Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 4002, Thailand

Cholangiocarcinoma (CCA) is a tumor arising from the biliary tree of liver. It is a rare cancer worldwide but the incidence is highest in Thailand. CCA in this area has the unique etiology arising from a parasitic infection. Previous comparative studies have demonstrated typical gene expression profile and histological features. CCA is a slow growing tumor but early diagnosis is problematic due to lack of specific symptoms and no effective tools. Most of patients are not candidates for curative surgery and adjuvant therapy does not improve patient survival. Therefore, understanding of natural history of the disease is needed to find the targets for the effective treatments. The knowledge regarding the epidemiology, characteristics and molecular pathobiology of the liver-fluke associated CCA undertaken in our institution will be presented.

CCA is classified as a type of liver cancer. CCA accounts for 10-20% of liver tumors worldwide. In Thailand, the incidence of CCA is regionally varied. The highest incidence was reported in Northeastern part of the country. It is reported to be more than 90% of all liver cancers in this area. Many risk factors of CCA have been identified. Unlike developed countries where chronic cholangitis, cirrhosis and hepatitis C virus infection are established risk factors for CCA, a major risk factor for CCA in Thailand is parasitic, liver fluke (*Opisthorchis viverrini*, *Ov*), infection. Having uncooked fresh water fish harboring the infective stage of *Ov* is the usual cause of infection. *Ov* migrates from intestine to bile duct and resides there. Long standing infection of *Ov* causes chronic irritation and chronic inflammation of bile duct epithelia and cellular responses such as epithelial hyperplasia. However, the direct pathogenic and carcinogenic actions of *Ov* on bile duct epithelia are obscure. The detection of damaged DNA, both oxidative and ethano-bridge isoforms, in *Ov* infected patient sera and urine as well as in the animal model of *Ov*-induced CCA suggests that inflammation is related to the DNA damage in CCA development. Hence, anti-oxidative agents directed at *Ov*-related inflammation might be useful as chemo-preventive drugs for cholangio-carcinogenesis. Further studies in multiple steps of tumor development are required to understand the underlying mechanism and to find targets for cancer prevention.

On the other hand, several attempts using tumor tissues and cell lines derived from the *Ov*-infected CCA patients have identified multiple targets for cancer treatment. Molecular alterations associated with CCA have been detected by using high-throughput approaches. The uniqueness of molecular profiling identified by multiple approaches, e.g., SAGE, exome sequencing, transcriptomics/proteomics profiles, protein kinase profile, etc., provide the opportunity for treatment of liver fluke-associated CCA. Anti-inflammatory, immunomodulator/immunosuppressor, EGFR or PDGFR inhibitors, multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, IL6 antagonist, NF-κB inhibitor, histone modulator, proteasome inhibitor as well as specific inhibitors suggested from various study approaches, such as MetAP2 inhibitor, 1,25(OH)2D3 and cyclosporine A are suggested for the treatments of CCA. This might provide an alternative therapeutic option for CCA; however, clinical trials are required.

In summary, CCA is the predominant liver cancer in the Northeastern part of Thailand. With a parasitic-induced inflammation as the apparent cause, this cancer has behaved differently from CCA from other causes. The molecular studies in the carcinogenesis process have provided promising targets for CCA prevention and treatment. Further *in vivo* studies and clinical trials are needed to ensure the effectiveness of therapies and safety. Improvements of patient survival and quality of life are our primary targets.

Dr. Kulthida Vaeteewoottacharn is currently a member of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center and the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. She has published >25 articles in the international journals.

Seminar: Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research

High glucose levels potentiates the metastatic potential of highly metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation

Speaker:
Dr. Kulthida Vaeteewoottacharn

Assistant Professor, Department of Biochemistry and
Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Date : 2 June, 2017 (Fri) 8:30-9:30
Venue: 2F Seminar room, Center for AIDS Research

Abstract: Increased glucose utilization is an important characteristic of cancer cells to support cell survival, and metastasis. An association between diabetes mellitus and cancer progression was demonstrated in cancers including cholangiocarcinoma (CCA). We have previously reported the high glucose promoted CCA proliferation; however, the effects of glucose on CCA migration and invasion were still unclear. Two pairs of the parental (low metastasis) and high metastatic CCA sublines were cultured in normal (NG; 5.6 mM) or high (HG; 25 mM) glucose media. The migration and invasion abilities were determined and the underlying mechanisms were explored. The results revealed that HG promoted migration and invasion of CCA cells with more pronounced in the high metastatic sublines. Concomitantly, HG increased global O-GlcNAcylated proteins (OGP), and the expressions of vimentin. The mechanism was shown to be HG promoted the induction of glucosaminefructose-6phosphate amidotransferase (GFAT) expression and vimentin stability. Treatment with a GFAT inhibitor reduced global O-GlcNAcylated proteins and vimentin expression together with the reduction of cell migration. Altogether, these results suggested the role of high glucose enhanced CCA migration by modulation of O-GlcNAcylation, through GFAT expression and vimentin stability.

For more details, please contact to:
Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research,
TEL: 096-373-6522
E-mail: okadas@kumamoto-u.ac.jp