

Abstract

Project code: TRG4780006

Project Title: Involvement of c-Met/ hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for c-Met

Investigator: Dr.Kawin Leelawat

Department of Surgery Rajavithi Hospital

Tel. 662-354-8080, Fax.662-354-8080

E-mail: kawin_leelawat@hotmail.com

Mentor: Prof. Dr.Prasert Sobhon

Department of Anatomy Faculty of Science

Mahidol University

E-mail: scpso@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Hepatocyte growth factor receptor (c-Met) plays an important role in many functions of cancer cells. We examined the roles of c-Met and its downstream signaling molecules in cholangiocarcinoma cell lines RMCCA1 and HuCCA1.

The expression of c-Met and its signaling cascade were determined in RMCCA1 and HuCCA1 cholangiocarcinoma cell lines by Western blotting. Small interfering RNA (siRNA) specific for c-Met was used to suppress the expression of c-Met. The proliferation, migration and invasion assay were tested in these cholangiocarcinoma cells treated with hepatocyte growth factor (HGF).

Activation of c-Met with HGF triggered the signaling via the ERK cascade mediated by sequential phosphorylation of MEK1/2 and MAPK and induction of cholangiocarcinoma cell invasion. The expression of c-Met in cholangiocarcinoma cells was suppressed by treatment with small interfering RNA (siRNA) specific for c-Met, and resulted in decrease in phosphorylation of MEK1/2. Furthermore, treatment with siRNA specific for c-Met or MEK inhibitor U0126 inhibited cholangiocarcinoma cell invasion induced by HGF.

These results indicated that HGF and c-Met involved in the mechanism of cholangiocarcinoma cell invasion. It implies a potential role for the inhibition of c-Met in the treatment of cholangiocarcinoma.

Keywords: cholangiocarcinoma; c-Met; migration; invasion; MEK1/2

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4780006

ชื่อโครงการ: ผลของ c-Met / hepatocyte growth factor ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี และการใช้ siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met เพื่อยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

ชื่อนักวิจัย : ดร.นพ.กวิญ ลีละวัฒน์
งานศัลยศาสตร์ทั่วไป กลุ่มงานศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี
ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์: 02-354-8080, โทรสาร 02-354-8080
e-mail: kawin_leelawat@hotmail.com

ชื่อที่ปรึกษา : ศ.ดร. ประเสริฐ โศภณ
สำนักคณบดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระรามหก กรุงเทพฯ
โทรศัพท์: 02-245-5198
e-mail: scps@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

โรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma) เป็นโรคมะเร็งที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตสูง โดยเฉพาะในประเทศไทย เนื่องมาจากผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อีกมีการกระจายหลังลุกลามของโรคไปสู่อวัยวะอื่นแล้ว อีกทั้งโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีมีวิธีการรักษาให้หายขาดเพียงวิธีเดียวนั่นคือการผ่าตัด ในปัจจุบันยังไม่มีเคมีบำบัดที่ได้ผลเมื่อผู้ป่วยมารักษาในขณะที่โรคลุกลามแล้วจึงไม่สามารถผ่าตัดรักษาได้ ดังนั้น การศึกษาหาวิธียับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง Hapatocyte growth factor receptor (c-Met) เป็นตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะต่อ Hepatocyte growth factor (HGF) ซึ่ง HGF และ c-Met มีบทบาทสำคัญต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ดังนั้นในการวิจัยจึงศึกษาบทบาทของ HGF ต่อ c-Met และสัญญาณโมเลกุล ที่เกิดจากการกระตุ้น c-Met ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี (RMCCA 1 และ HuCCA 1)

การแสดงออกของ c-Met ใน RMCCA1 และ HuCCA1 จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting ทำการยับยั้งการแสดงออกของ c-Met ด้วยวิธีการใช้ small interfering RNA (siRNA) และยับยั้งสัญญาณโมเลกุล MEK $\frac{1}{2}$ ด้วย MEK inhibitor (U0126) ทำการศึกษาสภาวะที่กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิด metastasis ได้แก่ Proliferation, migration และ invasion ด้วย HGF ศึกษาการเกิด Actin Polymerization ในเซลล์ RMCCA1 และ HuCCA1 ด้วยการย้อมด้วย Phalloidin Alexaflur วิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Laser capture confocal scanning microscopy

จากการศึกษาในระดับ RNA โดยใช้วิธี real time RT-PCR และศึกษาระดับโปรตีนด้วยวิธี Western Blotting สามารถตรวจพบการแสดงออกของ c-Met ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี การกระตุ้น c-Met ด้วย HGF ทำให้เกิดกระบวนการ Phosphorylation ของ MEK $\frac{1}{2}$ และ MAPK ซึ่งจะชักนำให้เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีเพิ่มการ Invasion แต่ไม่มีผลต่อกระบวนการ Proliferation และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ c-Met ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met พบว่าการกระตุ้นเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีด้วย HGF ทำให้การเกิด phosphorylation ของ MEK $\frac{1}{2}$ จะลดลง การเกิด Invasion ก็ลดลงเช่นเดียวกัน และเมื่อยับยั้ง MEK $\frac{1}{2}$ ด้วย U0126 ก็ได้ผลเช่นเดียวกับการใช้ c-met siRNA คือจะลดการเกิด invasion ของเซลล์มะเร็งสำหรับการเกิด action polymerization หรือ F-actin เมื่อกระตุ้นเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีด้วย HGF มีผลให้ actin polymerization เพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยมีการเกิด pseudopodia ขึ้น ในขณะที่ให้ siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met หรือใช้ U0126 มีผลให้ actin polymerization ลดลง

จากผลการทดลองพบว่า HGF มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น Phosphorylation ของ c-met ในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่ศึกษา ซึ่ง HGF จะกระตุ้น c-met โดยไปเพิ่มกระบวนการ phosphorylation ของ MEK $\frac{1}{2}$ และการเกิด Actin Polymerization ทำให้เซลล์นั้น ๆ มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้เซลล์ที่ได้รับ HGF มีการเพิ่มความสามารถในการลุกลามยิ่งขึ้น (cell invasion) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของ c-met siRNA หรือ MEK $\frac{1}{2}$ inhibitor (U0126) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ c-met ได้ ซึ่งจะไปทำให้กระบวนการ phosphorylation ของ MEK $\frac{1}{2}$ และ Actin Polymerization ลดลง ทำให้ cell invasion ลดลงเช่นกัน แต่ทั้งหมดนี้ HGF ไม่มีผลต่อ (Proliferation) ของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี (RMCCA1 และ HuCCA1) การค้นพบนี้ น่าจะเป็นแนวทางการรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีต่อไปในอนาคต