



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

เรื่อง "ผลของ c-Met / hepatocyte growth factor
ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีและการใช้ siRNA
ที่จำเพาะต่อ c-Met เพื่อยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี"

โดย ดร.นพ.กวิญ สีสะวัฒน์ และคณะ

มิถุนายน 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

เรื่อง "ผลของ c-Met / hepatocyte growth factor

ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีและการใช้ siRNA

ที่จำเพาะต่อ c-Met เพื่อยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี"

คณะผู้วิจัย

- ดร.นพ.กวิญ สีสะวัฒน์ ภาควิชาศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี
- ศ.ดร.ประเสริฐ โสภณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

1. ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนวิจัยให้กับโครงการนี้
2. ขอขอบคุณ อาจารย์ประเสริฐ โสภณ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาในการวิจัยโครงการนี้
3. ขอขอบคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ในภาควิชาศัลยศาสตร์
โรงพยาบาลราชวิถี ที่กรุณาสับสนุนในการทำโครงการวิจัยนี้
4. โครงการวิจัยนี้ได้รับรางวัลดังต่อไปนี้

- ACS AWARD FOR ORAL PRESENTATION, ANNUAL MEETING OF
ROYAL COLLEGE OF SURGEONS OF THAILAND 2005
- BEST ORAL PRESENTATION, ANNUAL MEETING OF NATIONAL
CANCER INSTITUTE OF THAILAND 2005

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 Anotomy 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
งานตลยศาสตร์ทั่วไป กลุ่มงานตลยศาสตร์ 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 เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้นักมีการกระจายหลังลุกลามของโรคไปสู่วัยวะอื่นแล้ว 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 ½ 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 และศึกษาในระดับโปรตีนด้วยวิธี 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

เนื้อหางานวิจัย

Introduction

จากข้อมูลสถิติทั่วประเทศของกระทรวงสาธารณสุขในปี พ.ศ. 2544 มีผู้เสียชีวิตจำนวน 359,493 คน ในจำนวนผู้เสียชีวิตทั้งหมดนี้โรคมะเร็งทุกชนิดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับที่ 1 สูงถึง 42,497 คน สาเหตุอันดับรองลงไปได้แก่ อุบัติเหตุและโรคหัวใจโรคมะเร็งตับ และทางเดินน้ำดีในตับเป็นโรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตสูงสุด โดยมีอัตราตายต่อประชากร 100,000 คน เท่ากับ 16.7 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งทางน้ำดีในตับมากกว่าภาคอื่นๆถึง 12 เท่า มีหลักฐานทางระบาดวิทยาที่พบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งทางเดินน้ำดีในคน มีการประมาณว่าประชากรของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 7 ล้านคนติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับนี้ ความชุกของพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* ใน 17 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีอยู่ตั้งแต่ 8 ถึง 70% การรับประทานอาหารท้องถิ่นประเภทปลาร้า ปลาซึ่ม ก้อยปลา อาหารปรุงไม่สุกที่ทำจากปลาน้ำจืดในกลุ่ม *Cyprinidae* family ทำให้ได้รับพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* เนื่องจากปลาชนิดนี้เป็น intermediate host ของพยาธิใบไม้ในตับตัวอ่อนของ *Opisthorchis viverrini* จะออกมาในลำไส้เล็กส่วนต้น(duodenum) เดินทางเข้าสู่ระบบทางเดินน้ำดีทาง ampulla of Vater พยาธิตัวแก่จะวางไข่ในทางเดินน้ำดีและอาจถูกขับออกมาในอุจจาระ ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการถ้าไม่มีอาการอุดตันหรือติดเชื้ทางเดินน้ำดี พยาธิกำเนิดของมะเร็งทางเดินน้ำดีในตับจากพยาธิ *Opisthorchis viverrini* เป็นทั้งจาก mechanical และ chemical irritation การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิของมะเร็งทางเดินน้ำดีในตับเริ่มจากการอักเสบเรื้อรังของผนังทางเดินน้ำดี (inflammation and epithelial desquamation) ต่อมาผนังทางเดินน้ำดีมีการหนาตัวหรือเกิด epidermal และ adenomatous

hyperplasia และ periductal fibrosis การเกิด atypical hyperplasia และ dysplasia นี้พบในเนื้อตับตำแหน่งที่ติดกับมะเร็งทางเดินน้ำดีและพบว่าเป็น precursor lesions ของมะเร็งทางเดินน้ำดีทั้งที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Opisthorchis viverrini* และจากสาเหตุอื่นๆ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของสาร endogenous N-nitroso compounds จากกระบวนการของ nitric oxide synthase โดยการกระตุ้นของ *Opisthorchis viverrini* และการบริโภค exogenous N-nitroso compounds ในอาหารหมักต้องถูกพบว่ามีบทบาทส่งเสริมการเกิดมะเร็งทางเดินน้ำดีในตับโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีในต่างประเทศพบมากถึง 6-11% ของผู้ป่วยโรค primary sclerosing cholangitis การศึกษาในต่างประเทศพบว่ากลไกการชักนำให้เกิดมะเร็งทางเดินน้ำดีนอกจากจะมีการเพิ่มขึ้นของ N-nitroso compounds แล้ว การที่ oncogenes บางตัวเช่น K-ras, c-myc, c-neu, c-erb-b2 และ c-met ถูกกระตุ้น, tumor suppressor genes เช่น p-53 และ bcl-2 ลดการทำงาน, การเปลี่ยนแปลงของ Fas ligand system ซึ่งเป็นระบบควบคุม apoptosis, และ cell cycle regulators เช่น cyclin D1 และ p27Kip1 ร่วมกันมีบทบาทในการเกิดมะเร็งทางเดินน้ำดี การศึกษาจากกลไกการเกิดโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีในประเทศไทยพบความชุกของ K-ras และ p53 mutation ต่ำกว่ารายงานจากต่างประเทศโดยไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน การศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่า Over expression ของ COX-2 อาจมีความผิดปกติขั้นต้นของการเกิดมะเร็งทางเดินน้ำดี

อาการแรกเริ่มของผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีในตับ ได้แก่ อาการที่เกิดจากทางเดินน้ำดีอุดตัน เหลือง ปวดท้อง น้ำหนักลด มีไข้ มะเร็งทางเดินน้ำดีตับอาจแบ่งตามลักษณะของมะเร็งเป็น intrahepatic cholangiocarcinoma และ extrahepatic cholangiocarcinoma. Intrahepatic cholangiocarcinoma ยังแบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ Peripheral type (I), intermediate type (II), central type (III) และ diffuse type (IV)

Hepatocyte growth factor (HGF) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ scatter factor ถูกค้นพบและ clone ขึ้นมาเมื่อ 15 ปีก่อน ต่อมานักวิทยาศาสตร์พบว่า HGF มีบทบาทสำคัญในโรคมะเร็ง HGF มี receptor ที่จำเพาะคือ c-Met เป็น receptor ในกลุ่ม Tyrosine kinase receptor การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า HGF กระตุ้นการ invasion ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ผ่านกระบวนการ migration, การ adhesion กับ matrix และ endothelium cell และที่สำคัญคือการแสดงออกของ proteolytic enzyme หลายชนิดเช่น MMP2, MMP9 และ uPA นักวิทยาศาสตร์พบว่ากระบวนการ invasion ของเซลล์ โดย HGF ขึ้นกับ การทำงานร่วมกันระหว่าง c-Met และ $\alpha 6 \beta 4$ integrin ถ้าเซลล์สูญเสียการ แสดงออกของ $\alpha 6 \beta 4$ integrin จะมีผลให้เซลล์ไม่ตอบสนองต่อ HGF การกระตุ้น c-Met จะชักนำให้ integrin เกิด phosphorylation ทำให้เกิดการกระตุ้น Shc และ PI3K ซึ่งเป็นผลให้โมเลกุลต่างๆ ใน PI3K pathway ถูกกระตุ้นต่อไป

HGF ส่วนใหญ่ สร้างจากเซลล์ fibroblast และ fat cell ปัจจุบันยังพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถสร้าง HGF ได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งมะเร็งหลายชนิดสร้างสภาพแวดล้อมที่มีลักษณะการเกิดการอักเสบซึ่งเมื่อเกิดการอักเสบขึ้นในเนื้อเยื่อ neutrophils จะเข้ามาจับบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ ขึ้น จากนั้น neutrophils จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้าง HGF ทำให้เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการ หลุดลามเพิ่มขึ้น การค้นพบนี้เป็นที่น่าสนใจมากเนื่องจากโรคมะเร็งหลายชนิดมักมีลักษณะการ อักเสบร่วม (inflammatory type of tumor cells) ซึ่งมีการ infiltrating ของ immune cells (เช่น lymphocytes, polymorphonuclear cells และเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ) เซลล์เหล่านี้อาจเป็นแหล่ง สำคัญในการสร้าง HGF แก่เซลล์มะเร็งได้

ระเบียบวิธีทดลอง

Cell Culture

ใช้เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ชนิด HaCCA1 และ RMCCA1 (Rajavithi – Mahidol Cholangiocarcinoma Cell line 1) ซึ่งถูก established โดยภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เนื้อเยื่อมะเร็งทางเดินน้ำดีที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีที่ได้จากผู้ป่วย ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลราชวิถี เซลล์มะเร็งจะถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Ham's F12 ซึ่งมี Fetal bovine serum เป็นส่วนประกอบอยู่ 10% ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C มี CO₂ เป็นส่วนประกอบของอากาศอยู่ 5%

วัสดุและอุปกรณ์

- Ham's F12 และ fetal bovine serum ถูกซื้อจาก Gibco, Grand Island, NY USA
- Recombinant HGF ถูกซื้อจาก Becton Dickinson, Franklin lakes, NJ, USA
- Antibody; Anti-c-Met, anti-MEK ½, anti-Phospho-MEK ½ (Ser 217/221) anti-MAPK, anti-Phospho-MAPK และ HRP ² Antibody ถูกซื้อจาก Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
- 24-well Biocoat Matrigel invasion chamber (8µm) ถูกซื้อจาก Becton Dickinson, Franklin, NJ, USA
- Stealth small interfering RNA duplex ที่จำเพาะต่อ c-Met (NCBI Ref Seg NM_000245) ถูกสั่งทำจาก Invitrogen, Carlsbad, CA

Small interfering RNA (siRNA) for inhibition of c-Met expression

Stealth small interfering RNA (siRNA) duplex oligonucleotides ที่จำเพาะต่อ c-Met (NCBI Ref Seg NM_000245) ถูกออกแบบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของ Invitrogen โดยมีลำดับเบสดังนี้

- (i) MET-HSS106477 sense 5'-UUAACAGCAAACUCAGUUGAAAUGG-3', antisense 5'-CCAUUUCAAACUGAGUUUGCUGUUA-3',
- (ii) MET-HSS106478 sense 5'-UGAAUUAGGAAACUGAUCUCCGGA-3', antisense 5'-UCCAGAAGAUC AGUUUCCUAAUUCA-3',
- (iii) MET-HSS106479 sense 5'-AAAUCUUUCAUGAUGA UUCCCUCGG-3', antisense 5'-CCGAGGGAAUCAUGAAAGAUUU-3'

siRNA จะถูก transfect เข้าเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีโดยใช้ BLOCK-iT transfection kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) โดยใช้ BLOCK-iT fluorescent oligo ที่ไม่เป็น homologous กับ gene ใดๆ ในมนุษย์ เป็น negative control เพื่อความแน่ใจว่าจะไม่เกิด nonspecific inhibition ขึ้น

ในจำนวน 3 siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met จะถูกเลือกมาเพียง 1 siRNA ที่มีความสามารถยับยั้ง c-Met ได้มากที่สุด โดยเซลล์มะเร็งที่ถูก tranfect ด้วย siRNA จะลดการแสดงออกของ c-Met ได้มากที่สุดภายหลังจากที่ transfect siRNA ไปแล้ว 24-48 ชม.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA จะถูกแยกจากเซลล์มะเร็งโดยใช้ RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Quantitative realtime RT-PCR โดยใช้ Quantitect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, USA) โดยผสมเข้ากับ standard PCR reaction mixture โดยใช้ Primers คือ

- 1. c-Met: forward primer 5'-ACAGTGGCAT GTCAACATCGCT-3'
c-Met reverse primer 5'-GCTCGGTACTCTACA GATTC-3'
- 2. GAPDH: forward primer 5'-TCCATGACAACTTTGGTATCG-3'

GAPDH: reverse primer 5'-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGA-3'

การ Amplification และ Detection ทำโดยเครื่อง BIO-RAD iCycler iQ system (BioRad, Hercules, CA, USA) ซึ่ง Fluorescence threshold จะถูกคำนวณด้วย program ของ iCycler iQ system โดย conditions ของ PCR คือ 20 นาที ที่ 50°C แล้วตามด้วย 42 cycling steps ของการ amplification คือ 15 วินาที ที่ 94°C 30 วินาที ที่ 60°C และ 30 วินาที ที่ 72°C โดยการวัด single fluorescence จะทำทุกครั้งของ extension step และสุดท้ายวิเคราะห์ melting curve เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ amplified products

ปริมาณ PCR Product จะถูกคำนวณโดยใช้ standard curve ที่ได้จาก serial dilution ของ positive controls สำหรับ GAPDH และ c-Met

Western Blot Analysis

เซลล์มะเร็งจำนวน 5×10^5 เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหาร Ham's F12 ที่มี fetal bovine serum 10% ในแต่ละ well ของ 6-well plate เป็นเวลา 1 วัน แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารที่ไม่มี fetal bovine serum โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย HGF 100 ng/ml โดย incubate ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C และมี CO₂ 5% แล้วจึงเก็บโปรตีนจาก Crude cell extract มาวิเคราะห์ด้วย Western blot โดย Antibody ที่จำเพาะต่อ c-Met, Phospho-MEK ½, MEK ½, MAPK และ Phospho-MAPK ที่ dilute ด้วยอัตราส่วน 1:1000 โดย incubate ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C และตรวจสัญญาณ antibody-antigen complex จะใช้ 2' Antibody HRP Conjugate โดย incubate ไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้ Chemiluminescent detection จับสัญญาณบนแผ่น x-ray

Cell Proliferation Assay

เซลล์มะเร็งจำนวน 1×10^4 เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหาร Ham's F12 ที่มี fetal bovine serum 1% ในแต่ละ well ของ 96-well plate เป็นเวลา 1 วัน โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 well คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ 1 เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย HGF 100 ng/ml กลุ่มทดลองที่ 2 เซลล์จะถูกเติม U0126 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการเติม HGF เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย HGF 100 ng/ml สำหรับ MEK inhibition study ทุกกลุ่มจะ incubate ไว้ 24 ชั่วโมง ในตู้บัพ 37 °C และมี CO₂ 5% เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจ cell proliferation ด้วยการเติม WST-1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm.

Cell migration assay และ Cell invasion assay

Migration assay ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี จะถูกตรวจใน Transwell ที่มี Filter ขนาด 8 μ m เซลล์มะเร็งจำนวน 5×10^4 เซลล์จะถูกเติมใน upper chamber และเติม HGF 100 ng/ml ลงใน lower chamber จากนั้น incubate ในตู้บัพเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาย้อมด้วย hematoxylin & Eosin แล้วนับเซลล์ที่ migrate แล้วนับ 5 fields ที่ 400x power fields ของกล้องจุลทรรศน์

สำหรับ invasion assay เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี 5×10^4 เซลล์ จะถูกเติมใน upper chamber ของ 24-well Biocoat Matrigel invasion chamber ที่มี Filter ขนาด 8 μ m และเติม HGF ลงใน lower chamber จากนั้น incubate ในตู้บัพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจเซลล์ที่ invade ผ่าน matrigel-coated membrane ด้วยการย้อม hematoxylin & Eosin แล้วนับ 5 fields ที่ 400x power fields ของกล้องจุลทรรศน์

การตรวจ actin Polymerization

เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีที่ถูก Treated ด้วย control oligonucleotide และ siRNA จะถูก seed ลงบน coverslips แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม HGF ลงไป และ incubate ต่ออีก 4 hr นำเซลล์มา fix ด้วย 4% paraformaldehyde, permeabilized ด้วย 1% Triton x-100, Block ด้วย 1% BSA จากนั้นเติม Alexa flwor 488 phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) อีก 30 นาที นำเซลล์มาตรวจด้วย laser capture confocal microscope

การตรวจ gene expression profiles

เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีถูกเลี้ยงใน 6-cm well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม HGF และเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาแยก RNA แล้วนำมาตรวจหา gene expression profile ด้วย Oligonucleotide microarray ซึ่งมี gene ที่ถูก coat บน slide จำนวน 20,000 gene เฉพาะ gene ที่ up-regulate หรือ down-regulate มากกว่า 2 เท่าจึงจะนำมาตรวจวิเคราะห์

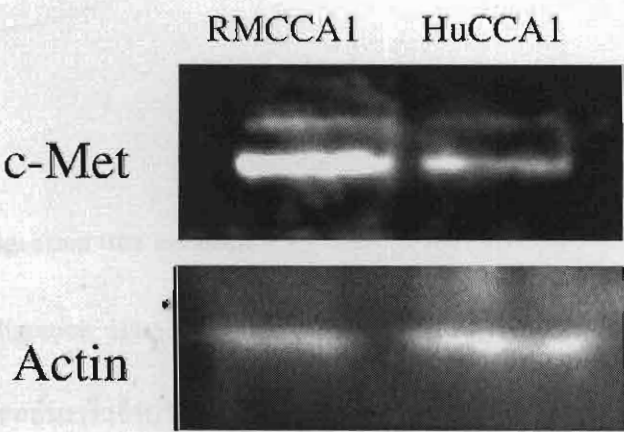
Statistical analysis

การทดลองจะถูกทำซ้ำ 3 ครั้ง จึงจะถูกนำมาตรวจสอบโดยแสดงค่าในรูป Mean และ S.D. สถิติ student's t-test จะถูกใช้เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยมีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

การแสดงออกของ c-Met ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

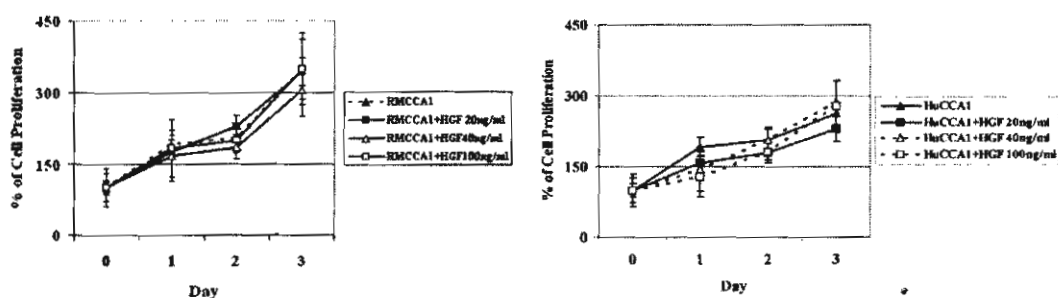
การศึกษาการแสดงออกของ c-Met ใน RMCCA1 และ HuCCA1 ถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยการทำ Real-Time RT-PCR พบว่าเซลล์มะเร็งทั้งคู่มีการแสดงออกของ c-Met ในระดับ RNA และระดับ Protein ถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี western blot โดยเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด จำนวน 5×10^5 จะถูกเลี้ยงใน 6-well plate แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมที่เซลล์มะเร็งไม่ถูกกระตุ้นด้วย HGF และกลุ่มทดลองเซลล์มะเร็งจะถูกกระตุ้นด้วย HGF 100 ng/ml หลังจากนั้นจะเก็บโปรตีนมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี western blot โดยใช้ 1^o antibody คือ P-MEK, P-MAPK, MEK และ MAPK และตรวจสัญญาณ antibody-antigen complex จะใช้ 2^o Antibody HRP Conjugate แล้วใช้ chemiluminescent detection จับสัญญาณบนแผ่น X-ray (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การแสดงออกของ c-Met ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี RMCCA1 และ HuCCA1
เซลล์ถูกเลี้ยงใน media ชนิด HAM'S F12 เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเซลล์มาย่อยเอาโปรตีน
ตรวจหา c-Met ด้วยวิธี Western blot

ผลของ HGF ต่อการเกิด Proliferation ของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

เนื่องจากการกระตุ้น c-Met ด้วย HGF ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ cell proliferation ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด การศึกษานี้จึงทำเพื่อดูบทบาทของ HGF ต่อการเกิด proliferation ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ผลการทดลองพบว่า การใช้ HGF ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 100 ng/ml ไม่มีผลต่อการเกิด Proliferation ของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี เมื่อเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลา 1-3 วัน(รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของ HGF ต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี เซลล์ถูกเลี้ยงใน HGF

ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเซลล์ Proliferation assay ถูกตรวจด้วย

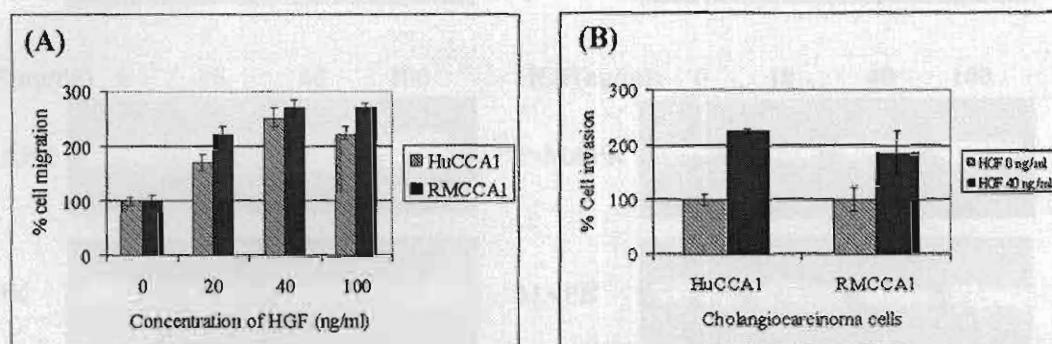
วิธี WST-1

ผลของ HGF ต่อ Cell migration และ invasion

จากการศึกษา Migration assay ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี จะถูกตรวจใน Transwell ที่มี Filter ขนาด 8 μm โดยเซลล์มะเร็งจำนวน 5×10^4 เซลล์ จะถูกเติมลงไปใน upper chamber และในกลุ่มทดลองที่เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย HGF 100 ng/ml นั้น HGF จะถูกเติมลงใน lower chamber จากนั้น incubate ในตู้อบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาย้อมด้วย hematoxylin & Eosin แล้วนับเซลล์ที่ migrate แล้วนับ 5 fields ที่ 400x power fields ของกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีด้วย HGF ขนาด 0, 20, 40 และ 100 ng/ml เซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด มีการเกิด

migration เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ที่ความเข้มข้นของ HGF 40 ng/ml เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย HGF (รูปที่ 3A)

สำหรับการศึกษา invasion assay เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี 5×10^4 เซลล์ จะถูกเติมใน upper chamber ของ 24-well Biocoat Matrigel invasion chamber ที่มี Filter ขนาด $8 \mu\text{m}$ และเติม HGF ลงใน lower chamber จากนั้น incubate ในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจเซลล์ที่ invade ผ่าน matrigel-coated membrane ด้วยการย้อม hematoxylin & Eosin แล้วนับ 5 fields ที่ 400x power fields ของกล้องจุลทรรศน์ พบว่า HGF ที่ความเข้มข้น 40 ng/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง invade ผ่าน matrigel ได้เพิ่มขึ้นกว่า 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย HGF (รูปที่ 3B)



รูปที่ 3 A. การเกิด Migration ของเซลล์ถูกตรวจเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย HGF

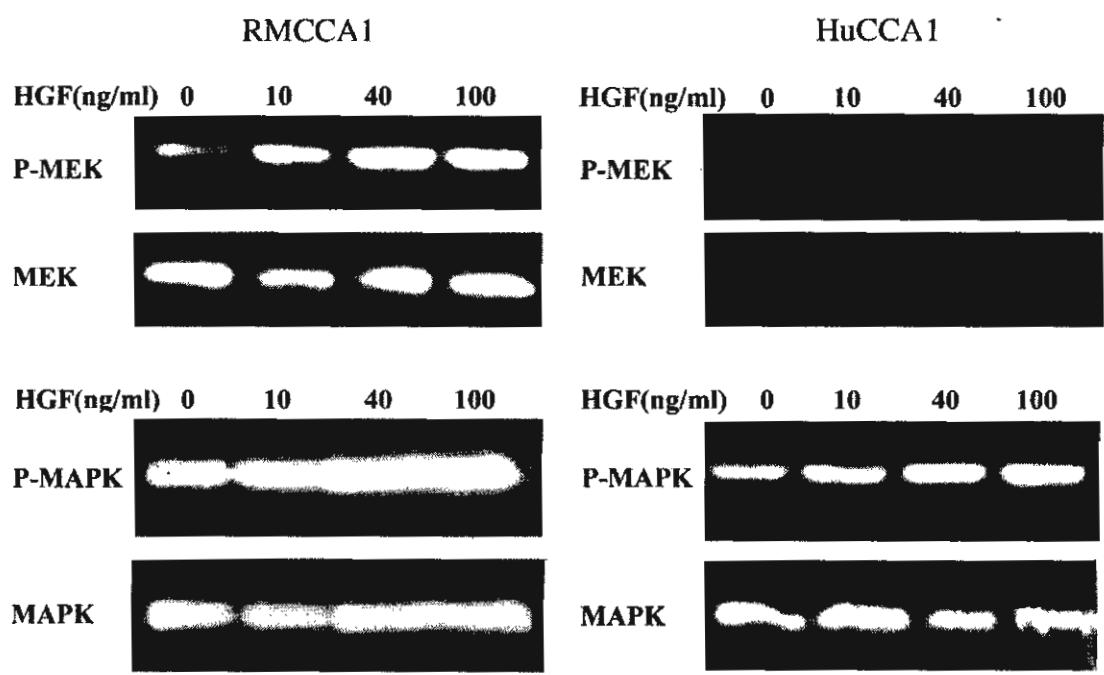
ด้วยขนาด 20-100 ng/ml

B. การเกิด Invasion ของเซลล์ถูกตรวจเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย HGF

ด้วยขนาด 40 ng/ml

ผลของ HGF ต่อ phosphorylation ของ MEK ½ ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

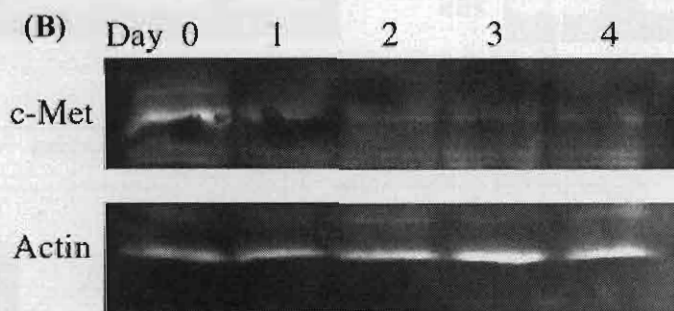
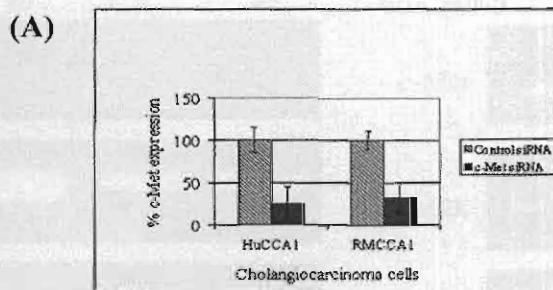
การวิจัยนี้ทำการศึกษา Phosphorylation ของ signal molecules ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิด invasion และ migration ของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย HGF จะทำให้เกิด phosphorylation ของ MEK ½ และ MAPK ขึ้น มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น HGF ที่เวลา 15 นาที (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 เซลล์มะเร็งถูกเลี้ยงใน serum-free medium เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย HGF เป็นเวลา 15 นาที การเกิด Phosphorylation ของ MEK1/2 และ MAPK ถูกตรวจด้วยวิธี Western blot

ผลของ c-Met siRNA ต่อการแสดงออกของ c-Met และผลของ c-Met siRNA ต่อการเกิด phosphorylation ของ MEK ½ ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

การตรวจสอบ c-Met siRNA ต่อการแสดงออกของ c-Met จะตรวจสอบด้วยวิธี real time RT-PCR พบว่า c-Met siRNA มีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ c-Met จริง โดยการตรวจสอบการยับยั้ง c-Met ด้วย siRNA นั้นจะตรวจสอบตั้งแต่ 24 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง หลังจาก transfect แล้ว ในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่ศึกษา (รูปที่ 5A) และทำการตรวจสอบ c-Met siRNA ต่อการแสดงออกของ c-Met ด้วยวิธี western blot (รูปที่ 5B)



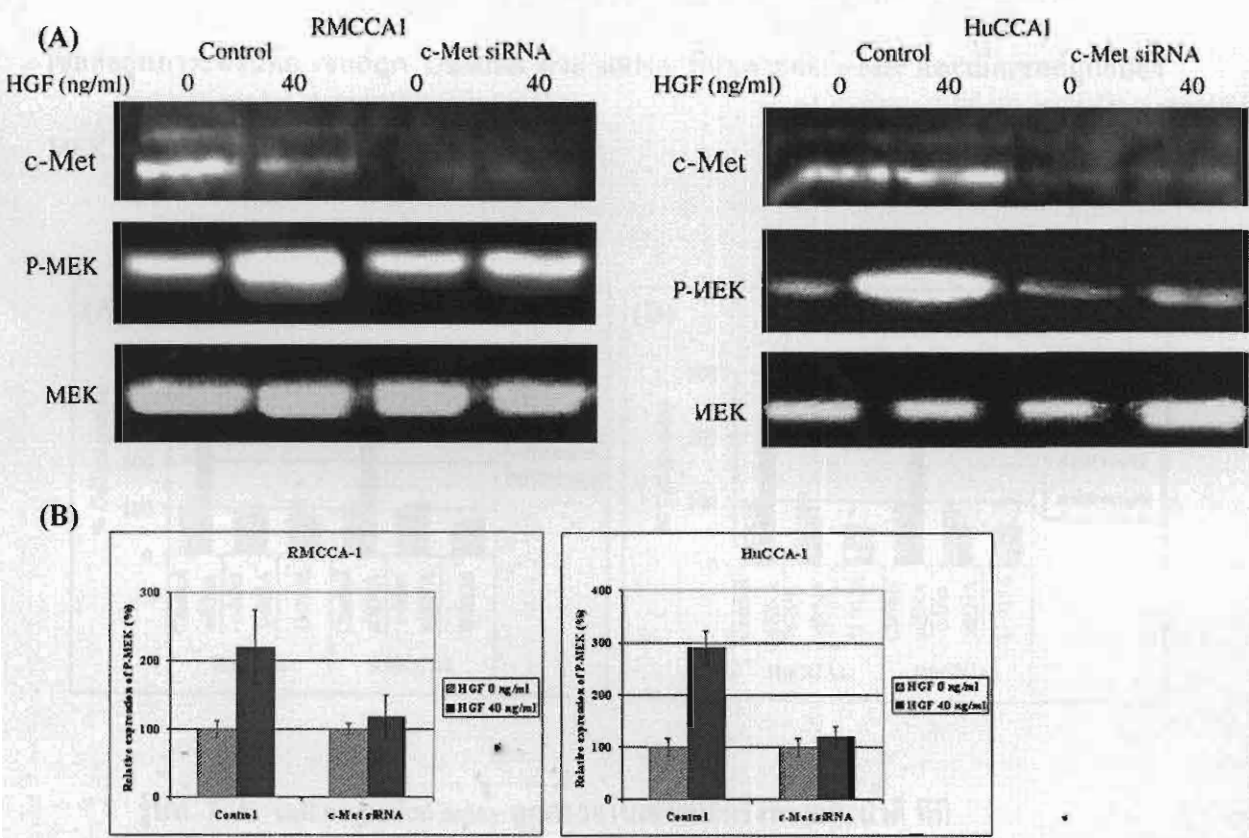
รูปที่ 5 A. เซลล์มะเร็งถูก Transfect ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met

จากนั้นวัดปริมาณการแสดงออกของ c-Met ด้วย real time PCR

B. เซลล์มะเร็งถูก Transfect ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met

จากนั้นวัดปริมาณการแสดงออกของ c-Met ด้วย Western blot

เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีจะถูก transfect ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met นั้นจะไปยับยั้งการแสดงออกของ c-Met ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีและ ทำให้ขบวนการ phosphorylation ของ MEK½ เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย HGF ลดลง ซึ่งจะเห็นว่า band โปรตีนที่เกิดขึ้นบนฟิล์ม X-ray ของเซลล์มะเร็งกลุ่มที่ถูก transfect ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met และมีการเติม HGF ด้วยนั้น band ที่เกิดขึ้นจะมีสีจางกว่า band ของเซลล์มะเร็งในกลุ่มที่ถูก transfect ด้วย Oligonucleotide control แตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 A. เซลล์มะเร็งถูก tranfect ด้วย siRNA control หรือ siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met จากนั้นกระตุ้นด้วย HGF แล้ววัดปริมาณการเกิด phosphoryration ของ MEK ด้วย Western blot

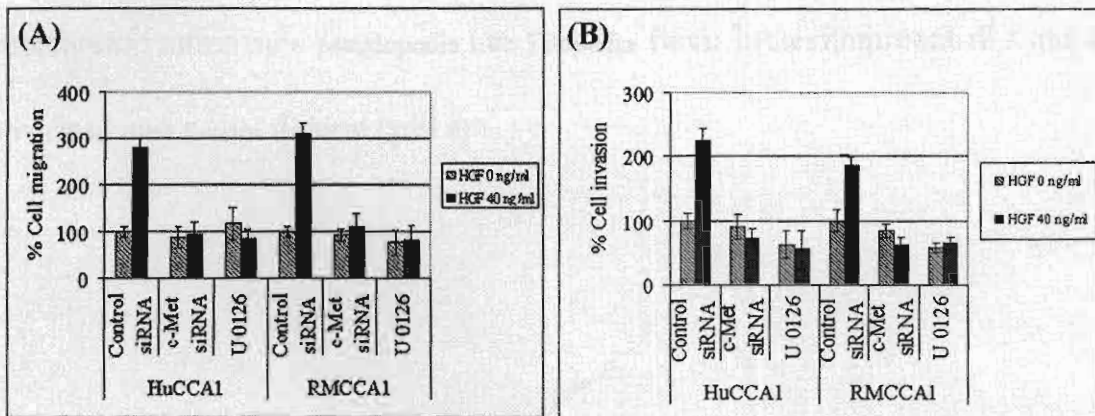
B. ผลจาก Western blot ถูกนำมาคำนวณด้วยเครื่อง densitometry

ผลของ c-Met siRNA หรือ MEK ½ inhibitor (U0126) ต่อ cell proliferation

พบว่า การเกิด Proliferation ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีจากการกระตุ้นด้วย HGF ไม่แตกต่างกัน ที่ในสภาวะดังนี้คือ เซลล์ถูก Transfect ด้วย Control siRNA, siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met, เซลล์ถูกยับยั้ง MEK ด้วย U0126

ผลของ c-Met siRNA หรือ MEK ½ inhibitor (U0126) ต่อ cell invasion

พบว่า การเกิด Invasion ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีจากการกระตุ้นด้วย HGF จะลดลงเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะดังนี้คือ เซลล์ถูก Transfect ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met และเมื่อเซลล์ถูกยับยั้ง MEK ด้วย U0126 (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 A. cell migration assay ถูกตรวจในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ที่มี

1. control siRNA , 2. c-Met siRNA , 3. U0126

จากนั้นเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย HGF ขนาด 0 และ 40 ng/ml

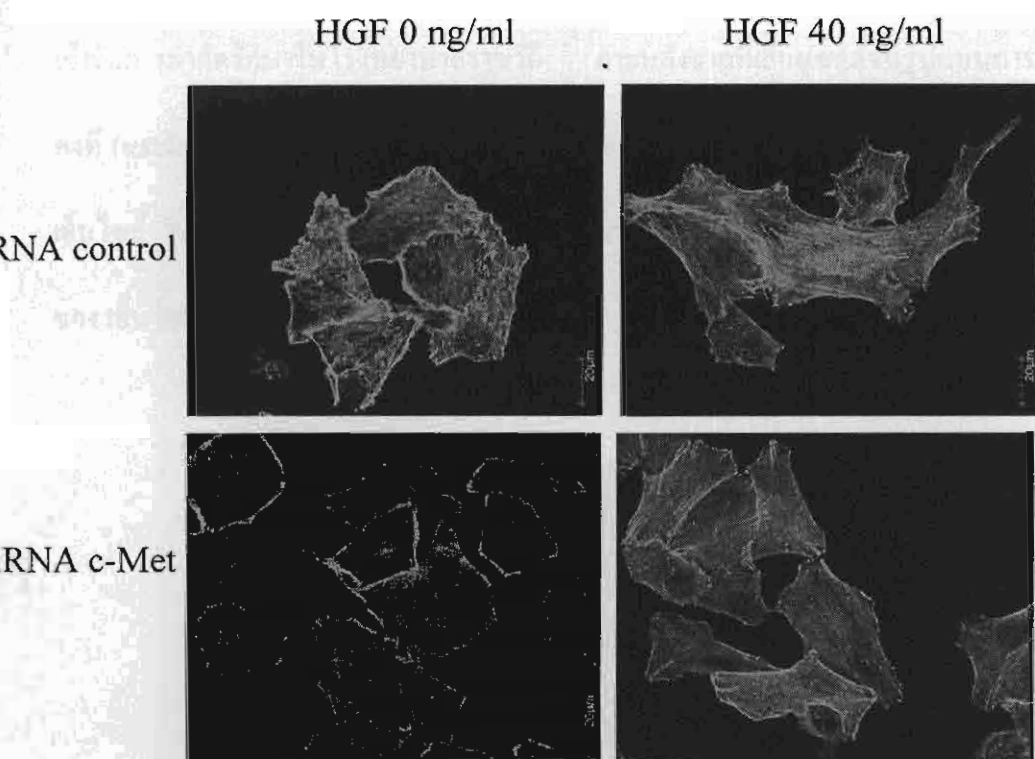
B. cell Invasion assay ถูกตรวจในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ที่มี

1. control siRNA , 2. c-Met siRNA , 3. U0126

จากนั้นเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย HGF ขนาด 0 และ 40 ng/ml

ผลของ HGF ต่อการเกิด actin Polymerization ของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

การศึกษาผลของ HGF ต่อการจัดเรียงตัวของโมเลกุล actin (การเปลี่ยนรูปจาก actin ไปเป็น F-actin) ในเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี RMCGA 1 และ HUCCA1 โดยเปรียบเทียบใน 4 กลุ่มทดลอง คือ 1 กลุ่มควบคุมที่เซลล์มะเร็งถูก tranfection SiRNA control แต่ไม่ได้รับ HGF 2. กลุ่มควบคุมที่เซลล์มะเร็งถูก tranfect ด้วย SiRNA control และได้รับ HGF ขนาด 40 ul/ml 3. กลุ่มทดลองที่เซลล์มะเร็งถูก transfect ด้วย SiRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met แต่ไม่ได้รับ c-Met แต่ไม่ได้รับ HGF และกลุ่มที่ 4. คือกลุ่มทดลองที่เซลล์ถูก transfect ด้วย SiRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met และได้รับ HGF ขนาด 40 ug/ml จากนั้นเลี้ยงเซลล์ไว้อีก 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำเซลล์มาย้อมด้วย Phalloidin Alexa Fluor ซึ่งจะจับกับ F-actin เท่านั้น ผลการทดลองพบว่า เซลล์มะเร็ง ในกลุ่มที่ 1 มีการเรียงตัวของ F-actin ไม่สม่ำเสมอ เซลล์มะเร็งในกลุ่มที่ 2 พบการเรียงตัวของ F-actin มาก ขวางเซลล์ และบริเวณขอบเขตเซลล์ร่วมกับการเกิด pseudopodia และ Filopodia ชัดเจน ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ 3 และ 4 มีการเรียงตัวของ F-actin น้อยมาก (รูปที่ 8)

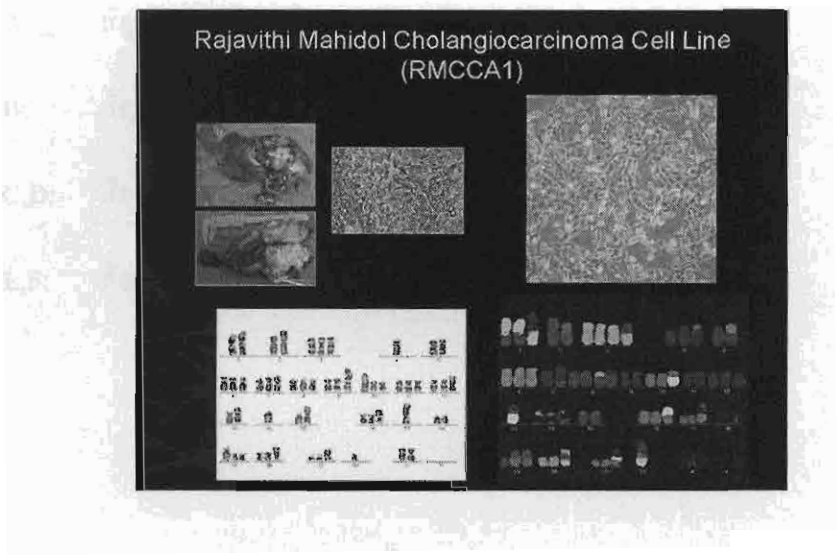


รูปที่ 8. เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีถูกเลี้ยงบน fibronectin coating plate ใน medium ที่มี

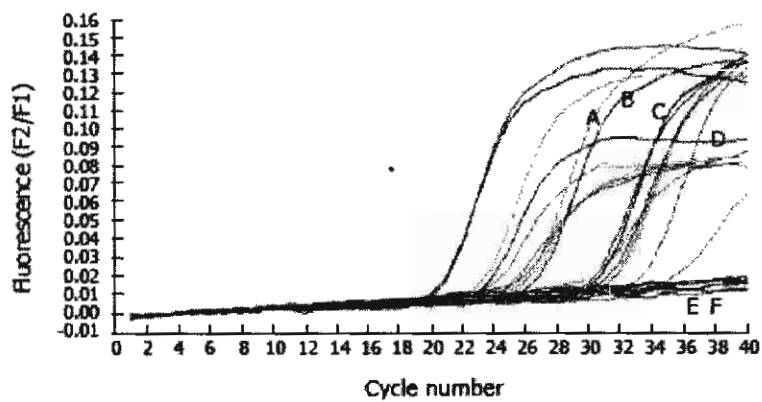
siRNA control หรือ siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met จากนั้นเซลล์ถูกกระตุ้น HGF เซลล์ถูก
 ข้อมด้วย phalloidin ALEXAFLUR ตรวจสอบ F-actin ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal
 microscope

การ Establish Rajavithi-Mahidol Cholangiocarcinoma Cell Line 1

เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี RMCCA1 ถูกสร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อมะเร็งทางเดินน้ำดีจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดรักษาในโรงพยาบาลราชวิถี ภายหลังจากที่เลี้ยงเซลล์จนรูปแบบการเจริญเติบโตคงที่ (stable cell line) ได้ตรวจ chromosome เพื่อยืนยันลักษณะของมะเร็ง (รูปที่ 9) และตรวจหาเอ็นไซม์ Telomerase ด้วยวิธี real time PCR พบว่าทั้ง RMCCA1 และ HuCCA1 มีการแสดงออกของ เอ็นไซม์ Telomerase อย่างชัดเจน (รูปที่ 10)



รูปที่ 9 เซลล์มะเร็งชนิด RMCCA1 ที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี



รูปที่ 10 สัญญาณจาก real time PCR จากการเพิ่มจำนวน hTERT cDNA ขนาด 198 bp จาก

A: สัญญาณจาก RMCCA1

B: สัญญาณจาก HuCCA1

C,D: สัญญาณจากผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี

E,F: สัญญาณจากอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงดี

Discussion

โรคมะเร็งทางเดินน้ำดี จัดเป็นโรคที่มีความรุนแรง และเป็นอันตรายต่อชีวิตผู้ป่วยอย่างมาก ตัวโรคมักมีการลุกลามไปสู่เส้นเลือดและอวัยวะข้างเคียง หรือกระจายไปสู่อวัยวะที่ห่างไกลออกไป ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการกระจาย หรือการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ในระดับอนุชีววิทยา c-Met เป็น Tyrosine Kinase receptor ของ HGF สามารถตรวจพบ c-Met ได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด การกระตุ้น c-Met ด้วย HGF มีผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการแบ่งตัว, การลุกลาม และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Angiogenesis) นอกจากนี้ยังพบว่า Retinoic acid ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งของตับอ่อนสร้าง c-Met เพิ่มขึ้นซึ่งทำให้เซลล์มีความสามารถลุกลามเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาผลของ HGF ต่อ c-Met บนเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ชนิด HuCCA 1 และ RMCCA 1 โดยดูผลการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) การลุกลามของเซลล์ และการใช้ siRNA เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ c-Met จากผลการทดลองพบข้อมูลที่สำคัญหลายเรื่อง ที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

ผู้วิจัยพบว่า เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีทั้ง 2 ชนิด (HuCCA 1 และ RMCCA 1) มีการแสดงออกของ c-Met ทั้งระดับ RNA และระดับ Protein การกระตุ้น c-Met ด้วย HGF มีผลให้เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี เพิ่มความสามารถในการ migration และ invasion พบโมเลกุลที่สำคัญต่อกระบวนการดังกล่าว ได้แก่ การกระตุ้นสัญญาณจาก extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการยืนยันโดยยับยั้ง c-Met ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met หรือการใช้ตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อ MEK ½ (U0126) ซึ่งผลจากการใช้ c-Met siRNA หรือ U0126 จะไปยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี พบว่า MEK ½ ออกฤทธิ์ผ่านทาง mitogen activated protein kinase cascade ซึ่งควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อกระตุ้น MEK ½ จะเกิด phosphorylation ที่ serine 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 217 และ 221 MEK ½ ถูกกระตุ้นได้กลไกหลายชนิด เช่น จาก

growth factors, cytokines, การเกิด membrane depolarization และ calcium influx แม้ว่าจะมีรายงานว่า HGF เป็นตัวกระตุ้นต่อการเกิด Akt phosphorylation และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) แต่ก็มีรายงานซึ่งตรงกับการวิจัยนี้ที่ว่า การกระตุ้น c-Met ด้วย HGF ไม่มีผลต่อการเกิด Akt phosphorylation หรือการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ซึ่งความแตกต่างจากการกระตุ้น c-Met ต่อ Akt Phosphorylation และการแบ่งตัวของเซลล์ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างต่อการกระตุ้นของ Multifunctional docking site ของ c-Met ก็เป็นไปได้ โดยปกติเซลล์มะเร็งจะเคลื่อนที่ได้ จำเป็นต้องอาศัยการเรียงตัวของ actin (actin polymerization) ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่แบบ migration และ invasion พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีด้วย HGF มีผลให้การเรียงตัวของ actin ดีขึ้น ในทางกลับกันเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ c-Met ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ c-Met มีผลไปลดการเรียงตัวของ actin ซึ่งผลจากการทดลองนี้ แสดงว่า HGF และ c-Met มีบทบาทสำคัญต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี โดยสรุปพบว่า การกระตุ้น c-Met เป็นกลไกระดับโมเลกุลที่สำคัญ ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ซึ่งการยับยั้งโมเลกุล c-Met และ Pathway ของ c-Met น่าจะเป็นแนวทางการรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี ต่อไปในอนาคต

References

1. Chamberlain, R.S., and Blumgart, L.H. Hilar cholangiocarcinoma. a review and commentary. *Ann Surg Oncol.* 7(1): 55, 2000
2. Washburn, W.K., Lewis, W.D., and Jenkins, R.L. Aggressive surgical resection for cholangiocarcinoma. *Arch Surg.* 130(3): 270, 1995
3. Ayhan, A., Ertunc, D., Tok, E.C., and Ayhan, A. Expression of the c-Met in advanced epithelial ovarian cancer and its prognostic significance. *Int J Gynecol Cancer* 15(4): 618, 2005
4. Coltella, N., Manara, M.C., Cerisano, V., Trusolino, L., Di Renzo, M.F., Scotlandi, K., and Ferracini, R. Role of the MET/HGF receptor in proliferation and invasive behavior of osteosarcoma. *FASEB J.* 17(9): 1162, 2003
5. Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., Comoglio, P.M., and Di Renzo, M.F. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74: 1862, 1996
6. Ren, Y., Cao, B., Law, S., Xie, Y., Lee, P.Y., Cheung, L., Chen, Y., Huang, X., Chan, H.M., Zhao, P., Luk, J., Vande Woude, G., and Wong, J. Hepatocyte growth factor promotes cancer cell migration and angiogenic factors expression: a prognostic marker of human esophageal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 11(17): 6190, 2005
- Aishima, S.I., Taguchi, K.I., Sugimachi, K., Shimada, M., Sugimachi, K., and Tsuneyoshi, M. c-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 40(3): 269, 2002

8. Christensen, J.G, Burrowsc, J., and Salgia, R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett* 225: 1, 2005
9. Zhang, Y.W., and Vande Woude, G.F. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 88(2): 408, 2003
10. Gao, C.F., and Vande Woude, G.F. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res* 15(1): 49, 2005
11. Leelawat, K., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Mahidol, C., and Tanaka, M. All-trans retinoic acid inhibits the cell proliferation but enhances the cell invasion through up-regulation of c-met in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 224(2): 303, 2005
12. Margaret, F.F., Kurumi, Y.H., Elizabeth, J.M., Andrea, J.D., Deborah, A.S., Wendi, S.F., Drew, E.V.D., William, J.P., Richard, A.E., Frank, H., Robert, A.C., Ronald, L. M., Peggy, A.S., and James, M.T. Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J Biol Chem.* 273: 18623, 1998
13. Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., Mueller, W.T., Delaney, A., Omer, C., Sebolt-Leopold, J., Dudley, D.T., Leung, I.K., Flamme, C., Warmus, J., Kaufman, M., Barrett, S., Teclé, H., and Hasemann, C.A. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol.* 11(12): 1192, 2004
14. Gomez, E., Pritchard, C., and Herbert, T.P. cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 277(50): 48146, 2002

15. Maulik, G., Madhiwala, P., Brooks, S., Ma, P.C., Kijima, T., Tibaldi, E.V., Schaefer, E., Parmar, K., and Salgia, R.. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. J Cell Mol Med 6(4): 539, 2002
16. Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., and Herzog, V. Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. Eur J Cell Biol 83(11-12): 717, 2004

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์

- a. Kawin Leelawat, M.D., Ph.D., Surang Leelawat, Ph.D., Panada Tepaksorn, Ph.D., Panthip Rappanasinganchan, Anicha Leungchaweng, Rutaiwan Tohtong, Ph.D., Prasert Sobhon, Ph.D. **Involvement of c-Met/ hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for c-Met.** J Surg Res. 2006 (in press)
- b. Kawin Leelawat, Surang Leelawat, Thawee Ratanachu-Ek, Somboon Trubwongchareon, Jerasak Wannaprasert, Saad Tripongkaruna, Suchart Chantawibul, Panadda Tepaksorn. **Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma Patients.** *World J Gastroenterol* 2006. 14; 12(26): 4195-4198
- c. **Panthip Rattanasinganchan, Kawin Leelawat, Saad Tripongkaruna, Chintana Tocharoentanaphol, Somboon Trubwongchareon, Tuangporn Suthiphongchai, Rutaiwan Tohtong. Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient** *World J Gastroenterol* 2006. (in press)

2. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- a. Annual meeting of Royal College of Surgery; ACS Chapter, Pattaya, Chonburi, 2005
- b. Annual meeting of National Cancer Institute; Bangkok, 2005

ภาคผนวก

Editorial Manager™ - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Back Search Favorites

Address http://www.editorialmanager.com/jsr/default.asp

Go

JSR

Journal of
Surgical Research

Editorial
Manager

Username: Kavin
Role: Author

EM Version: 4.0

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Kavin Leelawat, MD, PhD

Display 10 results per page.

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
View Submission R1 JSR-D-06- View Decision Letter 00126		Involvement of c-Met/ hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for c-Met	Feb 01, 2006	Completed Accept	May 24, 2006	Accept

Display 10 results per page.

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

<< Author Main Menu

Adobe
Reader

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.

start

Internet

16:38

View Letter

Close

Date: May 24, 2006

To: "Kawin Leelawat" leekawin@yahoo.com

From: "JSR" journalofsurgicalresearch@hmc.psu.edu

Subject: Acceptance of JSR-D-06-00126R1

Ms. No.: JSR-D-06-00126R1

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
Journal of Surgical Research

Dear Dr. Leelawat,

On behalf of the Editors of the Journal of Surgical Research, we are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication. Proofs of the article will be sent to you in the near future.

Many thanks for submitting your paper to the Journal of Surgical Research.

With kind regards,

JSR Editorial Office
Journal of Surgical Research

Close

Editorial Manager(tm) for Journal of Surgical Research
Manuscript Draft

Manuscript Number: JSR-D-06-00126

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

Article Type: Regular Article

Section/Category:

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

Corresponding Author: Dr. Kawin Leelawat, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Rajavithi Hospital

First Author: Kawin Leelawat, M.D., Ph.D.

Order of Authors: Kawin Leelawat, M.D., Ph.D.; Surang Leelawat, Ph.D.; Panada Tepaksorn, Ph.D.;
Panthip Rappanasinganchan, Ph.D.c.; Anicha Leungchaweng; Rutaiwan Tohtong, Ph.D.; Prasert
Sobhon, Ph.D.

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

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

^{1,4} Kawin Leelawat, M.D., Ph.D.

² Surang Leelawat, Ph.D.

³ Panada Tepaksorn, Ph.D.

⁴ Panthip Rappanasinganchan

³ Anicha Leungchaweng

⁴ Rutaiwan Tohtong, Ph.D.

⁵ Prasert Sobhon, Ph.D.

¹ Department of Surgery, Rajavithi Hospital, Bangkok, Thailand

² Faculty of Pharmacy, Rangsit University, Bangkok, Thailand

³ Medical Biotechnology Center, Department of science, Bangkok, Thailand

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁵ Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Correspondence to; Kawin Leelawat, M.D., Ph.D. Department of Surgery, Rajavithi Hospital, 2 Rajavithi rd., Bangkok, Thailand 10400, E-mail: kawin_leelawat@hotmail.com

Introduction

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.

Materials and methods

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).

Results

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.

Conclusions

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

Introduction

Cholangiocarcinoma is a cancer arising from bile duct epithelium. It is one of the most difficult diseases to treat. Three-year survival rates of 35% to 50% can be achieved in only a few numbers of patients when negative histological margins are attained at the time of surgery [1]. The reason for this poor prognosis is that cholangiocarcinoma exhibits extensive local invasion and frequent regional lymph node metastasis [2]. In addition, there is no effective chemotherapeutic drug to kill cholangiocarcinoma cells.

c-Met (hepatocyte growth factor receptor) is a tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor (HGF). The previous study demonstrated that the over expression of c-Met has been found in many kinds of cancers [3-6] including cholangiocarcinoma [7]. Stimulation of c-Met activates multiple signal intermediates such as PI3k and MEK1/2 which has been recognized as the key factors influencing the events of tumor invasion and metastasis [8-10]. Therefore, the pharmacologic intervention that effects c-Met expression and its signal transduction may influence the invasiveness of cholangiocarcinoma cell.

In this study, we have demonstrated that the stimulation of c-Met with HGF induced cholangiocarcinoma cell invasion. In addition, inhibition of c-Met expression with siRNA or inhibition of its signal transduction intermediate molecule (MEK1/2), suppressed the invasiveness of cholangiocarcinoma cell.

Materials and Methods

Cell culture and Materials

Ham's F12 medium and fetal bovine serum were purchased from Gibco (Gibco, Grand Island, NY, USA). The recombinant human HGF and 24-well Biocoat Matrigel invasion chamber (8µm) were purchased from Becton Dickinson (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Anti-c-Met, anti-MEK, anti-Phospho-MEK1/2 (Ser217/221), anti-Akt, anti-Phospho-Akt (Ser473) and anti-Phospho-Akt (Thr308) antibodies were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology). The human cholangiocarcinoma cell line HuCCA1 (kindly provided by Prof. Sirisinha, Department of Microbiology, Mahidol University) and RMCCA1 (established from Department of Surgery, Rajavithi Hospital) were grown in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Small interfering RNA (siRNA) for inhibition of c-Met expression

Three stealth small interfering RNA (siRNA) duplex oligoribonucleotides specific for c-Met (NCBI Ref Seq NM_000245) were synthesized. The sequences were as follows (i) MET-HSS106477 sense 5'-UUAACAGCAAACUCAGUUGAAAUGG-3', antisense 5'-CCAUUUCAACUGAGUUUGCUGUUA-3', (ii) MET-HSS106478 sense 5'-UGAAUUAGGAAACUGAUCUUCCGGA-3', antisense 5'-UCCAGAAGAUCAGUUUCCUAAUUA-3', (iii) MET-HSS106479 sense 5'-AAAUCUUUCAUGAUGAUUCCUCGG-3', antisense 5'-CCGAGGGAAUCAUGAAAGAUUU-3'. siRNA oligos were transfected into cholangiocarcinoma cells by using BLOCK-iT transfection kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The BLOCK-iT fluorescent oligo that is not homologous to any known genes was used as transfection efficiency detector and

a negative control to ensure against induction of nonspecific cellular events caused by introduction of the oligo into cells. Among the three siRNA oligo duplexes specific for c-Met, the one that required the smallest concentration to achieve the desired knockdown effect was selected and used in all experiments. The transfected cells were subjected to proliferation, migration and invasion assay. The mRNA inhibiting levels were assayed with Real time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) and the protein inhibiting levels were analyzed with western blotting after 48 h of treatment.

Quantitative real-time RT-PCR and western blotting analyses

Total RNA was isolated from cells by RNeasy kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Quantitative real-time RT-PCR was performed with Quantitect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) in a standard PCR reaction mixture. The amplification primers were: (1) c-Met: forward primer 5'-ACAGTGGCAT GTCAACATCGCT-3' and reverse primer 5'-GCTCGGTACTCTACA GATTC-3' and (2) GAPDH: forward primer 5'-TCCATGACAACTTTGGTATCG-3' and reverse primer 5'-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGA-3'. Amplification and detection were performed in a BIO-RAD iCycler iQ system (BioRad, Hercules, CA, USA). The fluorescence threshold value was calculated using the iCycle iQ system software. The conditions were started with; 20 min., 50°C. Then 42 cycling steps for amplification of PCR products were as follow; 15 sec., 94°C for denaturation, 30 sec., 60°C for annealing and 30 sec., 72°C for extension. A single fluorescence measurement was taken at each extension step. The crossing points (Cp), marking the cycle when the fluorescence of a given sample significantly exceeded the baseline signal were recorded and expressed as a function of the cycle number. The melting curve analysis was performed to assess the specificity of the

amplified products. The concentration of PCR product was calculated on the basis of established standard curve derived from serial dilutions of the positive controls for GAPDH and c-Met in the HuCCA1 cells.

For western blot analysis, 5×10^5 cells were seeded in a six-well culture plate, followed by treating with 40 ng/ml HGF for 15 min. Cells were collected and then western blot analyses were performed as previously described [11]. Antibodies against c-Met, Phospho-Met, MEK1/2, Phospho-MEK1/2 (Ser217/221), MAPK, Phospho-MAPK, Akt, Phospho-Akt and actin obtained from Cell Signaling (Cell Signaling Technology) were used at a dilution of 1:1000. Chemiluminescent detection of antibody-antigen complexes revealed the target proteins on X-ray film.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 96-well culture plates at a density of 1×10^4 cells per well followed by the addition of HGF in various concentrations. For MEK inhibition study, cells were treated with U0126 for 1 h. before addition of HGF. Then cells were incubated for 24 h before applying the WST-1 cell proliferation assay reagent (Roche Diagnostics, Laval, Quebec) according to the recommendation of the manufacturer. Percentage of proliferation was calculated based on untreated cells.

Cell migration assay

Migration of cholangiocarcinoma cells was assayed using chamber with 8- μ m pore filters (Transwell, 24-well cell culture, Costar, Boston, MA). 5×10^4 cholangiocarcinoma cells were added to the upper chamber. Then 0.5 ml serum-free media with 40 ng/ml of HGF was added to the lower chamber. The chambers were incubated for 12 h at 37°C. After