

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9

โดยทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบตาในเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์

Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in oral squamous cell

carcinoma by transforming growth factor-beta (TGF- β)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นรีชา สารชวณะกิจ ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และ อาทิตพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

ตุลาคม 2550

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วย รวมทั้งขอขอบคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ โดยเฉพาะ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ทศนีย์ ยงชัยตระกูล หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ในการทำงานวิจัย และทำที่สุด ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	การควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 โดยทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบตาในเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์
ผู้วิจัย	นیرชา สารชวณะกิจ ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และ อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ
เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ	ตุลาคม 2550

บทคัดย่อ

เอนไซม์ MMP-9 เป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง TGF- β เป็นโกรทแฟคเตอร์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์ การดิฟเฟอเรนเซียต และการตายแบบ Apoptosis เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในรอยโรคมะเร็งมีรายงานว่า TGF- β มีผลต้านทานการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งระยะแรก แต่กระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระยะลุกลาม การทดลองครั้งนี้ ทำการศึกษาผลของ TGF- β ที่มีต่อการแสดงออก และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่พบในช่องปาก และกลไกในระดับอณู ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่พบในช่องปาก กับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกในแง่ของการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงระดับการสร้าง TGF- β ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ หลังเอนไซม์ MMP-9 เพิ่มขึ้น สัญญาณการกระตุ้นเกิดผ่าน crosstalk ระหว่างเส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณของ Smad และ Rho kinase นอกจากนี้ เซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่พบในช่องปาก ยังสามารถกระตุ้นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันให้หลัง MMP-9 เพิ่มขึ้น แต่กลไกการเหนี่ยวนำยังไม่มีความชัดเจน

Project Title Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in oral squamous cell carcinoma by transforming growth factor-beta (TGF- β)

Name of Investigators Neeracha Sanchavanakit, Prasit Pavasant and Artiphon Pimkhaokham

Year October 2007

Abstract

MMP-9 has been considered to be an important enzyme for tumor metastasis. TGF- β is a growth factor which involved in cell physiological processes such as proliferation, differentiation and apoptosis. In cancer, several studies were reported the role of TGF- β as a tumor suppressor in the early stage of cancer, on the other hand, in the metastasis-stage of cancer TGF- β promoted disease progression. In this study, we investigated the effect of TGF- β on the expression and activation of MMP-9 in oral squamous carcinoma cell lines and its molecular mechanism. In addition, cell-cell interaction between oral squamous carcinoma cell lines and gingival fibroblasts in term of TGF- β modulation was investigated. The results indicated that TGF- β could induce the level of MMP-9 by signaling through Smad and Rho kinase with evidence of the crosstalk between these pathways. The results also showed that oral squamous carcinoma cell lines could induce TGF- β secreted by gingival fibroblasts; however, the molecular mechanism of MMP-9 induction was still not clear.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลของการวิจัย	12
วิเคราะห์ผลการวิจัย	18
สรุป	20
เอกสารอ้างอิง	21



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	A) ภาพเจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-2, HSC-5, HN-22 และ BT-549 เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β	25
	B) ภาพแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA ของเซลล์ HSC-5 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β	26
	C) ภาพแสดงระดับของอาร์เอ็นเอ mRNA ของ MMP-9 ของเซลล์ HSC-5 เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β	27
รูปที่ 2	ภาพเจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-5 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ร่วมกับ ตัวยับยั้งต่อ PI3K และ Akt	28
รูปที่ 3	ภาพเจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-5 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ร่วมกับ ตัวยับยั้งต่อ ERK, JNK, p38 kinase และ Rho kinase	29
รูปที่ 4	ภาพเจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HN-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ร่วมกับตัวยับยั้งต่อ Smad-2	30
รูปที่ 5	ภาพเวสเทิร์น บลอท แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ Smad 2 ในเซลล์ HN-22 เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β ร่วมกับการได้รับตัวยับยั้งต่อ Smad-2	31
รูปที่ 6	ภาพเวสเทิร์น บลอท แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ Smad 2 ในเซลล์ HN-22 เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β ร่วมกับการได้รับตัวยับยั้งต่อ Rho kinase	32
รูปที่ 7	ภาพแสดงระดับอาร์เอ็นเอ mRNA ของ TGF- β จากเนื้อเยื่อเหงือกปกติ	33
รูปที่ 8	ภาพแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 ของเซลล์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือก เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β ร่วมกับตัวยับยั้ง Rho kinase วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA	34
รูปที่ 9	ภาพแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 ในเซลล์ HN-22 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเหงือก ร่วมกับ neutralizing antibody ต่อ TGF- β วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA	35
รูปที่ 10	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 เมื่อเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเหงือก ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ไลน์ HN-22 วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA	36

บทนำ

ความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ต้องการกระบวนการย่อยสลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบก้อนมะเร็ง ร่วมกับการเคลื่อนตัวของเซลล์มะเร็งผ่านบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ถูกย่อยสลาย (Stetler-Stevenson et al., 1993)

Proteolytic enzymes ที่มีบทบาทอย่างมากในการย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix: ECM) คือเอนไซม์ในกลุ่ม MMPs ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ต้องการอะตอมของสังกะสี (Zinc atom) ที่ตำแหน่ง Catalytic domain ในการทำงาน สมาชิกเกือบทุกตัวของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะถูกสร้างและหลั่งออกมาเพื่อทำงานภายนอกเซลล์ โดยจะหลั่งออกมาในลักษณะที่ยังไม่พร้อมทำงาน (Latent form) โดยจะทำงานได้เมื่อส่วน Amino-terminal inhibitory domain ถูกตัดออก

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ มีความสามารถในการย่อยสลาย ECM ได้ทุกชนิด รวมทั้งคอลลาเจน ความสามารถในการย่อยคอลลาเจนนี้เป็นส่วนที่มีความสำคัญ เนื่องจากคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อหรือที่ร้อยละ 80 ของ ECM ดังนั้น MMP จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลาย ECM ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่มีพยาธิสภาพ (Sternlicht and Werb, 2001) และจากการศึกษาในรอยโรคมะเร็ง ก็พบการเพิ่มขึ้นของการสร้างและการทำงานของเอนไซม์หลายตัวในกลุ่ม MMP ที่สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของรอยโรคในด้านความสามารถในการแพร่กระจายด้วย (Itoh et al., 1998; Kim et al., 1998; Kupferman et al., 2000)

MMP สามารถแยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่มซึ่งแต่ละกลุ่มก็จะมีความสัมพันธ์กับรอยโรคมะเร็งที่แตกต่างกัน โดย MMP-9 พบมีบทบาทอย่างมากในการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิด รวมทั้งมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอ (Head and neck squamous cell carcinoma) โดยความสามารถจำเพาะในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ 4 (Type IV collagen) ซึ่งนำไปสู่การทำลายเบสเม้นท์ เมมเบรน

(Basement membrane) แล้วทำให้เกิดการแพร่กระจายของมะเร็งไปจากตำแหน่งต้นกำเนิด (Primary site) ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

การศึกษาในชิ้นเนื้อมะเร็ง ที่ตัดได้จากผู้ป่วย พบการเพิ่มขึ้นของ MMP-9 ทั้งในระดับของ อาร์เอ็นเอ นำรหัส (mRNA) โปรตีน รวมทั้งระดับของเอนไซม์ที่พร้อมทำงาน (Enzymatic activity) โดยมีความสัมพันธ์กับระดับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง (O-Charoenrat et al., 2001; Wood et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายรายงานที่แสดงให้เห็นว่า MMP-9 มีบทบาทในแพร่กระจาย และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยบางรายงานสามารถพบ MMP-9 ได้ทั้งในเซลล์มะเร็งและ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Stromal cells) ที่อยู่โดยรอบรอยโรค (Charous et al., 1997; Hong et al., 2000; O-charoenrat et al., 2000; O-charoenrat et al., 1999; Wood et al., 1997)

ผลจากการศึกษาโดยใช้ตัวยับยั้ง (Specific inhibitor; MMI-166) ที่มีความจำเพาะต่อ MMP-9 และ MMP-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มย่อยเดียวกัน โดยทำการทดสอบในเซลล์ไลน์จากมะเร็งตับอ่อน (Matsushita et al., 2001) และ มะเร็งลำไส้ (Ohta et al., 2001) พบว่าตัวยับยั้ง สามารถลดอัตราการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการเจริญ (Tumor growth) ของก้อนมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ในสัตว์ทดลองด้วย (Katori et al., 2002) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว สนับสนุนบทบาทของเอนไซม์นี้ในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ มีรายงานการทดลองในเซลล์ไลน์ LICR-HN-5, 6,15 และ อีก 10 เซลล์ไลน์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่โดยคณะของ O-Charoenrat พบความสามารถในการเคลื่อนของเซลล์มะเร็งสัมพันธ์กับระดับการสร้าง MMP-9 (O-charoenrat et al., 2000)

โดยปกติแล้วการแสดงออกของ MMP-9 สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยสารเหนี่ยวนำหลายๆชนิดในร่างกาย เช่น ECM บางตัว, ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์อัลฟา (Transforming growth factor- α ; TNF- α), อินเตอร์ลิวคิน-1 (Interleukin-1; IL-1), Oncogenes และ TGF- β เป็นต้น

TGF- β เป็นสมาชิกในกลุ่มของ TGF- β superfamily ซึ่งเป็นกลุ่มของโกรทแฟคเตอร์ (growth factors) ที่ควบคุมหลายกระบวนการของเซลล์ เช่น การแบ่งเซลล์ (Proliferation) การดิฟเฟอเรนซิเอต (Differentiation) และการตายแบบ Apoptosis เป็นต้น (Moustakas et al., 2002)

โดยปกติ TGF- β ทำงานโดยจับกับรีเซปเตอร์ (Receptor) บนผิวเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย Receptor 2 ตัวซึ่งจัดเป็น Serine/threonine kinase receptors คือ T β R I และ T β R II โดยจะถูกดึงมารวมกันเป็น Heterodimeric receptor จากนั้นสัญญาณจะถูกถ่ายทอดผ่านสู่นิวเคลียสโดย 2 เส้นทาง (Pathway) หลัก คือ ผ่านโดยตรงไปกับโมเลกุลกลุ่มที่มีชื่อว่า สแมด (Smads) (Smad dependent pathway) ซึ่งทำหน้าที่เป็น ทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ (Transcription factors) ด้วย (Ito et al., 2001; ten Dijke et al., 2000; Zhang et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าสัญญาณของ TGF- β จาก TGF- β receptor สามารถส่งผ่าน Pathway อื่นๆ (Smad independent pathway) เช่น Mitogen activated protein kinase (MAPK) (Edlund et al., 2003; Sanchez-Capelo, 2005; Yoo et al., 2003), Nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Bachelder et al., 2005; Huber et al., 2004; Zhou et al., 2004), Rho kinase (Bhowmick et al., 2001; Kamaraju and Roberts, 2005) ตลอดจน Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Bakin et al., 2000; Day et al., 1999) ได้เช่นกัน ส่งผลให้ TGF- β ควบคุมการแสดงออกของยีนได้หลายชนิด และเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมและการตอบสนองที่แตกต่างกันไปตามชนิดและระยะของเซลล์

จากการที่ TGF- β สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์บุผิวปกติ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ประกอบกับว่าโดยปกติแล้ว TGF- β ทำหน้าที่เป็น Tumor suppressor ดังนั้นความผิดปกติของ TGF- β หรือโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดสัญญาณ (Signal transduction) ของ TGF- β ที่พบอยู่ภายในเซลล์ อาจนำไปสู่กระบวนการของการเกิดและการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยมีรายงานพบว่าความผิดปกติในการทำงานของ TGF- β ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพได้หลายชนิด เช่น Pulmonary hypertension รวมทั้งรอยโรคมะเร็งด้วย (Attisano and Wrana, 2002; Derynck et al., 2001)

มีรายงานว่า TGF- β ยับยั้งการเกิดมะเร็งได้โดยการเพิ่มความเสถียรของสารพันธุกรรม และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทีโลเมอเรส (Telomerase) อย่างไรก็ตาม การส่งสัญญาณของ TGF- β มีองค์ประกอบที่ค่อนข้างซับซ้อน ประกอบกับมีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า TGF- β มีบทบาทที่ตรงกันข้ามกับที่กล่าวมา (Wakefield and Roberts, 2002) เช่นกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ในมะเร็งต่อมลูกหมาก (Wikstrom et al., 1998) ปรับเปลี่ยนเมทริกซ์ที่สะสมภายนอกเซลล์ที่อาจส่งเสริมกลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งช่องปาก (Dang et al., 2004) และกระตุ้นความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งตับอ่อน มะเร็งตับ เป็นต้น (Friess et al., 1993; Ito et al., 1995; Tian et al., 2003) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า TGF- β มีผลต่อกระบวนการเกิดมะเร็งในสองลักษณะ คือ เป็น Tumor suppressor ในมะเร็งระยะแรก และกระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระยะลุกลาม (Akhurst and Derynck, 2001) โดยมีการศึกษาที่แสดงความเป็นไปได้ของการที่เซลล์มะเร็งเปลี่ยนแปลงกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น สร้าง Autocrine TGF- β และ สร้าง T β R II ลดลง หรือ ลดระดับ Smad2 ทำให้สามารถต้านผลของ TGF- β ในการยับยั้งการดำเนินโรคของมะเร็งได้ (Fahey et al., 1996; Muro-Cacho et al., 2001; Paterson et al., 2001)

มีรายงานการตอบสนองของเซลล์ปกติต่อ TGF- β ในด้านการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่ม MMP ว่ามีผลยับยั้งการแสดงออกของ MMP หลายตัว เช่น MMP-1, MMP-3 และ MMP-9 ในเซลล์ Fibroblasts (Edwards et al., 1987) และ TGF- β ยับยั้งการแสดงออกของ MMP-9 ใน Monocytes และ Macrophages ทั้งในภาวะปกติหรือเมื่อถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ MMP-9 ด้วย Lipopolysaccharides (LPS) หรือ TNF- α (Ogawa et al., 2004) ใน Normal human dermal fibroblasts พบว่าไม่มีการแสดงออกของ MMP-9 เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β (Han et al., 2001) อย่างไรก็ตามพบว่า TGF- β สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ MMP-9 โดยผ่านทาง MAPK pathway ใน Transformed keratinocytes (Santibanez et al., 2002)

ในทางกลับกัน การศึกษาในเซลล์มะเร็งหลายชนิดพบว่า TGF- β สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ MMP-9 โดยในมะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์ (Oral squamous carcinoma cells) ซึ่งเป็นเพียงการศึกษาเดียวที่มีในขณะนี้ พบว่า Latency associated peptide ของ TGF- β สามารถจับกับ Integrin α V β 6 แล้วเพิ่มระดับการแสดงออกของ MMP-9 ได้ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ใช่รูปแบบการถ่ายทอดสัญญาณปกติของ TGF- β ที่ผ่านไประบบ TGF- β receptor (Thomas et al., 2002) ส่วนการศึกษาในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของมนุษย์พบว่า TGF- β เพิ่มระดับการแสดงออกของ MMP-9 โดยเพิ่มความเสถียรของ mRNA ของ MMP-9 แต่ไม่ได้เพิ่มระดับของ MMP-9 mRNA Transcription (Sehgal and Thompson, 1999) ซึ่งแตกต่างจากการกระตุ้นด้วย TNF- α , Oncogene ras, jun และ v-src รวมทั้ง Phorbol ester ที่เพิ่มระดับ mRNA ของ MMP-9 (Gum et al., 1996) นอกจากนี้มีรายงานว่า TGF- β เพิ่มการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของหนูที่มีพฤติกรรมรุนแรง แต่ไม่พบการกระตุ้นนี้ในกลุ่มเซลล์มะเร็งที่ไม่มีความสามารถในการแพร่กระจาย (Sehgal et al., 1996) นอกจากนี้มีการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านมพบว่า TGF- β เพิ่มการแสดงออกของ MMP-9 ผ่านทาง p-38 kinase (Kim et al., 2004; Kim et al., 2005) งานวิจัยเหล่านี้เป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบการตอบสนองของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งที่มีต่อ TGF- β

ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในเซลล์ที่มีความรุนแรงของการเกิดมะเร็งแตกต่างกัน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบหรือมีความผิดปกติของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องหรือกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ที่ผ่านไปกับ Smad pathway หรือ Smad independent pathway ดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งส่งผลให้เกิดการตอบสนองต่อสารกระตุ้นภายนอกแตกต่างกัน รวมถึงการแสดงออกของ MMP-9 ที่แตกต่างกันเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β

อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงการส่งสัญญาณที่เปลี่ยนไปของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่ได้จากช่องปากยังไม่มีคำตอบชัดเจน ผลจากการศึกษานำร่องในกลุ่มผู้วิจัย

เอง โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลาตินไซโมกราฟีพบว่า การส่งผ่านสัญญาณของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ MMP-9 นั้นมีผลต่อเซลล์ไลน์ตัวอย่างของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่พบในช่องปาก แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ BT-549 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งเต้านม และการถ่ายทอดสัญญาณที่ควบคุมการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์มะเร็งจากช่องปาก เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- β นั้น อาจจะไม่ได้อำนาจไปทางโปรตีน Smads (Smad independent pathway) ดังนั้น วัตถุประสงค์ในงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเพื่อยืนยันการตอบสนองของเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ที่ได้จากช่องปาก เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- β ต่อการแสดงออกของโปรตีน MMP-9 เพื่อยืนยันผลการทดลองนำร่องที่ได้ โดยจะตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับโปรตีน ด้วยเทคนิค ELISA ควบคู่ไปกับ Zymography รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับของ MMP-9 ที่เกิดขึ้น ตลอดจนจะศึกษา Pathway ของการถ่ายทอดสัญญาณที่เกิดขึ้นในส่วนของ Smad independent pathway ว่าจะนำไปในรูปแบบใด ซึ่งน่าจะให้ข้อมูลส่วนหนึ่งที่เป็นประโยชน์ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกการเกิดและการแพร่กระจายของมะเร็ง ตลอดจนนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ต่อไปในอนาคตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ (Human squamous carcinoma cell lines)

เซลล์ 3 ไลน์ (HSC-2, HSC-5 และ HN-22) ที่เตรียมได้จากชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของผู้ป่วย ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Teruo Amagasa, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan และเซลล์ไลน์ที่ได้จากมะเร็งเต้านม (BT-549) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Erik W.Thompson, St. Vincent's Institute of Medical Research, Victoria, Australia เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย ซีรัมจากฟัตัสของวัว (Fetal Bovine Serum) ร้อยละ 10 กลูตามีน (L-Glutamine) 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลลิน (Penicillin) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดจะได้จาก GibcoBRL (NY, USA) เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 การขยายจำนวนเซลล์จะทำโดยการถ่ายเซลล์ (subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:5 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA, GibcoBRL, NY, USA)

2. การหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษและการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT)

การหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษของ TGF- β เพื่อใช้กระตุ้นเซลล์ จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (Mosmann, 1983) ดั้งชั้นตอนโดยย่อดังนี้ เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม และกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน กระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกดูดออกแล้วล้างด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์เซลล์ยาด์ 2 ครั้ง เติมสารละลาย MTT (Thiazolyl blue, Sigma, MO, USA) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและฟีนอลเรด ให้ได้

ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ออก แล้วทำละลายผลิตภัณฑ์สีม่วงเข้มของฟอร์มazan (Formazan) ด้วยสารละลายผสมระหว่างไกลซีนบัฟเฟอร์ (Glycine buffer; 0.1M Glycine, 0.1M NaCl, pH10) และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide; DMSO, Merck, Darmstradt, Germany) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีม่วง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาจำนวนเซลล์จากกราฟมาตรฐาน ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

กราฟมาตรฐานทำขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยวิธีข้างต้น ค่าที่ได้จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ทราบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสง

3. กระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม กระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษ และระยะเวลาต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับ MMP-9 ด้วยเทคนิคเจลลาตินไซโมกราฟี และตัวเซลล์จะถูกนำไปตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยเทคนิค MTT และนำไปสกัด RNA เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ MMP-9 ต่อไป การทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 หลุม

4. การวิเคราะห์ระดับของ mRNA MMP-9 ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

RNA จากเซลล์เตรียมโดยใช้ (Tri-reagent; MRC, OH, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต แล้วนำไปสังเคราะห์คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (Complementary DNA; cDNA) ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian

myeloblastosis virus; Promega, WI, USA) และ Oligo dT primer (Promega, WI, USA) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการพียูอาร์ (PCR; polymerase chain reaction) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนในแต่ละรอบดังนี้ Initial denaturation, Denaturation, Annealing และ Extension โดยการใช้สาย Primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence) ของ MMP-9 และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็น ตัวควบคุมภายใน (Internal control) ของการทดลอง จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคอมพลีเมนต์ทางรีดีเอ็นเอของ MMP-9 คือ 35 รอบ และ GAPDH คือ 24 รอบ ลำดับของ Nucleotide ของ Primer ที่ใช้คือ

MMP-9	sense	5' GACTCGGTCTTTGAGGAGCC 3'
	anti-sense	5' GAACTCACGCGCCAGTAGAA 3'
GAPDH	sense	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'
	anti-sense	5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการพียูอาร์แล้ว วิเคราะห์สายพันธุกรรมที่ได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (Agarose gel) ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 2

5. การวิเคราะห์ระดับโปรตีน MMP-9 ด้วยเทคนิคเจลลาตินไซโมกราฟี

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลลาตินไซโมกราฟี ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ในเจลที่มีความเข้มข้นของอคริลามายด์ (Acrylamide) ร้อยละ 10 และเจลลาติน (Gelatin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยเจลลาตินจะเป็นสารตั้งต้น (Substrate) สำหรับเอนไซม์ MMP ในกลุ่มเจลาติเนส เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว เจลจะถูกล้างด้วยสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 สามารถ รอบละ 10 นาที ก่อนนำไปป้อนในสารละลาย Developing buffer (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Brij35)

เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงย้อมเจลาด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, MO, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายผสมของเมทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 40 และร้อยละ 10 ตามลำดับ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายผสมของเมทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 5 และร้อยละ 7.5 ตามลำดับ) บริเวณที่มี MMP-9 จะปรากฏเป็นแถบโปรตีนเจลาสีน้ำเงิน ตำแหน่งของ MMP-9 บนเจลาจะตรวจสอบกับระดับของ MMP-9 ที่หลังจากเซลล์ไลน์ U₂OS ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งกระดูกของมนุษย์ (Human osteosarcoma cell line) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก (Positive control) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลาตินไซโมกราฟฟี

6. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสซาย (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)

อิทธิพลของสารหลังจากเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน MMP-9 ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA (R&D) ดั้งชั้นตอนโดยย่อต่อไปนี้คือ เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี Phenol red (Phenol red-free DME medium) ตลอดการทดลอง เพื่อกำจัดการรบกวนของสีในขั้นตอนการวัดการดูดกลืนแสงของเทคนิคนี้ ภายหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยบริษัท โดยอาศัยหลักการที่ว่า ในหลุมของ ELISA plate จะถูกเคลือบผิวไว้ด้วยแอนติบอดี (Antibody) ที่มีความจำเพาะกับ MMP-9 จากนั้น อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บหลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้น จะถูกนำมาเติม พร้อมกับ Antibody ตัวที่ 2 ที่มีความจำเพาะกับ MMP-9 เช่นเดียวกัน แต่คนละตำแหน่ง (Epitope) กับ Antibody ตัวแรก และปลายอีกด้านหนึ่งต่ออยู่กับ Biotin ซึ่งจะต่อกับตัวแสดงสัญญาณต่อไป ดังนั้น MMP-9 ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะจับกับ Antibody ทั้งสองตัว และถูกดึงมาติดที่ก้นหลุม จากนั้น Antibody ตัวที่ 2 และโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออก แล้วเติม Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin ซึ่งจะไปจับกับ Biotin จากนั้นเติมสารตั้งต้น

(Substrate) ของ peroxidase ก็จะทำให้เกิดเป็นสารละลายสีขึ้น แล้วนำสารละลายที่มีสีนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะคำนวณกลับมาเป็นปริมาณโปรตีนต่อไป จากนั้นปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จะถูกเปรียบเทียบเป็นปริมาณโปรตีนต่อ จำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค MTT แล้วจึงนำเสนอเป็นกราฟต่อไป

7. การยับยั้งผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-9 ด้วยตัวยับยั้งการทำงานของ Signaling molecules ชนิดต่างๆ

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมและกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธีการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ในสภาวะที่มีและไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของ MAPK pathway (ERK; extracellular signal-regulated kinase, JNK; c-Jun N-terminal kinase และ P38 kinase) ตัวยับยั้งการทำงานของ PI3K, Akt และ Rho kinase โดยจะมีกลุ่มควบคุมบวกคือกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ TGF- β และ กลุ่มควบคุมลบคือกลุ่มที่เติมเฉพาะตัวยับยั้งการทำงานของตัวยับยั้งการทำงานต่างๆข้างต้น และกลุ่มที่ไม่ได้รับการเติมสารใดๆ แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์ MMP-9 โดยเทคนิคเจลลาดินไซโมกราฟฟี

ผลของการวิจัย

ผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์

ผลการทดสอบในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ จำนวน 3 ไลน์ คือ HSC-2, HSC-5 และ HN-22 และผลทดสอบในเซลล์ไลน์ของมะเร็งเต้านม 1 ไลน์ คือ BT-549 โดยกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 0-10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ได้ทดสอบด้วยวิธี MTT assay แล้วพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ - ไม่ได้แสดงผล) และตรวจสอบระดับการแสดงออกของ MMP-9 โดยวิธีเจลาตินไซโมกราฟี พบว่าในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ทุกไลน์ มีระดับ MMP-9 ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่กลับพบว่าลดลงในเซลล์ไลน์ของมะเร็งเต้านมตามที่แสดงในรูปที่ 1A โดยระดับการเพิ่มขึ้นของ MMP-9 แปรผันตามความเข้มข้นของ TGF- β ตามลำดับ ซึ่งยืนยันผลการทดสอบอีกด้วยการวัดระดับ MMP-9 ที่เพิ่มขึ้นนี้ด้วยเทคนิค ELISA ดังที่แสดงในรูปที่ 1B

ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของเซลล์ไลน์จากมะเร็งต่างชนิดกัน ให้ผลในการตอบสนองที่ต่างกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่การตอบสนองต่อ TGF- β มีความจำเพาะต่อชนิดของมะเร็ง

คณะผู้วิจัยจึงทำการทดสอบในขั้นต่อไปโดยเลือก TGF- β มาเพียง 1 ความเข้มข้น คือ ที่ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยตรวจสอบระดับของ mRNA ของ MMP-9 หลังกระตุ้นด้วย TGF- β เป็นเวลา 16 ชั่วโมง รูปที่ 1C แสดงผลการทดลองในเซลล์ไลน์ HSC-5 ที่พบการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ MMP-9 ที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า TGF- β มีผลควบคุมการแสดงออกของ MMP-9 ในระดับยีน (ผลการทดลองในเซลล์ไลน์อื่นๆ ที่ทดสอบให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

ผลการทดลองในส่วนนี้ สนับสนุนว่า TGF- β น่าจะมีบทบาทในรอยโรคของมะเร็งชนิด ชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและใบหน้า

การตรวจสอบกลไกการกระตุ้น MMP-9 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ด้วย TGF- β โดยการใช้ตัวยับยั้งต่างๆ

ในการทดลองต่อมา เป็นการตรวจสอบกลไกการกระตุ้น MMP-9 ด้วย 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร TGF- β โดยการใช้ตัวยับยั้งต่างๆ ซึ่งผลการทดลองในเซลล์ไลน์ HSC 5 แสดงในรูปที่ 2 ซึ่งเป็นการใช้ตัวยับยั้งต่อ PI3K และ Akt และรูปที่ 3 แสดงผลของตัวยับยั้งต่อ MAPKs ทั้ง 3 กลุ่ม คือ ERK, JNK และ P38 kinase ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ตัวยับยั้งทั้ง 5 ไม่สามารถยับยั้งผลของ TGF- β ได้ คงมีเพียง Rho kinase inhibitor เท่านั้น ที่ยับยั้งการทำงานของ TGF- β ในการกระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 ได้ คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบในลักษณะเดียวกันนี้ในเซลล์ไลน์ HN-22 พบว่าให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือมีเพียงตัวยับยั้งของ Rho kinase เท่านั้น ที่ยับยั้งการทำงานของ TGF- β ในการกระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 ได้ (ไม่ได้แสดงผล)

การเพิ่มขึ้นของ MMP-9 เมื่อเซลล์ได้รับตัวยับยั้ง ERKI อาจเป็นเพราะ ERK เป็น inhibitory signaling ที่ควบคุมสมดุลของการแสดงออกของปกติของ MMP-9 อยู่แล้ว แต่เมื่อถูกยับยั้งก็จะทำให้ส่วนที่ ยับยั้งการส่งสัญญาณของการสร้าง MMP-9 หายไป จึงนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของระดับ MMP-9 ได้ (รูปที่ 3 แถวที่ 4)

TGF- β กระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 ในมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ผ่านทาง Smads

เนื่องจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วย TGF- β ในการเพิ่มระดับ MMP-9 ผ่านมาทาง Rho kinase ด้วยส่วนหนึ่ง อย่างไรก็ตามโดยปกติสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการจับของ TGF- β กับ TGF- β receptor จะผ่านไปตามเส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณของโมเลกุลในกลุ่ม Smads ดังนั้นการทดลองในส่วนนี้จะพิสูจน์ว่ากลไกการกระตุ้น MMP-9 ด้วย 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร TGF- β นั้นอีกส่วนหนึ่งที่ไม่ผ่านไปทาง Rho kinase นั้นจะผ่านไปกับ Smads หรือไม่ โดยการใช้ตัวยับยั้งต่อ Smad-

2 คือ SB431542 และ SB505124 เนื่องจากมี Smad-2/3 เป็น Smads คู่แรกที่มารับสัญญาณจาก TGF- β receptor ก่อนจะส่งสัญญาณไปยัง Smads อื่นๆ ต่อไป การทดลองทำในเซลล์ไลน์ HN-22 ผลแสดงในรูปแบบที่ 4 วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิคเจลาตินไซโมกราฟี พบว่า ตัวยับยั้งต่อ Smad-2 โดยเฉพาะ SB505124 สามารถลดระดับ MMP-9 ที่เพิ่มขึ้นลงได้อย่างชัดเจน ความเข้มข้นของ SB431542 และ SB505124 ที่ใช้ได้ทดสอบด้วยวิธี MTT assay แล้วพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ไม่ได้แสดงผล) จากผลการทดลองในส่วนนี้สรุปได้ว่า สัญญาณที่เกิดขึ้นผ่านไปมาตามเส้นทางของ Smads ด้วยเช่นกัน

ความสามารถในการยับยั้ง Smad-2 ของ SB505124 ยืนยันโดยผลการวิเคราะห์ระดับ Smad-2 ที่ทำงาน (phosphorylated Smad-2) โดยใช้เทคนิค Western blot ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5 ซึ่งพบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ระดับ phosphorylated Smad-2 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจากกลุ่มควบคุม และเมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β ในสภาวะที่มี SB505124 ระดับ phosphorylated Smad-2 ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ผลการทดสอบนี้ยืนยันความสามารถของ SB505124 ในการยับยั้งเส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณของโมเลกุลในกลุ่ม Smads

TGF- β กระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 ใน HN-22 ผ่านทาง Rho และ Smads

เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นผ่านไปได้ทั้งทาง Smad2/3 และ Rho kinase ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อว่าเส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณของ Smad2/3 และ Rho kinase เกี่ยวข้องกันหรือไม่อย่างไร การทดลองทำในเซลล์ไลน์ HN-22 ผลแสดงในรูปแบบที่ 6 วิเคราะห์จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Western blot พบว่า ระดับ phosphorylated Smad-2 ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วย TGF- β ลดลงเท่ากับระดับที่พบในกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อใช้ตัวยับยั้งต่อ Rho kinase

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณการกระตุ้นด้วย TGF- β เพื่อกระตุ้นการสร้าง MMP-9 นั้นผ่านไปที่ Rho kinase ก่อนที่จะผ่านไปตามการส่งถ่ายสัญญาณของโมเลกุลในกลุ่ม Smads

เซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อช่องปากมีการแสดงออกของ TGF- β

คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วยเพื่อทำการตรวจสอบว่า เนื้อเยื่อในช่องปากมีการแสดงออกของ TGF- β หรือไม่ โดยเก็บจากเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยที่ติดมากับฟันของผู้ป่วยที่มาถอนที่คณะทันตแพทยศาสตร์ และนำไปตรวจสอบหาการแสดงออกของ TGF- β โดยการสกัด RNA จากชิ้นเนื้อเหงือกดังแสดงผลในรูปที่ 7 ที่พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกทั้ง 3 ชิ้นจากผู้ป่วย 3 คนที่ตรวจสอบ พบการแสดงออกของ TGF- β mRNA ทั้งสามชิ้น ผลการทดลองในส่วนนี้สรุปได้ว่า โดยปกติในธรรมชาติ เซลล์ที่พบในบริเวณช่องปากสามารถสร้าง TGF- β ได้อยู่แล้วในระดับหนึ่ง

ผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เพาะเลี้ยงได้จากเนื้อเยื่อเหงือก

มีรายงานว่าเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินไปของรอยโรคมะเร็งหลายๆ ชนิด และการทดลองก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่า ในเนื้อเยื่อเหงือกมีการแสดงออกของ TGF- β ในระดับหนึ่ง การทดลองในส่วนนี้จึงต้องการศึกษาการตอบสนองของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกเมื่อได้รับ TGF- β ต่อการแสดงออกของ MMP-9 รวมทั้งกลไกการกระตุ้น ผลการทดลองในรูปที่ 8 ที่วิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิค ELISA แสดงให้เห็นว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกด้วย TGF- β ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการเพิ่มขึ้นของระดับ MMP-9 และเมื่อใช้ตัวยับยั้งของ Rho kinase พบว่าสามารถลดระดับ MMP-9 ลงได้ส่วนหนึ่ง แต่ไม่ทั้งหมด แสดงว่าในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือก TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งถ่ายทอดผ่านทาง Rho kinase สำหรับการทดลองในส่วนที่เติมตัวยับยั้งของ Rho kinase อย่าง

เดียว เป็นการแสดงให้เห็นว่า โดยลำพังของตัวยับยั้ง Rho kinase นั้นไม่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ MMP-9

สารหลังจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกกระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์

มีหลายรายงานที่แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันนั้นมีผลส่งเสริมต่อการดำเนินไปของรอยโรค การทดลองในส่วนนี้จึงได้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกมาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาให้กับเซลล์ไลน์ HN-22 แล้วเลี้ยงเซลล์ HN-22 ต่อไปอีก 48 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมาวิเคราะห์ระดับ MMP-9 ด้วยเทคนิค ELISA ตามที่แสดงผลไว้ในรูปที่ 9 พบว่า ระดับการสร้าง MMP-9 ของเซลล์ไลน์ HN-22 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกนั้นเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ

อย่างไรก็ตามสารหลังจากเซลล์เหงือกนั้นประกอบด้วยสารต่างๆมากมาย เพื่อพิสูจน์ว่า TGF- β อาจเป็นองค์ประกอบหนึ่งและมีผลในการกระตุ้นการสร้าง MMP-9 ในเซลล์ไลน์ HN-22 จึงเติม neutralizing antibody ต่อ TGF- β ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบแล้วว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT (ไม่ได้แสดงผล) พบว่า neutralizing antibody ต่อ TGF- β สามารถลดกระตุ้นการสร้าง MMP-9 ลงได้ถึงระดับเดียวกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า TGF- β เป็นองค์ประกอบหลักที่พบอยู่ในสารหลังจากเซลล์เหงือก ที่กระตุ้นการสร้าง MMP-9 สำหรับกลุ่มทดลองที่ใส่ neutralizing antibody ต่อ TGF- β เพียงอย่างเดียว พบว่าระดับการสร้าง MMP-9 ลดลงต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ยืนยันผลการศึกษาที่ว่าเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกสามารถสร้าง TGF- β ได้เองในสภาวะปกติและ TGF- β ที่สร้างได้เองนี้มีผลต่อระดับการแสดงออกพื้นฐาน (baseline expression) ของ MMP-9 ส่วนหนึ่ง

สารหลังจากเซลล์ไลน์ HN-22 กระตุ้นการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือก

การทดลองในส่วนนี้ทำในลักษณะเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่ในทางกลับกัน เพื่อแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันนั้นมีผลส่งเสริมการดำเนินไปของรอยโรค จึงได้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์ HN-22 มาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาให้กับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือก 3 ชุด ซึ่งเตรียมขึ้นจากชิ้นเหงือกที่ได้จากผู้ป่วย 3 คน แล้วเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกต่อไปอีก 48 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมาวิเคราะห์ระดับ MMP-9 ด้วยเทคนิค ELISA ตามที่แสดงผลไว้ในรูปที่ 10 พบว่า ระดับการสร้าง MMP-9 ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือกที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์ไลน์ HN-22 นั้นเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในทุกๆ ไลน์ของเซลล์เหงือก โดยเฉพาะในไลน์ที่ 3 เมื่อเทียบกับระดับ MMP-9 พื้นฐานของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกในแต่ละไลน์เอง ผลการทดลองในส่วนนี้สรุปได้ว่า สารหลังจากเซลล์มะเร็งสามารถกระตุ้นการสร้าง MMP-9 ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ สนับสนุนรายงานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันส่งเสริมการดำเนินไปของรอยโรค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ผลการวิจัย

ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ สนับสนุนแนวคิดที่ว่า การแพร่กระจายของมะเร็งเกิดขึ้นส่วนหนึ่งผ่านทาง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็ง และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยรอบ (Tisdale, 2004) และโมเลกุลตัวหนึ่ง ที่เชื่อมต่อกับปฏิสัมพันธ์นี้ คือ TGF- β

ความสัมพันธ์ระหว่าง TGF- β กับการเพิ่มขึ้นของ MMP-9 มีรายงานไว้ในมะเร็งบางชนิด (Kim et al., 2004; Kim et al., 2005; Sehgal et al., 1996; Sehgal and Thompson, 1999; Thomas et al., 2002) แต่ยังไม่มียางานที่กล่าวถึงกลไกการกระตุ้น MMP-9 โดย TGF- β ในระดับอณูชีววิทยามาก่อน ซึ่งใน รายงานนี้ นอกจากจะพบความสัมพันธ์ในมะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอแล้ว ยังได้พยายาม ทำความเข้าใจถึงกลไกการกระตุ้นที่เกิดขึ้นด้วย

โดยทั่วไปแล้ว การตอบสนองของเซลล์ต่อ TGF- β จะกระตุ้นให้เกิด Smad signaling pathway และ Smad complex ที่เกิดขึ้นจะผ่านเข้าสู่นิวเคลียส เพื่อไปจับกับ promoter region ของยีน อย่างไรก็ตาม บริเวณ promoter region ของ MMP-9 นั้นไม่มีรายงานว่ามียีนที่จับกับ Smad complex ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า กระบวนการกระตุ้น MMP-9 น่าจะเกิดผ่าน MAPKs ซึ่งเป็นสัญญาณที่พบได้ ใน non-Smad signaling pathway นอกจากนี้ ยังพบบริเวณที่จับของ AP-1 ที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ของ MAPKs ที่ตำแหน่ง promoter ของ MMP-9 ด้วย

อย่างไรก็ดี การที่ตัวยับยั้งของ MAPKs ที่ใช้ ไม่สามารถยับยั้งผลของ TGF- β ในการกระตุ้น MMP-9 ได้ น่าจะแสดงว่า กลไกที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดผ่าน MAPKs การที่ TGF- β inhibitor สามารถยับยั้งผลของการ เหนี่ยวนำ MMP-9 ได้ ยืนยันว่า ผลของ TGF- β ในการเหนี่ยวนำ MMP-9 เกิดจากการส่งสัญญาณผ่าน TGF- β Receptor และเมื่อตรวจสอบระดับของ Smad phosphorylation พบว่าระดับของ phosphorylation ลดลง ซึ่งสนับสนุนว่าสัญญาณการกระตุ้น MMP-9 จะเริ่มจากการกระตุ้นการทำงานของ Smad จากนั้น

สัญญาณน่าจะส่งผ่านไปยัง Rho kinase ซึ่งสนับสนุนโดยผลจากการใช้ Rho inhibitor ที่สามารถยับยั้งผลของ TGF- β ต่อ MMP-9 ได้

เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง Smad กับ Rho pathway พบว่า Rho น่าจะเกี่ยวข้องกับ phosphorylation ของ Smad เนื่องจาก Rho inhibitor สามารถลดระดับ phosphorylation ของ Smad ได้ ซึ่งความชัดเจนในส่วนนี้ จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

มีรายงานที่แสดงถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็ง และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพบว่า การเลี้ยงเซลล์ทั้งสองร่วมกัน จะมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม gelatinases ที่สามารถย่อย basement membrane (McKenna et al., 2002) ในการทดลองครั้งนี้ คณะผู้วิจัย ทดสอบปฏิสัมพันธ์นี้ ผ่านทางการใช้ conditioned medium ซึ่งผลการทดลองพบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สองชนิดนี้ ไม่จำเป็นต้องเกิดผ่านการสัมผัสระหว่างเซลล์ แต่สามารถเกิดผ่านทาง soluble factor ได้ ผลการทดลองแสดงว่า conditioned medium จากจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งให้หลั่ง MMP-9 เพิ่มขึ้น โดยผ่านทาง TGF- β ที่สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และในทำนองเดียวกัน conditioned medium จากเซลล์มะเร็ง สามารถเหนี่ยวนำการหลั่ง MMP-9 จากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ อย่างไรก็ตาม กลไกการกระตุ้นยังไม่ชัดเจน

อย่างไรก็ดี ผลการทดลองครั้งนี้อาจไม่สมบูรณ์ เนื่องจากระหว่างทำการวิจัยมีปัญหาเรื่องการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการและพฤติกรรมแสดงออกของเซลล์ HSC-5 ในส่วนของการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-9 ที่ลดลงจนมีปัญหว่าไม่สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ได้อย่างน่าเชื่อถือ ซึ่งผู้วิจัยได้ขอเซลล์ใหม่จากประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเซลล์ใหม่ที่ได้รับก็มีปัญหาเรื่องระดับการแสดงออกของเอนไซม์เช่นกัน ดังนั้นผลการศึกษาในช่วงหลังจึงจำเป็นต้องศึกษาใน HN-22 ซึ่งให้ผลในการตอบสนองต่อ TGF- β ในลักษณะเดียวกัน (รูปที่ 1A) โดยในรูปที่ 1A จะเห็นว่า มีระดับการแสดงออกของ MMP-9 ที่ชัดเจนกว่า HSC-5

แต่เนื่องจากการทดลองในลำดับต่อๆ มาระดับการแสดงออกที่ตรวจวัดได้น้อยกว่า HSC-5 รูปแบบการนำเสนोजึงแสดงการทดลองใน HSC-5 ในช่วงแรก และกลับมานำเสนอผลการศึกษาใน HN-22 ในช่วงท้าย ดังเหตุผลที่อธิบายไว้ข้างต้น

สรุป

ผลการทดลองแสดงว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของศีรษะและลำคอ หลัง MMP-9 เพิ่มขึ้น สัญญาณการกระตุ้นจะเกิดผ่าน crosstalk ระหว่าง Smad และ Rho kinase pathway นอกจากนี้ เซลล์มะเร็งยังสามารถกระตุ้นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันให้หลัง MMP-9 เพิ่มขึ้น แต่กลไกการเหนี่ยวนำยังไม่มีความชัดเจน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Akhurst, R. J., and Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11, S44-51.
- Attisano, L., and Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646-1647.
- Bachelder, R. E., Yoon, S. O., Franci, C., de Herreros, A. G., and Mercurio, A. M. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 168, 29-33.
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L., and Arteaga, C. L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275, 36803-36810.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., and Moses, H. L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 27-36.
- Charous, S. J., Stricklin, G. P., Nanne, L. B., Nettekville, J. L., and Burkey, B. B. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106, 271-278.
- Dang, D., Yang, Y., Li, X., Atakilit, A., Regezi, J., Eisele, D., Ellis, D., and Ramos, D. M. (2004). Matrix metalloproteinases and TGFbeta1 modulate oral tumor cell matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 937-942.
- Day, R. M., Cioce, V., Breckenridge, D., Castagnino, P., and Bottaro, D. P. (1999). Differential signaling by alternative HGF isoforms through c-Met: activation of both MAP kinase and PI 3-kinase pathways is insufficient for mitogenesis. *Oncogene* 18, 3399-3406.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.
- Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N. E., ten Dijke, P., Heldin, C. H., and Landstrom, M. (2003). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-

beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell* 14, 529-544.

Edwards, D. R., Murphy, G., Reynolds, J. J., Whitham, S. E., Docherty, A. J., Angel, P., and Heath, J. K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J* 6, 1899-1904.

Fahey, M. S., Paterson, I. C., Stone, A., Collier, A. J., Heung, Y. L., Davies, M., Patel, V., Parkinson, E. K., and Prime, S. S. (1996). Dysregulation of autocrine TGF-beta isoform production and ligand responses in human tumour-derived and Ha-ras-transfected keratinocytes and fibroblasts. *Br J Cancer* 74, 1074-1080.

Friess, H., Yamanaka, Y., Buchler, M., Ebert, M., Beger, H. G., Gold, L. I., and Korc, M. (1993). Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 105, 1846-1856.

Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M., and Boyd, D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* 271, 10672-10680.

Han, Y. P., Tuan, T. L., Hughes, M., Wu, H., and Garner, W. L. (2001). Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 276, 22341-22350.

Hong, S. D., Hong, S. P., Lee, J. I., and Lim, C. Y. (2000). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 36, 207-213.

Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114, 569-581.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Shirai, Y., Kiso, S., Tsushima, H., and Matsuzawa, Y. (1995). Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 89, 45-48.

Ito, Y., Zhao, J., Mogharei, A., Shuler, C. F., Weinstein, M., Deng, C., and Chai, Y. (2001). Antagonistic effects of Smad2 versus Smad7 are sensitive to their expression level during tooth development. *J Biol Chem* 276, 44163-44172.

- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., and Itohara, S. (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58, 1048-1051.
- Kamaraju, A. K., and Roberts, A. B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 280, 1024-1036.
- Katori, H., Baba, Y., Imagawa, Y., Nishimura, G., Kagesato, Y., Takagi, E., Ishii, A., Yanoma, S., Maekawa, R., Yoshioka, T., *et al.* (2002). Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. *Cancer Lett* 178, 151-159.
- Kim, E. S., Kim, M. S., and Moon, A. (2004). TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 25, 1375-1382.
- Kim, E. S., Kim, M. S., and Moon, A. (2005). Transforming growth factor (TGF)-beta in conjunction with H-ras activation promotes malignant progression of MCF10A breast epithelial cells. *Cytokine* 29, 84-91.
- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1998). Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 94, 353-362.
- Kupferman, M. E., Fini, M. E., Muller, W. J., Weber, R., Cheng, Y., and Muschel, R. J. (2000). Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* 157, 1777-1783.
- Matsushita, A., Onda, M., Uchida, E., Maekawa, R., and Yoshioka, T. (2001). Antitumor effect of a new selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, on experimental pancreatic cancer. *Int J Cancer* 92, 434-440.
- McKenna, G. J., Chen, Y., Smith, R. M., Meneghetti, A., Ong, C., McMaster, R., Scudamore, C. H., and Chung, S. W. (2002). A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas. *Am J Surg* 183, 588-594.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

- Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., and Heldin, C. H. (2002). Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 82, 85-91.
- Muro-Cacho, C. A., Rosario-Ortiz, K., Livingston, S., and Munoz-Antonia, T. (2001). Defective transforming growth factor beta signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by the lack of expression of activated Smad2. *Clin Cancer Res* 7, 1618-1626.
- O-charoenrat, P., Modjtahedi, H., Rhys-Evans, P., Court, W. J., Box, G. M., and Eccles, S. A. (2000). Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 60, 1121-1128.
- O-charoenrat, P., Rhys-Evans, P., Court, W. J., Box, G. M., and Eccles, S. A. (1999). Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 17, 631-639.
- O-Charoenrat, P., Rhys-Evans, P. H., and Eccles, S. A. (2001). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127, 813-820.
- Ogawa, K., Chen, F., Kuang, C., and Chen, Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *Biochem J* 381, 413-422.
- Ohta, M., Konno, H., Tanaka, T., Baba, M., Kamiya, K., Oba, K., Kaneko, T., Syouji, T., Igarashi, A., and Nakamura, S. (2001). Effect of combination therapy with matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 92, 688-695.
- Paterson, I. C., Matthews, J. B., Huntley, S., Robinson, C. M., Fahey, M., Parkinson, E. K., and Prime, S. S. (2001). Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 193, 458-467.
- Sanchez-Capelo, A. (2005). Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 15-34.
- Santibanez, J. F., Guerrero, J., Quintanilla, M., Fabra, A., and Martinez, J. (2002). Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the

Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 267-273.

Sehgal, I., Baley, P. A., and Thompson, T. C. (1996). Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res* 56, 3359-3365.

Sehgal, I., and Thompson, T. C. (1999). Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 10, 407-416.

Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.

Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., and Liotta, L. A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9, 541-573.

ten Dijke, P., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 64-70.

Thomas, G. J., Hart, I. R., Speight, P. M., and Marshall, J. F. (2002). Binding of TGF-beta1 latency-associated peptide (LAP) to alpha(v)beta6 integrin modulates behaviour of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer* 87, 859-867.

Tian, F., DaCosta Byfield, S., Parks, W. T., Yoo, S., Felici, A., Tang, B., Piek, E., Wakefield, L. M., and Roberts, A. B. (2003). Reduction in Smad2/3 signaling enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer Res* 63, 8284-8292.

Tisdale, M. J. (2004). Tumor-host interactions. *J Cell Biochem* 93, 871-877.

Wakefield, L. M., and Roberts, A. B. (2002). TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12, 22-29.

Wikstrom, P., Stattin, P., Franck-Lissbrant, I., Damber, J. E., and Bergh, A. (1998). Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 37, 19-29.

Wood, M., Fudge, K., Mohler, J. L., Frost, A. R., Garcia, F., Wang, M., and Stearns, M. E. (1997). In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 15, 246-258.

Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace, A. J., Jr., Liebermann, D. A., Bottinger, E. P., and Roberts, A. B. (2003). Transforming growth factor-beta-induced

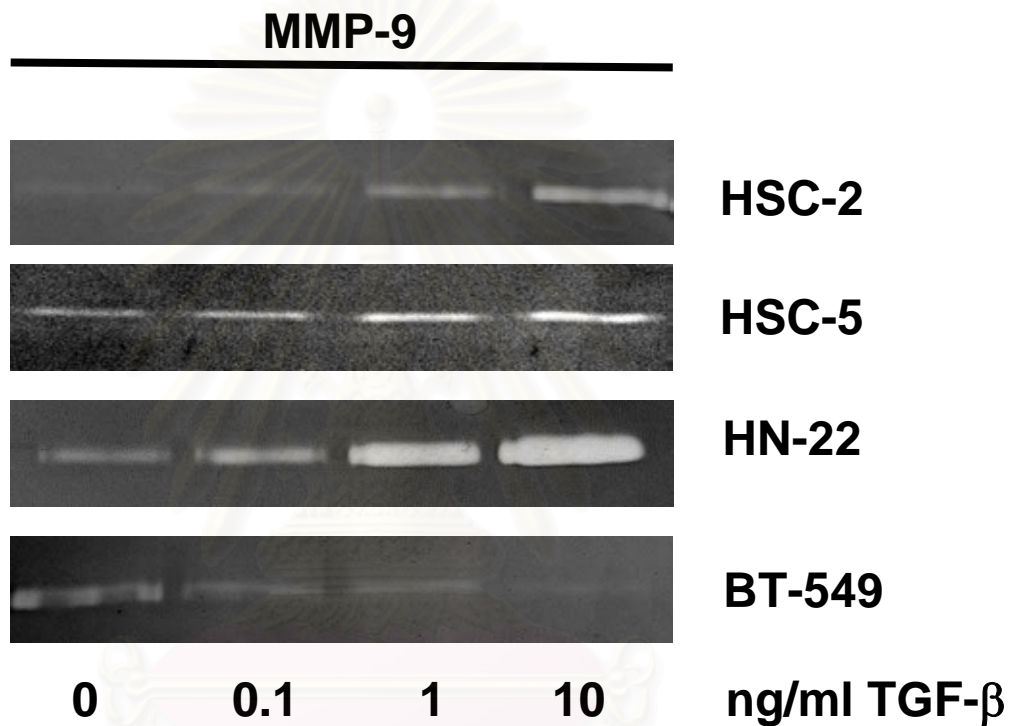
apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. J Biol Chem 278, 43001-43007.

Zhang, Y., Musci, T., and Derynck, R. (1997). The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. Curr Biol 7, 270-276.

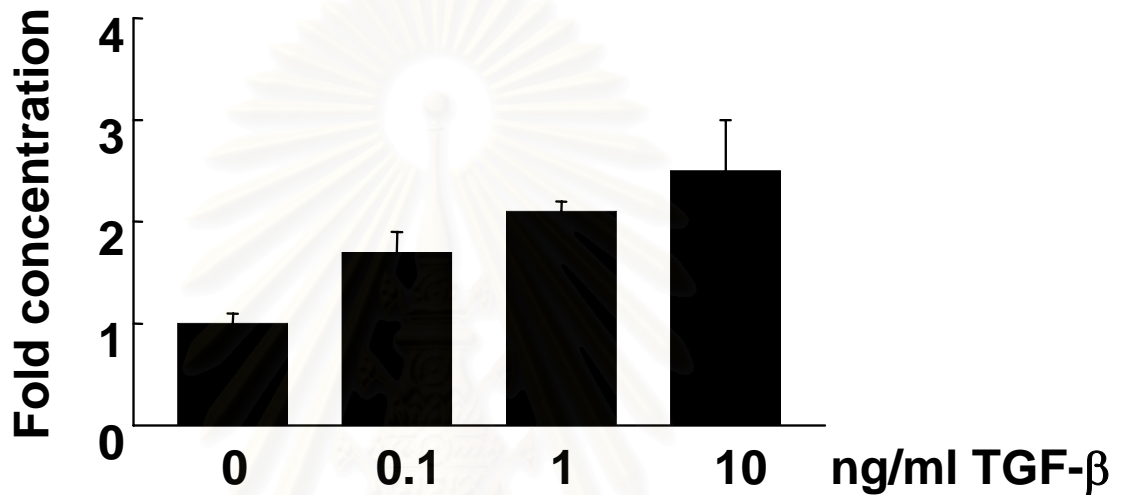
Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., and Hung, M. C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. Nat Cell Biol 6, 931-940.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

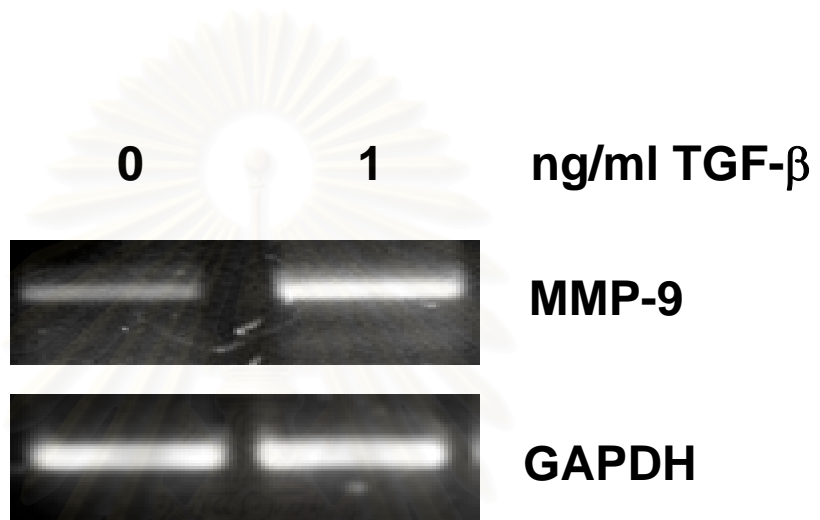


รูปที่ 1 A) เจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-2, HSC-5, HN-22 และ BT-549 ภายหลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร



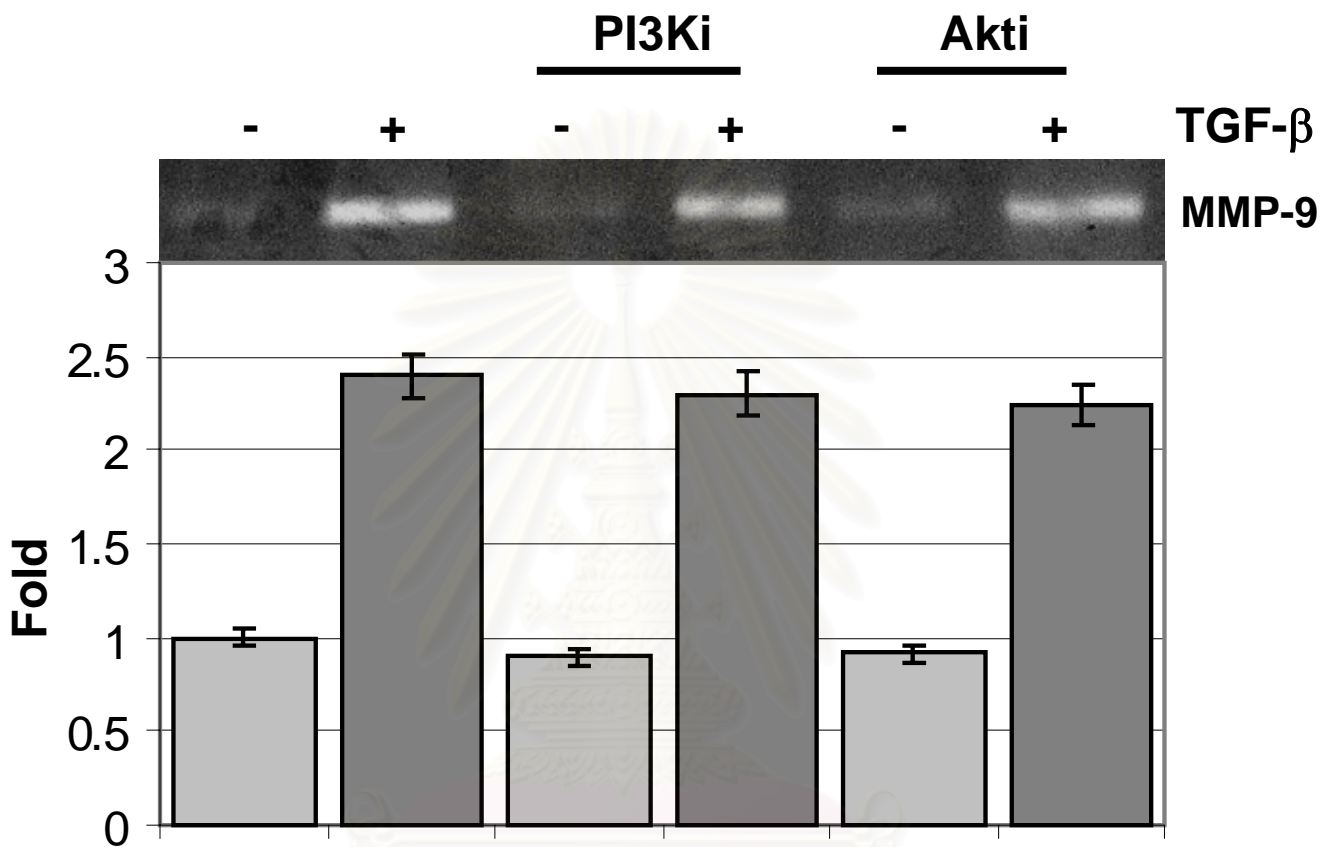
รูปที่ 1 B) ภาพแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ HSC-5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

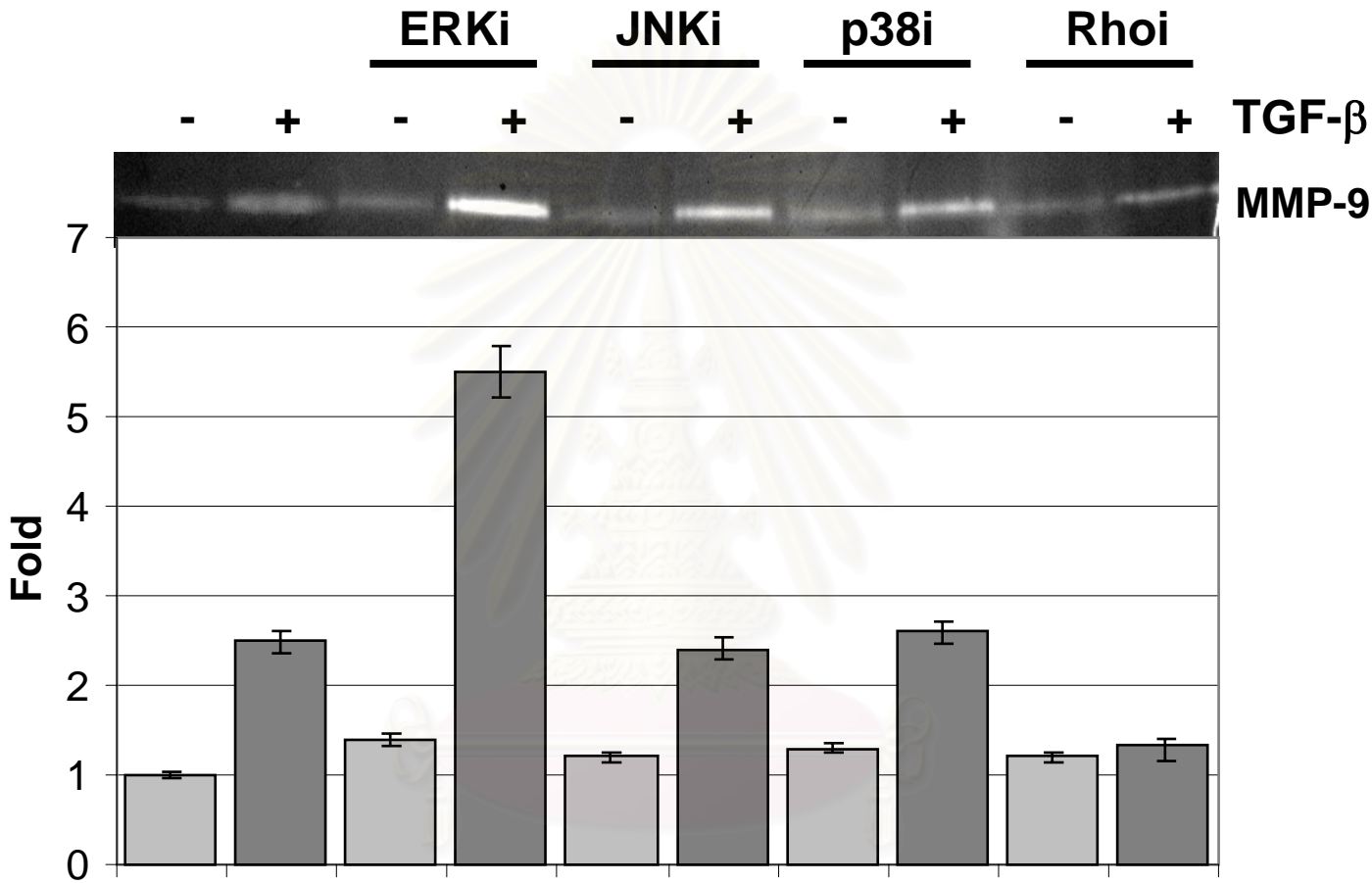


รูปที่ 1 C) ภาพแสดงระดับของอาร์เอ็นเอรหัสของ MMP-9 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ HSC-5 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของ GAPDH ที่เท่ากัน

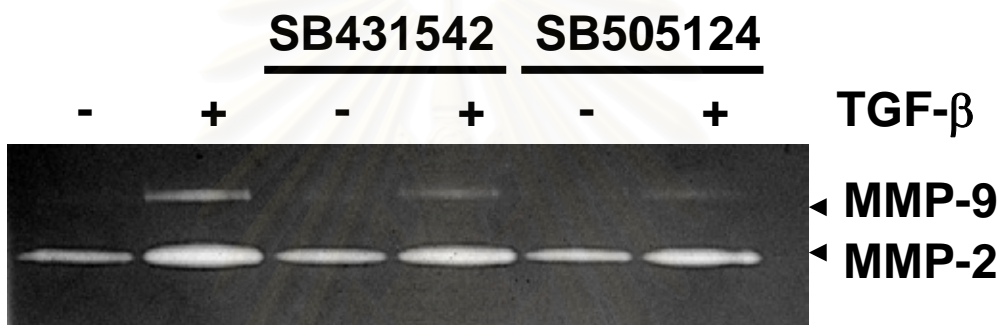
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 เจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-5 ภายหลังจากในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย TGF-β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ ตัวยับยั้งโมเลกุลถ่ายทอดสัญญาณที่มีความจำเพาะต่อ PI3K และ Akt กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับ MMP-9 วิเคราะห์โดยโปรแกรม Scion

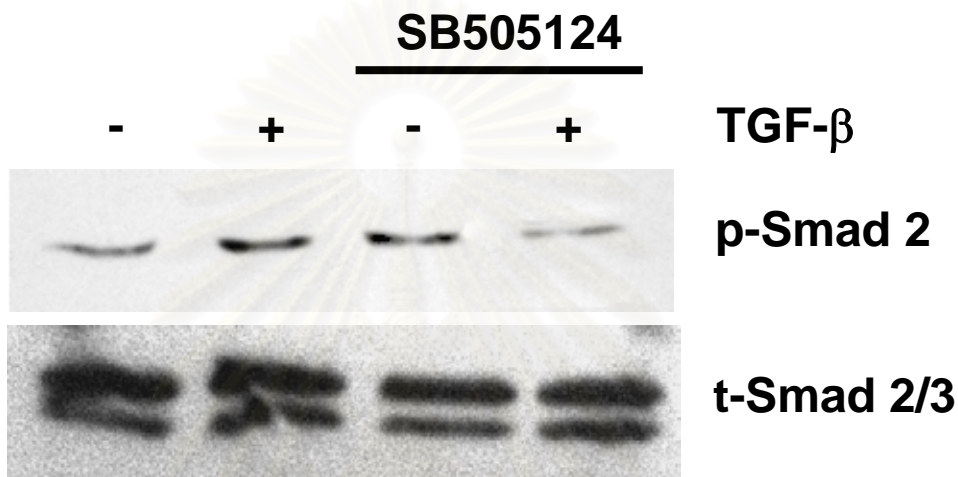


รูปที่ 3 เจลาตินไซโมกราฟที่แสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HSC-5 ภายหลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย TGF-β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ ตัวยับยั้งโมเลกุลถ่ายทอดสัญญาณที่มีความจำเพาะต่อ ERK, JNK, p38 kinase และ Rho kinase กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับ MMP-9 วิเคราะห์โดยโปรแกรม Scion



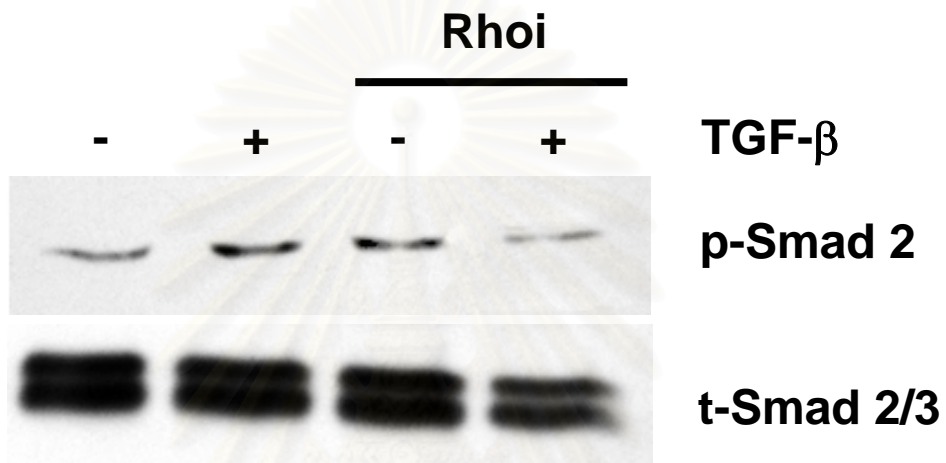
รูปที่ 4 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-9 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HN-22 ภายหลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้นหรือกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือร่วมกับการได้รับตัวยับยั้งต่อ Smad-2 (SB431542 และ SB505124)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



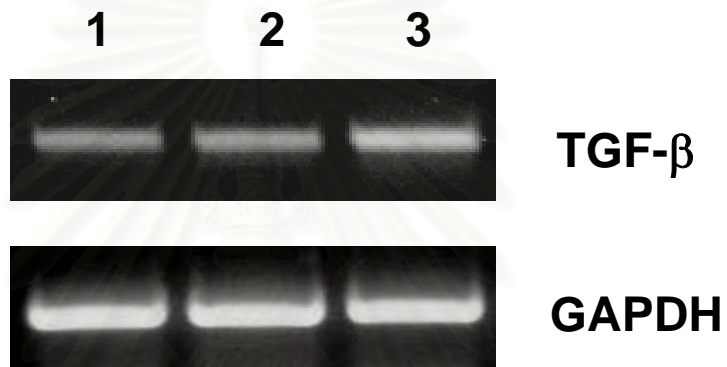
รูปที่ 5 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของระดับ Smad 2 ที่ทำงาน (phosphorylated Smad-2; p-Smad 2) ต่อ ปริมาณ Smad 2/3 ทั้งหมด (t-Smad 2/3) ของเซลล์ HN-22 ภายหลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือร่วมกับ การได้รับตัวยับยั้งต่อ Smad-2 (SB505124) วิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



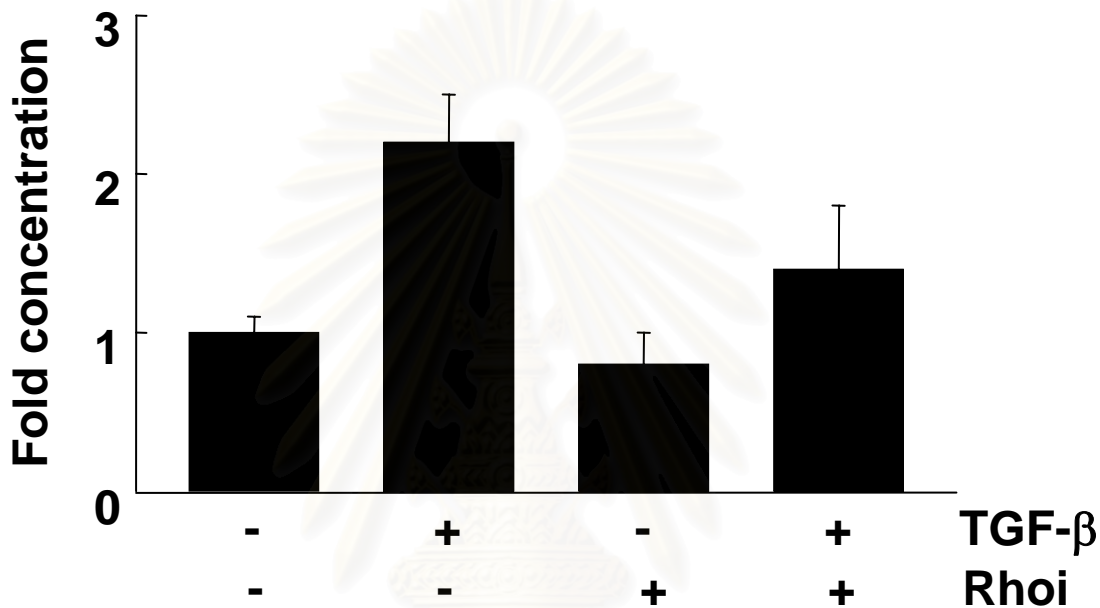
รูปที่ 6 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของระดับ Smad 2 ที่ทำงาน (phosphorylated Smad-2; p-Smad 2) ต่อ ปริมาณ Smad 2/3 ทั้งหมด (t-Smad 2/3) ของเซลล์ HN-22 ภายหลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือร่วมกับ การได้รับตัวยับยั้งต่อ Rho kinase (Rhoi) วิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot

Gingival tissues

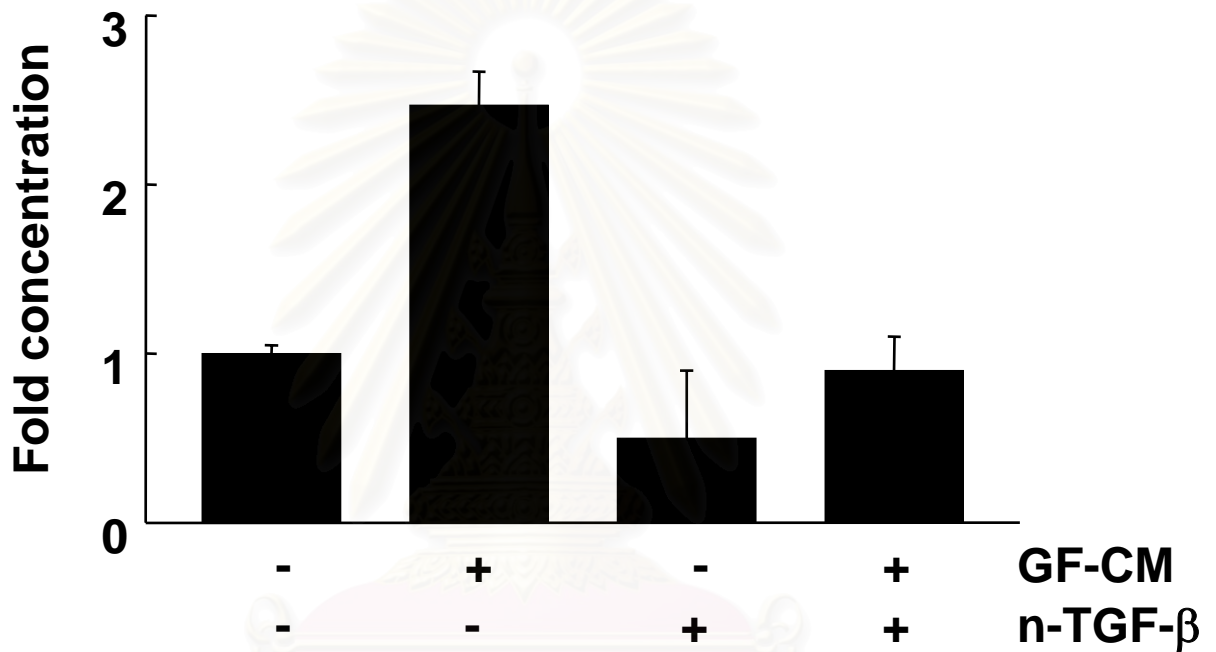


รูปที่ 7 ภาพแสดงระดับการแสดงออกในระดับยีน (อาร์เอ็นเอเข้ารหัส) ของ TGF- β ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกปกติของคน 3 คน เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของ GAPDH ที่เท่ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

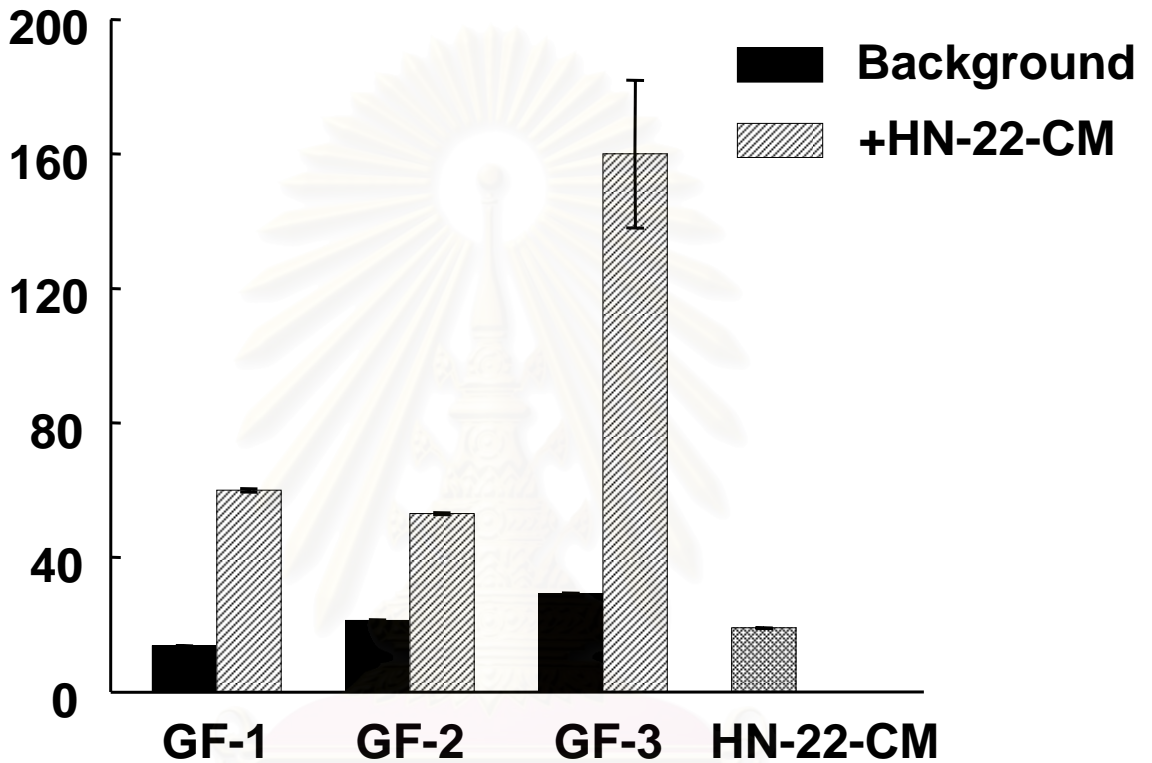


รูปที่ 8 ภาพแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ได้จากเหงือก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร TGF-β เซลล์ที่ได้รับเฉพาะตัวยับยั้ง Rho kinase (Rhoi) และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร TGF-β ร่วมกับได้รับตัวยับยั้ง Rho kinase วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA



รูปที่ 9 ภาพแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ไลน์ HN-22 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเหงือกมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (GF-CM) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เซลล์ที่ได้รับเฉพาะ neutralizing antibody ต่อ TGF-β (n-TGF-β) เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเหงือก ร่วมกับได้รับ neutralizing antibody ต่อ TGF-β วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA

MMP-9 (ng/ml)



รูปที่ 10 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน MMP-9 ภายหลังทำการเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเหงือก 3 ไลน์จากผู้ป่วย 3 คน (GF-1, 2, 3) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ไลน์ HN-22 มาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (HN-22-CM) โดยเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกพื้นฐานของ MMP-9 ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเหงือกในแต่ละไลน์ วิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA