

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42197



**GENE EXPRESSION PROFILE OF CHOLANGIOCARCINOMA-
ASSOCIATED FIBROBLAST AND ROLES IN CANCER
PROGRESSION**

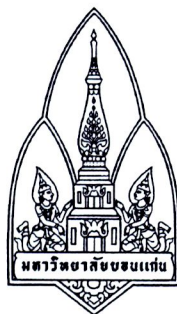
MISS KUSUMAWADEE UTISPAN

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2010



E42197



**GENE EXPRESSION PROFILE OF CHOLANGIOCARCINOMA-
ASSOCIATED FIBROBLAST AND ROLES IN CANCER
PROGRESSION**



MISS KUSUMAWADEE UTISPAN

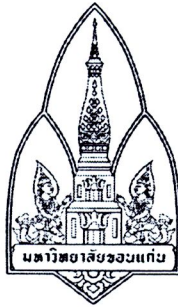
**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2010

**GENE EXPRESSION PROFILE OF CHOLANGIOCARCINOMA-
ASSOCIATED FIBROBLAST AND ROLES IN CANCER
PROGRESSION**

MISS KUSUMAWADEE UTISPAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MEDICAL BIOCHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2010**



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MEDICAL BIOCHEMISTRY

Thesis Title: Gene expression profile of cholangiocarcinoma-associated fibroblast and roles in cancer progression


Author: Miss Kusumawadee Utispan

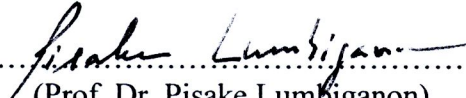
Thesis Examination Committee:	Assoc. Prof. Dr. Tuangporn Suthiphongchai	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham	Member
	Dr. Kulthida Vaeteewoottacharn	Member
	Asst. Prof. Dr. Chanitra Thuwajit	Member
	Asst. Prof. Dr. Peti Thuwajit	Member

Thesis Advisors:


.....
(Asst. Prof. Dr. Chanitra Thuwajit) Advisor


.....
(Asst. Prof. Dr. Peti Thuwajit) Co-Advisor


.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School


.....
(Prof. Dr. Pisake Lumbiganon)
Dean, Faculty of Medicine

กุสุมาวดี อุทิศพันธ์. 2553. แบบแผนการแสดงออกของจีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมะเร็ง
ท่อน้ำดีและบทบาทในกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญา
ดุสิตบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. ชนิตรา ธูวจิตต์, ผศ. ดร. ปิติ ธูวจิตต์

บทคัดย่อ

E 42197

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเนื้อเยื่อมะเร็งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง
เยื่อหุ้มหลายชนิด ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่บ่งชี้บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ต่อ
กระบวนการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเป็นมะเร็งที่พบอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย การศึกษา
ในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่คัดแยก
จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อตับปกติด้วยเทคนิค
oligonucleotide microarray และศึกษาบทบาทของจีนที่เปลี่ยนแปลงดังกล่าวต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อผู้ป่วย
ที่ได้รับการพิสูจน์จากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 1 ราย เปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบ
ลาสต์จากเนื้อเยื่อตับปกติจากผู้ป่วยจำนวน 2 ราย พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของจีนจำนวน
1,466 จีน และจีนที่มีการแสดงออกลดลงจำนวน 495 จีน จากภาพรวมของจีนที่แสดงออกพบว่า
เซลล์ไฟโบรบลาสต์น่าจะมีส่วนร่วมในการกระตุ้นการพัฒนาของมะเร็ง แม้ว่าจะมีบางจีนที่มี
แนวโน้มในการยับยั้งมะเร็งได้

ในกลุ่มจีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และกำหนดการสร้างโปรตีนที่มีรายงานบทบาท
เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของมะเร็งได้ถูกคัดเลือกมายืนยันระดับการสร้างด้วยเทคนิค relative
quantification real time PCR พบว่าจีน *ADAM12*, *AREG*, *ER*, *JAGL1*, *PDGF-A*, *PN* และ
SCG2 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและสอดคล้องกับผลที่ได้จากเทคนิค microarray
ในกลุ่มจีนที่ผ่านการยืนยันการแสดงออกทั้งหมดนี้ จีน *periostin* (*PN*) ได้ถูกเลือกเพื่อนำมา
ศึกษาบทบาทต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีน *PN*
มีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง โดยควบคุมการแบ่งตัว การรุกรานของ
เซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ในมะเร็งหลายชนิด การวัดระดับการแสดงออก
ของ *PN* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า *PN* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งใน
ระดับ mRNA และโปรตีนเปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติ เมื่อศึกษาการแสดงออกของ
PN ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า *PN* มีการสร้างเฉพาะจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มี
คุณสมบัติเป็น activated fibroblast โดยไม่พบการแสดงออกของ *PN* ในเซลล์มะเร็งและเซลล์
อื่นๆ และยังพบว่า *PN* มีการแสดงออกในระดับต่ำมากในเนื้อเยื่อมะเร็งตับและเนื้อตับ
ที่มีการอักเสบแต่ไม่เป็นมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของ *PN* ที่สูงในเซลล์

E42197

ไฟโบรบลาสต์ของมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตที่ต่ำของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.026$) และผลการวิเคราะห์ทางสถิติแบบหลายตัวแปรบ่งชี้ว่าระดับการแสดงออกของ PN ที่สูง ($P = 0.045$) และภาวะการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง ($P = 0.002$) เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ไม่ขึ้นต่อกันในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า recombinant PN สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวและการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่ถูกกระตุ้น และเมื่อใช้เทคนิค interference RNA และ anti-integrin $\alpha 5\beta 1$ antibody เพื่อยับยั้งการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ชนิด integrin $\alpha 5$ และยับยั้งการเข้าจับกันของ PN และ integrin $\alpha 5 \beta 1$ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แล้วทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย PN พบว่าการแบ่งตัวและการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวัดปริมาณตัวรับสัญญาณในเซลล์พบว่า pAKT มีระดับลดลงในขณะที่ pERK ไม่เปลี่ยนแปลง ทั้งหมดนี้บ่งชี้ว่า PN กระตุ้นการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านตัวรับ integrin $\alpha 5\beta 1$ และเส้นทางการส่งสัญญาณผ่าน AKT

โดยสรุปการศึกษานี้เน้นเป็นการศึกษาแรกที่แสดงแบบแผนการแสดงออกของจีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และบ่งชี้จีนที่น่าจะมีบทบาทในการส่งเสริมกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง PN ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มจีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี อาจใช้เป็นตัวพยากรณ์โรคสำหรับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้โดย PN ที่สร้างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีบทบาทสำคัญต่อการส่งเสริมกระบวนการแบ่งตัวและการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านตัวรับ integrin $\alpha 5\beta 1$ และเส้นทางการส่งสัญญาณผ่าน AKT ผลการศึกษานี้ยืนยันบทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกระบวนการพัฒนามะเร็งท่อน้ำดี และสนับสนุนแนวคิดในการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ สารที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้าง หรือเส้นทางการส่งสัญญาณภายในเซลล์มะเร็งจากการเหนี่ยวนำโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเป้าหมายในการยับยั้งการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีร่วมกับยาเคมีบำบัด เพื่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพ

Kusumawadee Utispan. 2010. **Gene expression profile of CCA-associated fibroblast and roles in cancer progression.** Doctor of Philosophy Thesis in Medical Biochemistry, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Asst. Prof. Dr. Chanitra Thuwajit,
Asst. Prof. Dr. Peti Thuwajit

ABSTRACT

E42197

Cancer-associated fibroblasts play important roles in several carcinomas. Up to date, there has been no report on cancer-associated fibroblasts regarding CCA, a cancer with high incidence in Thailand. This project is aimed to investigate the differential gene expression profile of CCA-associated fibroblasts in comparison to that of non-tumorigenic liver fibroblasts using oligonucleotide microarray and the tumorigenic function of an altered gene on CCA cells is explored.

Gene expression profile of CCA-associated fibroblasts isolated from one histoproven CCA patient in comparison to two non-tumorigenic liver fibroblasts obtained from two CCA patients revealed 1,466 up-regulated and 495 down-regulated genes. In overview, most genes expressed in CCA-derived fibroblasts have pro-tumorigenic effect, though a part of genes trend to have anti-tumorigenic effect.

Seven up-regulated genes encoded secreted proteins having carcinogenic properties *ADAM12*, *AREG*, *ER*, *JAGLI*, *PDGF-A*, *PN* and *SCG2* were confirmed by relative quantification real time PCR in concordance to the microarray result. Among them, periostin (PN) was selected for further study. PN is a multi-functional protein involved in several tumorigenic properties including cell proliferation, invasion and induction of neoangiogenesis in the previous study. PN was markedly over-expressed at both mRNA and protein levels in CCA-associated fibroblasts. From immunohistochemical study, PN was exclusively expressed in cancer fibroblasts, but not in cancer or other cells in CCA tissues. Low-to-no expression of PN was observed in tissues of benign liver diseases and hepatocellular carcinoma. In addition, CCA patients with high levels of PN had significantly shorter survival time than those with low levels ($P = 0.026$). Multivariate analysis revealed high PN level ($P = 0.045$) and

presence of lymph node metastasis ($P = 0.002$) as independent poor prognostic factors in CCA patients.

The *in vitro* study revealed that recombinant PN significantly induced CCA cell proliferation and invasion compared to the untreated cells. Using interference RNA against *integrin $\alpha 5$* and anti-integrin $\alpha 5\beta 1$ neutralizing antibody, the result showed that induction of PN in CCA cell proliferation and invasion were significantly decreased. Moreover, the measurement of pAKT and pERK in cells treated with PN showed the decreased level of pAKT, but not pERK, when integrin $\alpha 5\beta 1$ expression was inhibited. Taken together, the results suggest that PN induces CCA proliferation and invasion via integrin $\alpha 5\beta 1$ and PN-induced invasion probably triggers AKT-dependent signal pathway.

Up to our knowledge, this study is the first report about gene expression profile of CCA-associated fibroblasts and has determined the genes involving in induction of cancer progression. PN was up-regulately expressed in CCA-derived fibroblasts and its expression level can be used to distinguish CCA from other hepatocellular carcinoma and benign liver diseases and as a prognostic factor of poor survival in CCA patients. Molecular mechanism of fibroblast-derived PN indicates the activation of cancer cell invasion through integrin $\alpha 5\beta 1$ and AKT dependent signal pathway. In conclusion, this study highlights roles of CCA-associated fibroblasts in cancer progression and supports the hypothesis to target fibroblasts, fibroblast-derived substances, and their activated intra-CCA signal pathways as therapeutic targets to attenuate cancer progression. In addition to the conventional chemotherapy, targeting fibroblasts may help to improve the efficiency of CCA patient treatment.

**Goodness portion to the present thesis is dedicated for my advisors,
cholangiocarcinoma patients, entire teaching staffs and my family.**

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my faithful and sincere gratitude to my advisor, Asst. Prof. Dr. Chanitra Thuwajit, who put so much energy on me to advise, concern, and support as well as take a very good care of me. My appreciation is sincerely given to her for providing me an opportunity to receive a CHE-Ph.D. scholarship to study in Medical Biochemistry.

I would like to express my sincere gratitude to my co-advisor, Asst. Prof. Dr. Peti Thuwajit for his valuable advices, kindness suggestion throughout the work.

I wish to express my sincere thankfulness to Prof. Dr. Yoshimitsu Abiko, my oversea collaborator who hosted me abroad and provided me to perform genome wide expression analysis with the precious comment and suggestion.

I wish to express my sincere thankfulness to Assoc. Prof. Dr. Tuangporn Suthiphongchai for serving as a chairman of my thesis examination committee and providing valuable suggestion and comment.

I wish to express my sincere thankfulness to Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham and Dr. Kulthida Vaeteewoottacharn for serving as my examiners and providing the valuable suggestion and comment.

I would like to thank the Commission on Higher Education, Thailand for supporting me under the Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree and University Mobility in Asia and the Pacific for the scholarship to do the research in Japan. Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center and entire staffs are sincerely thanked for providing the specimens and clinical data. Gratefulness is expressed to all staffs at Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Khen University and Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for supporting throughout the work

Finally, I wish to express my gratitude and truly appreciation to my family, for their love, cheerfulness and devoting throughout my life.

Kusumawadee Utispan

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Background and rationale	1
1.2 Research questions	2
1.3 Hypothesis	3
1.4 Objectives	3
1.5 Conceptual framework	3
1.6 Research design	5
1.7 Anticipated outcomes	7
1.8 Applications	7
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	9
2.1 Cholangiocarcinoma	9
2.2 Stromal-epithelial interaction in cancers	18
2.3 Cancer-associated fibroblasts	21
2.4 Gene expression profile of fibroblasts in human cancers	27
2.5 Stromal therapy as a new strategy in cancer treatment	29
2.6 Cancer-associated fibroblasts and CCA	32
2.7 Periostin	33
2.8 Integrin	40

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	51
3.1 Materials	51
3.2 Methods	56
CHAPTER IV RESULTS	71
4.1 Gene expression analysis of CCA fibroblasts	71
4.2 Gene validation and confirmation of PN expression in Cfs	81
4.3 Expression of PN in CCA tissues and clinicopathological relevance	83
4.4 PN promotes proliferation and invasion of CCA cells	89
4.5 Integrin alpha 5 expression on biliary epithelial and CCA cells	95
4.6 ITGa5 mediates PN-induced proliferation and invasion	97
4.7 ITGa5 β 1 receptor-mediated CCA invasion induced by PN	99
4.8 PN promotes CCA cell invasiveness via ITGa5 β 1 and AKT signaling pathway	100
CHAPTER V DISCUSSIONS AND CONCLUSION	103
5.1 Discussions	103
5.2 Conclusion	115
5.3 Limitation and suggestions for further studies	117
REFERENCES	119
APPENDICES	143
APPENDIX A Primary culture fibroblasts and human biliary epithelial cell lines	145
APPENDIX B Raw data of PN expression in CCA tissues	151
APPENDIX C RNA extraction and melting curve analysis of real time PCR	157

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
APPENDIX D Standard curve of cell proliferation assay	163
APPENDIX E Raw data of ITG α 5 detection on biliary epithelial cells using Flow cytometry	165
APPENDIX F Secretome analysis of CCA-associated fibroblasts	167
APPENDIX G <i>O. viverrini</i> excretory/secretory product induced <i>PN</i> expression in non-tumorigenic liver fibroblast	177
RESEARCH PRESENTATIONS AND PUBLICATION	181
VITAE	185

LIST OF TABLES

	Page
Table 2-1 Preclinical approaches supporting potential therapeutic of Molecular targeting strategies against biliary tract cancer cells	18
Table 2-2 Fibroblast derived-growth factors and roles in cancers	24
Table 2-3 Therapeutics targeting stroma-tumor interaction	31
Table 2-4 Expression of PN in normal and cancers	35
Table 2-5 Different roles of PN in human cancers	37
Table 2-6 Integrin expression and cancer biology	44
Table 3-1 Lists of the important chemical materials	53
Table 3-2 Lists of the important instruments used in this study	55
Table 3-3 PCR condition for gene validation using real time PCR	60
Table 3-4 Primer sequences for real time PCR	61
Table 3-5 Primer and PCR condition for ITG α 5 detection	68
Table 4-1 List of top 20 common 2-fold or more up-regulated genes	74
Table 4-2 List of top 20 common 0.5-fold or less down-regulated genes	75
Table 4-3 Gene ontology of common up-regulated genes	76
Table 4-4 Gene ontology of common down-regulated genes	79
Table 4-5 PN expression in CCA tissues compared to benign liver tissues and hepatocellular carcinoma	85
Table 4-6 Multivariate analysis by Cox Proportional Hazard Regression model for the evaluation of prognostic factors	87
Table 4-7 Correlation between PN expression level and clinicopathological parameters	88

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1-1	Conceptual framework 4
Figure 1-2	Research design 6
Figure 2-1	Characteristic of CCA 10
Figure 2-2	Incidence of CCA and <i>O. viverrini</i> in Thailand 12
Figure 2-3	Proposed mechanism of cholangiocarcinogenesis induced by <i>O. viverrini</i> infection 15
Figure 2-4	Molecular cross-talk between fibroblast and carcinoma cell 20
Figure 2-5	Differential characteristic of normal and activated fibroblasts 22
Figure 2-6	Different splicing isoforms at C-terminal part of transcribed PN 33
Figure 2-7	Schematic structural domain of PN 34
Figure 2-8	Tumorigenic roles of PN at different step of cancer formation and progression 36
Figure 2-9	The integrin superfamily 41
Figure 2-10	Structure of ITGs show their extracellular, transmembrane and cytoplasmic domains 41
Figure 2-11	Integrin pathways regulate biological functions in normal and cancer 42
Figure 2-12	Schematic diagram of ITG binding proteins activated by specific ligand 45
Figure 2-13	Signaling pathways in cancer cells induced by binding of the ligand to integrin receptor and activating cell proliferation, survival and migration 46
Figure 2-14	Integrin and RTK signaling induce cell migration and invasion 48
Figure 2-15	Collective signaling pathways of PN-induced cancer progression via ITGs 49

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 3-1 Schematic protocols for RNA amplification, labeling and hybridization in gene profiling study	58
Figure 4-1 Genome wide expression analysis of Cf compared to Lfs	73
Figure 4-2 Gene validation and detection of PN in Cfs	82
Figure 4-3 Immunohistochemical staining of PN in CCA tissues	84
Figure 4-4 Double immunostaining of α -SMA and PN in CCA tissues	85
Figure 4-5 Multivariate analysis using Kaplan-Meier method	86
Figure 4-6 PN-activated proliferation of CCA cell lines	90
Figure 4-7 PN-induced proliferation in a time-dependent manner	91
Figure 4-8 Cell cycle distribution analysis of cancer cells with and without stimulation by PN	92
Figure 4-9 PN promotes CCA cell growth	93
Figure 4-10 Invasion induction by PN on KKU-M213 and KKU-M156 CCA cell lines	94
Figure 4-11 The expression of ITG α 5 on biliary epithelial cells	96
Figure 4-12 Effect of siITG α 5 on PN-induced proliferation and invasion of CCA cells	98
Figure 4-13 Neutralization of intact ITG α 5 β 1 receptor attenuates PN induced CCA cell invasion	99
Figure 4-14 PN-induced invasion via ITG α 5 and AKT signaling pathway	101
Figure 5-1 Bipolar effects of CCA-derived fibroblasts	108
Figure 5-2 Proposed mechanism of fibroblast-derived PN in <i>O. viverrini</i> -associated CCA	115
Figure 5-3 Proposed impacts of CCA-associated fibroblasts revealed in this study	116

LIST OF ABBREVIATIONS

α	alpha
β	beta
μg	microgram
μl	microliter
BSA	bovine serum albumin
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
Cf	cholangiocarcinoma-associated fibroblast
C_T	cycle threshold
CCA	cholangiocarcinoma
cm	centimeter
CO_2	carbon dioxide
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
ECL	enhanced chemiluminescent
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
h	hour
ITG	integrin
Lf	non-tumorigenic liver fibroblast
M	Molar
MFI	mean fluorescence intensity
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium solution
nm	nanometer

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PN	periostin
PVDF	polyvinylidene fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA