

รายงานการวิจัย

เรื่อง

บทบาทของ IL-6/STAT3 signaling cascade
ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ในตับ

Functional and constitutive IL-6/STAT3 signaling cascade
in liver fluke-associated human cholangiocarcinoma cells

ผู้วิจัย

- | | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 1. ผศ. ลัดดาวัลย์ เส็งกันไพร | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. รศ. วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. ผศ. เอื้อมเดือน ประวาฬ | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 4. รศ. ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์ | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นในการสนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัย
ผ่านทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2555
จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคร้ายแรงซึ่งมีความผิดปกติเกิดขึ้นที่เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี และมีการอักเสบเรื้อรังของท่อทางเดินน้ำดีนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการตรวจสอบบทบาทของวิถี JAK/ STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นวิถีที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบและการเกิดมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่า สาร proinflammatory cytokines ได้แก่ interleukin-6 และ interferon- γ สามารถกระตุ้นการทำงานของวิถี JAK/STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ ซึ่งแสดงผลโดยมีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน phosphorylated-STAT3 สาร cytokine สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดมะเร็งได้แก่ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้สาร cytokine ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย การศึกษาผลของสารยับยั้งวิถี JAK/STAT แบบจำเพาะได้แก่ AG490 และ piceatannol พบว่าสารทั้งสองนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1 ที่เหนี่ยวนำโดย cytokine ได้ แสดงให้เห็นถึงบทบาทของวิถี JAK/STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในการควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1 ดังนั้นวิถี JAK/STAT3 จึงเป็นเป้าหมายใหม่ในการออกฤทธิ์ของเคมีป้องกันหรือรักษามะเร็งท่อน้ำดีในอนาคตได้

Cholangiocarcinoma (CCA) is a highly malignant adenocarcinoma originating from the cholangiocytes. Chronic inflammatory disorders of the biliary tract predispose individuals to the development of this cancer. In this study, we have determined the role of JAK/STAT3 signaling pathway in CCA cell as this pathway is critical in inflammation and carcinogenesis. The results showed that cytokine mixture (interleukin-6 and interferon- γ) treatment could activate the STAT3 signaling cascade in CCA cells demonstrated by increased levels of phosphorylated-STAT3 protein (p-STAT3) in both whole cell lysates. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), the key molecules involving in inflammatory and tumorigenesis processes, was strongly induced by treatment with the cytokine combination in relation to the activation of STAT3. Cytokine treatment also significantly stimulated CCA cells migration. Detailed molecular analyses revealed that pretreatment of cells with specific JAK inhibitors, AG490 and piceatannol, diminished cytokine-induced iNOS and ICAM-1 expression in a dose-dependent manner, suggesting a role of JAK in cytokine mediated iNOS and ICAM-1 expression via STAT3 activation in CCA cells. Taken together, inhibition of STAT3 pathway could be valuable targets for prevention or treatment against CCA.

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	1
2. วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 สารเคมี	3
2.2 Cell lines และการเลี้ยงเซลล์	3
2.3 Cell treatment	3
2.4 การสกัดโปรตีนและ western blot analysis	3
2.5 Real-time polymerase chain reaction	4
2.6 Wound healing assay	4
3. ผลการวิจัย	
3.1 Constitutive STAT3 signaling cascade ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ	4
3.2 Cytokine mixture เหนี่ยวนำการกระตุ้น STAT3 ในเซลล์ KKU100	5
3.3 Cytokine mixture เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1	5
3.4 JAK inhibitors สามารถยับยั้ง cytokine-induced expression of iNOS and ICAM-1	6
3.5 Cytokine mixture เหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU100	6
4. อภิปรายผล	8
5. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	9
6. เอกสารอ้างอิง	9

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ปริมาณของ basal STAT3 protein ในเซลล์ MMNK1 และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ	5
รูปที่ 2 ปริมาณของ p-STAT3 และ STAT3 protein ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100	5
รูปที่ 3 mRNA expression of iNOS and ICAM-1	6
รูปที่ 4 ผลของ specific JAK inhibitors ต่อผลของ cytokine ในการกระตุ้นการแสดงออกของ iNOS และ ICAM-1	7
รูปที่ 5 ผลของ cytokine mixture ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU100	8

คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

IL-6	interleukin-6
IFN- γ	interferon- γ
iNOS	inducible nitric oxide synthase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
STAT3	signal transducers and activator of transcription-3
p-STAT3	phosphorylated-STAT3

1. บทนำ

โรคมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma; CCA) ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยในปัจจุบัน โดยพบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งที่สูงสุดในโลกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Kurathong *et al.*, 1985) การรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีทำได้ยากลำบาก เพราะผู้ป่วยมักจะได้รับการวินิจฉัยต่อเมื่ออาการลุกลามไปเกินกว่าที่การผ่าตัดจะได้ผล นอกจากนี้การรักษาด้วยรังสีหรือยาเคมีบำบัดก็ยังคงให้ผลการรักษาที่ไม่ดีนัก ยาเคมีบำบัดชื่อ gemcitabine ซึ่งในปัจจุบันเชื่อว่ามีฤทธิ์ที่ดีที่สุดเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือร่วมกับยาอื่นๆ ก็ให้ผลตอบสนองเพียงร้อยละ 22-28 และช่วยให้มีระยะเวลาปลอดโรคเพียง 4 สัปดาห์เท่านั้น (Valle *et al.*, 2009)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีหลายปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งได้แก่ นิ่วในถุงน้ำดี, การอักเสบของถุงน้ำดี, การเกิดแผลที่ลำไส้ใหญ่เรื้อรัง, การติดเชื้อพยาธิเช่น *Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis*, และภาวะ primary sclerosing cholangitis เป็นต้น (Khan *et al.*, 2002) ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เหล่านี้มีลักษณะร่วม (common features) ที่สำคัญที่พบในปัจจัยต่างๆ ชนิดคือ การทำให้เกิดการอักเสบและบาดเจ็บเรื้อรังของเยื่อบุท่อน้ำดีและการขัดขวางการไหลของน้ำดี ซึ่งผลที่เกิดตามมาคือ ก่อให้เกิดภาวะผิดปกติในการควบคุมสมดุลระหว่างการเพิ่มจำนวนของเซลล์ท่อน้ำดีและการตายของเซลล์ (Lazaridis and Gores, 2005; Wise *et al.*, 2008) ภาวะการอักเสบเรื้อรังสามารถทำให้เกิดมะเร็งได้โดยทำให้เกิดการทำลาย DNA นอกจากนี้ ในสภาวะแวดล้อมที่มีการอักเสบยังทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นอุดมไปด้วยสาร cytokines และ growth factors ต่างๆ ซึ่งสามารถกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เกิดการกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างมากจนไม่สามารถควบคุมได้ (Schottenfeld and Beebe-Dimmer, 2006) IL-6 เป็น cytokine ในกระบวนการอักเสบที่มีรายงานว่า มีบทบาทสำคัญกับมะเร็งท่อน้ำดี และผลการศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่าระดับของ IL-6 มีการเพิ่มขึ้นสูงมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ที่ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* และระดับของ IL-6 มีความสัมพันธ์กับการเกิด advanced periductal fibrosis จนนำไปสู่การเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในที่สุด (Sripa *et al.*, 2009) Proinflammatory cytokine อีกหนึ่งชนิดที่มีรายงานความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี คือ interferon- γ (IFN- γ) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในหนูที่ติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งถูกใช้เป็นโมเดลสำหรับการศึกษาเรื่องการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี มีระดับของ IFN- γ ในซีรัม และระดับการแสดงออกของยีน IFN- γ ในตับสูงขึ้น (Nair *et al.*, 2011) จากผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า proinflammatory cytokines มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

ภาวะอักเสบที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง (cancer-related inflammation) ทำให้เกิดการกระตุ้นของ transcription factors หลายตัวภายในเซลล์ ซึ่ง transcription factor ที่สำคัญตัวหนึ่งที่ถูกกระตุ้นในภาวะการอักเสบและพบว่ามีบทบาทอย่างมากกับการพัฒนาไปสู่การเกิดมะเร็งคือ signal transducers and activator of transcription-3 (STAT3) (Bromberg, 2002; Yoshimura, 2006; Mantovani *et al.*, 2008) STAT3 จัดเป็น oncogenic transcription factor มีการกระตุ้นการทำงานของ

STAT3 ในโรคมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งตับ, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งปอด, มะเร็งเม็ดเลือด เป็นต้น (Hodge *et al.*, 2005) กระบวนการกระตุ้น STAT3 เริ่มจากการที่ cytokine จับกับตัวรับของมันบนผิวเซลล์ จากนั้นเกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ Janus-like kinase (JAK) นำไปสู่การเกิดกระบวนการ phosphorylation ให้กับโปรตีน STAT เกิดเป็น phospho-STAT ซึ่งเป็นรูปที่ active และสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ทำหน้าที่เป็น transcriptional factor ควบคุมการแสดงออกของยีนต่อไป (Darnell, 1997) การกระตุ้น STAT3 มีผลส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาไปสู่มะเร็งได้โดยหลายกลไกได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจีโนม (genomic instability), การกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์และทำให้เกิดการต่อต้านต่อกระบวนการ apoptosis, การชักนำให้เกิด tumour angiogenesis และการส่งเสริมการเกิด การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Yoshimura, 2006; Porta *et al.*, 2009) กระบวนการเหล่านี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากการที่ STAT3 ไปมีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอด การเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเช่น เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ Bcl-xL และ Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein, กระตุ้น cell cycle regulators cyclin D1, cyclin E1 และ p21 (Hirano *et al.*, 2000), มีผลกระตุ้น VEGF และ TGF- β ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อกระบวนการ angiogenesis ของเซลล์มะเร็ง (Xu *et al.*, 2005) เป็นต้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า STAT3 เป็นตัวเชื่อมที่สำคัญระหว่างการอักเสบกับมะเร็ง ในโรคมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่า การกำเนิดและการดำเนินไปของโรคมะเร็งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบ การยับยั้งการกระตุ้น STAT3 จึงเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการป้องกันรวมถึงการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต

จากที่กล่าวมาข้างต้น STAT3 เป็น transcription factor ที่มีบทบาทสำคัญที่ถูกกระตุ้นในกระบวนการอักเสบ และการอักเสบมีความสัมพันธ์อย่างมากต่อมะเร็งท่อน้ำดี โดย cytokine IL-6 และ IFN- γ เป็น cytokine ในกระบวนการอักเสบที่มีบทบาทสำคัญกับมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงต้องการศึกษาถึงบทบาท JAK/STAT3 signaling cascade ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* (liver fluke *O. viverrini*-associated cholangiocarcinoma cells) ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ (Opisthorchiasis) พบมากในประเทศไทยโดยเฉพาะแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และจัดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดในการนำไปสู่การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ (Kaewpitoon *et al.*, 2008) เนื่องจากยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบันยังให้ผลการรักษาที่ไม่ดี การศึกษาถึงชีววิทยาโมเลกุลระดับเซลล์ของมะเร็งชนิดนี้จึงยังคงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง เพราะเป็นหนทางที่สามารถนำไปสู่เป้าหมายใหม่ในการออกฤทธิ์ของยาที่มีประสิทธิภาพดีได้ในอนาคต ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้ สามารถทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ถึงบทบาทและความสำคัญของ STAT3 signaling pathway ใน liver fluke *O.viverrini*-associated cholangiocarcinoma cells ซึ่งอาจจะเป็นเป้าหมายที่ดีในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีได้

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมี

IL-6, IFN- γ และ primary antibody ต่อ STAT3, phospho-STAT3 (p-STAT3) ซื้อจากบริษัท Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) RIPA buffer ได้จากบริษัท Amresco (Solon, OH, USA) สารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์ซื้อจากบริษัท Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

2.2 Cell line และการเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์ หรือ human CCA cell line ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้รับอนุเคราะห์มาจาก ดร.บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Ham's F12 media โดยมีการเติม 10% fetal calf serum, 12.5 mM HEPES, pH 7.3, 100 U/mL penicillin G และ 100 ug/mL streptomycin เซลล์ถูกเลี้ยงในตู้บัพ ในสภาวะ 5% CO₂ ที่ 37°C เซลล์ถูก subculture ทุกๆ 3 วัน โดยใช้ 0.25% trypsin-EDTA

2.3 Cells treatment

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตได้ประมาณ 70% confluency เซลล์ถูกเลี้ยงใน serum-free medium เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการ treat เซลล์ด้วย cytokine mixture (Kaur *et al.*, 2003) ได้แก่ สารผสมของ IL-6 (100 ng/mL) และ IFN- γ (100 ng/mL) ใน serum-free medium เป็นระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 1-24 ชั่วโมง ในการทดลองที่ใช้ JAK inhibitors นั้น เซลล์จะได้รับการ pretreat ด้วยสาร piceatannol (JAK1 inhibitor) (Barton *et al.*, 2004) หรือ AG490 (JAK2 inhibitor) (Barton *et al.*, 2004) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ M เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการ treat ด้วย cytokine mixture

2.4 การสกัดโปรตีนและ western blot analysis

หลังจาก treat เซลล์ครบตามกำหนดเวลาแล้ว ทำการสกัดโปรตีนโดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย cold PBS 2 ครั้ง และเตรียม whole cell lysate โดยใช้ RIPA cell lysis buffer ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด โปรตีนที่สกัดได้ถูกนำมาแยกโดยวิธี SDS-PAGE บน 10% polyacrylamide gel โปรตีนบนเจลถูกย้ายไปบนแผ่น PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า จากนั้นทำการ block membrane ด้วย 5% (w/v) bovine serum albumin ใน Tris buffered saline containing 0.1% Tween-20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการ incubate membrane ด้วย primary antibody ต่อ STAT3 (1:1000), phospho-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵)(1:1000) และ β -actin (1:5000) ที่ 4°C overnight เมื่อครบกำหนดเวลาทำการล้าง membrane และ incubate membrane ต่อด้วย horseradish peroxidase conjugated secondary antibody เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการ detect band โดยใช้สาร AmershamTM ECLTM

Prime (Amersham Biosciences Corp, NJ, USA) ความเข้มข้นของ protein band ถูกวัดโดยใช้ ImageQuant™ 400

2.5 Real-time polymerase chain reaction

การสกัด total RNA จากเซลล์ทำโดยใช้ Trizol reagent (Invitrogen, USA) ตามกรรมวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ เมื่อได้ total RNA ออกมาแล้ว ทำการสังเคราะห์สาร cDNA โดยใช้ ImProm-II™ reverse transcription system (Promega, WI, USA) cDNA ที่ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ ได้แก่ iNOS forward 5'-GTTCTCACGGCACAGGTCTC-3' and iNOS reverse 5'-GCAGGTCACCTTATGTCACTTATC-3' (Wu *et al.*, 2011), ICAM-1 forward 5'-CAAGGCCTCAGTCAGTGTGA-3' and ICAM-1 reverse 5'-CCTCTGGCTTCGTCAGAATC-3' (Kim *et al.*, 2010), GAPDH forward 5'-GTGGTGGACCTGACCTGC-3' and GAPDH reverse 5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3' (Kim *et al.*, 2010) Relative expression ของ iNOS และ ICAM-1 ถูกวิเคราะห์โดยใช้ quantitative RT-PCR โดยใช้ GAPDH เป็น internal control ปฏิกิริยา PCR ถูก perform โดยใช้ SsoFast™ Evagreen Supermix with low Rox (Bio-Rad, CA, USA) โดยใช้เครื่อง ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) ภายใต้ condition: denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 3 นาที และ amplification ที่ 95°C 15 sec และ 60°C 15 sec เป็นจำนวน 40 รอบ

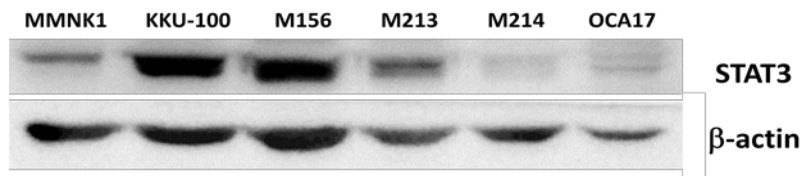
2.6 Wound healing assay

เซลล์ KKU100 ถูกเลี้ยงด้วย Ham's F12 medium เสริมด้วย 10% fetal calf serum ใน 24-well plate จำนวน 150,000 เซลล์/well ทำการ incubate เซลล์เป็นเวลาข้ามคืนที่ 37°C จากนั้นทำการ scratch เซลล์เพื่อให้เกิดเป็น wound ด้วยปิเปตที่ขนาด 200 μ L เศษเซลล์ถูกล้างออกด้วย PBS ต่อมาทำการ treat cell ด้วย cytokine mixture เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง รูปถ่ายของ scratched wound ถูกบันทึกที่ 0 และ 24 ชั่วโมง การปิดของ scratched wound แสดงถึงการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration)

3. ผลการวิจัย

3.1 Constitutive STAT3 signaling cascade ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่าง ๆ

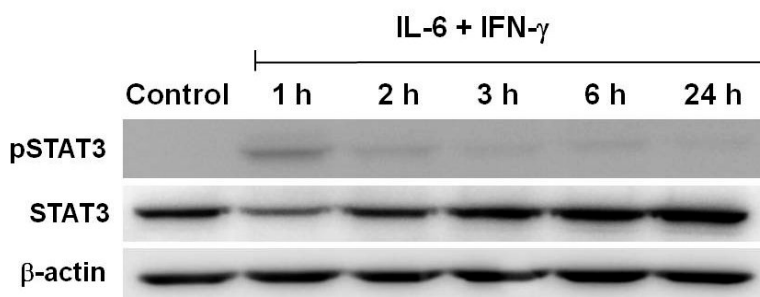
ผลการศึกษา constitutive STAT3 signaling cascade ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ ได้แก่ KKU-100, KKU-M156, KKU-M213, KKU-M214, OCA17 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ MMNK1 พบว่าเซลล์เหล่านี้มีปริมาณของ basal STAT3 protein ที่แตกต่างกันออกไป โดยพบปริมาณมากที่สุดในเซลล์ KKU-100 และน้อยที่สุดใน KKU-M214 รูปที่ 1) อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถวัดปริมาณของ constitutive phospho (p)-STAT3 ได้ในเซลล์เหล่านี้



รูปที่ 1 ปริมาณของ basal STAT3 protein ในเซลล์ MMNK1 และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่าง ๆ

3.2 Cytokine mixture เหนี่ยวนำการกระตุ้น STAT3 ในเซลล์ KKKU100

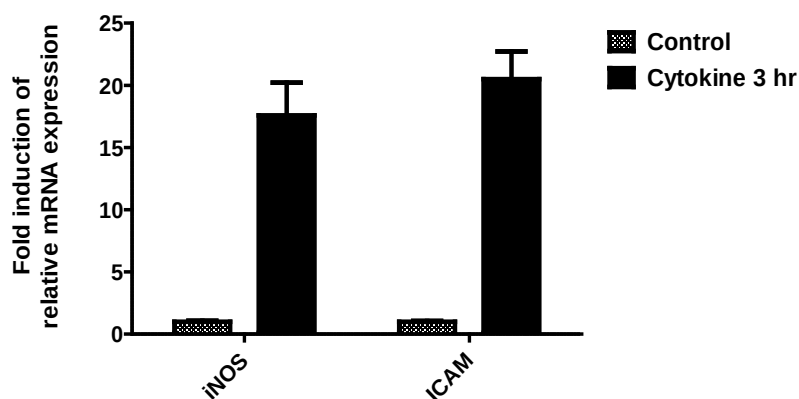
เพื่อตรวจสอบว่าวิถี JAK/STAT signaling คงปรากฏอยู่ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผู้วิจัยจึงทำการ treat KKKU100 cell ด้วย cytokine mixture (100 ng/mL IL-6 และ 100 ng/mL IFN- γ) เป็นระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 1-24 ชั่วโมง โดยปริมาณของ cytokine ที่ใช้นี้ได้ทำการตรวจสอบแล้วไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นทำการวัดปริมาณของโปรตีน STAT3 และ phospho-STAT3 (p-STAT3) โดยวิธี western blot analysis ผลการศึกษาพบว่าปริมาณของ p-STAT3 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อ treat KKKU100 cell ด้วย IL-6 + IFN- γ ซึ่งแสดงถึงมีการกระตุ้นการทำงานของ JAK/STAT3 signaling cascade รูปที่) 2)



รูปที่ 2 ปริมาณของ p-STAT3 และ STAT3 protein ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-100 เมื่อได้รับการ treat ด้วย IL-6 และ IFN- γ ในขนาด 100 ng/mL ที่ระยะเวลาต่างๆ

3.3 Cytokine mixture เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1

เป็นที่ทราบกันดีว่า inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) มีบทบาทสำคัญมากต่อกระบวนการอักเสบและการเกิดมะเร็ง (Yamada *et al.*, 2006; Kostourou *et al.*, 2011) ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบผลของ cytokine mixture ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1 ในเซลล์ KKKU100 ผลการศึกษาพบว่า cytokine mixture สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1 ให้เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 mRNA expression of iNOS and ICAM-1

เซลล์ได้รับการ treat ด้วย cytokine mixture เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำเซลล์มาสกัด RNA โดยใช้รีเอเจนต์ Trizol® และทำการสังเคราะห์ cDNA โดยเทคนิค reverse transcription จากนั้นทำการวัดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real time-polymerase chain reaction โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนชนิดนั้นๆ

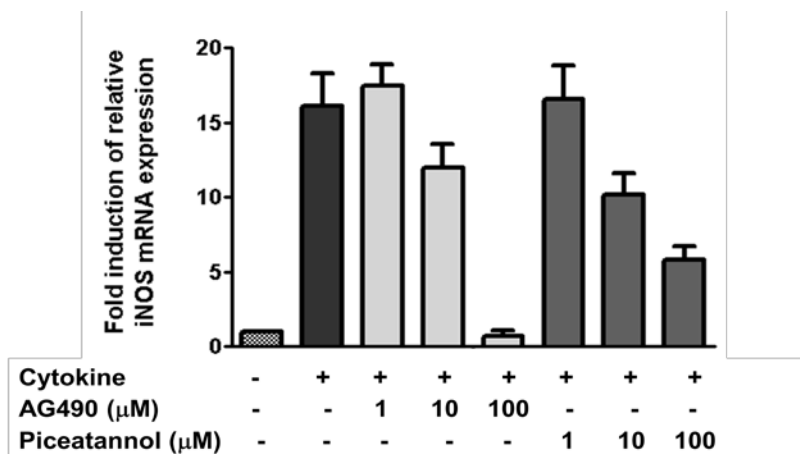
3.4 JAK inhibitors สามารถยับยั้ง cytokine-induced expression of iNOS and ICAM-1

เพื่อตรวจสอบว่า JAK/STAT signaling pathway เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของ iNOS และ ICAM-1 ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าของ specific JAK inhibitors ได้แก่ piceatannol (JAK1 inhibitor) และ AG490 (JAK2 inhibitor) ต่อผลของการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน iNOS และ ICAM-1 โดย cytokine mixture ผลการศึกษาค้นคว้าพบว่า JAK inhibitors สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ได้ โดยผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของ JAK inhibitors ที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 4

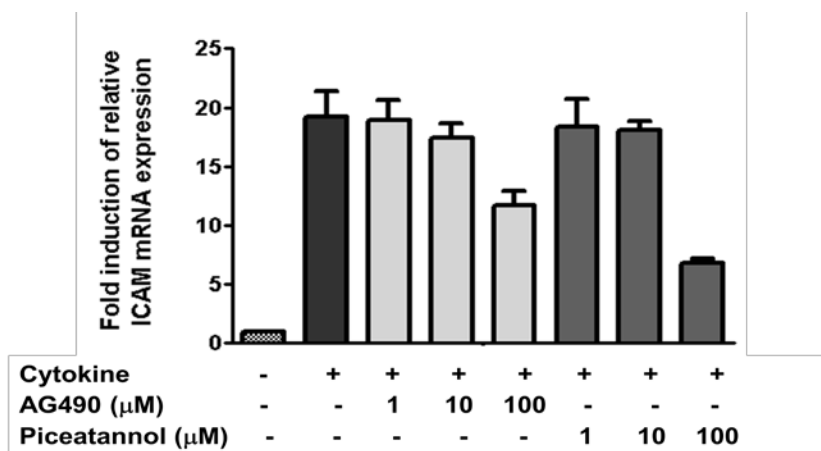
3.5 Cytokine mixture เหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ KLU100

เนื่องจาก ICAM-1 เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ migration และ invasion ของเซลล์ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาค้นคว้าของ cytokine mixture ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้ wound healing assay ผลการศึกษาค้นคว้าแสดงในรูปที่ 5 เมื่อทำการ treat cell ด้วย cytokine mixture เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้มากกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

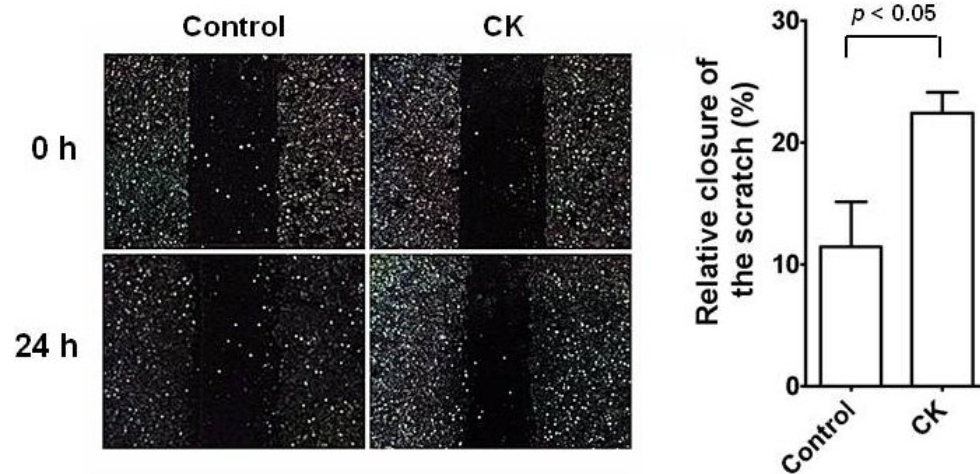
a)



b)



รูปที่ 4 ผลของ specific JAK Inhibitors ต่อผลของ cytokine ในการกระตุ้นการแสดงออกของ a) INOS และ b) ICAM-1: เซลล์ KKV-100 ถูก pretreat ด้วยสาร AG490 หรือ piceatannol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 hr จากนั้น treat cell ด้วย cytokine mixture เป็นเวลา 3 hr เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนโดยการวัดปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real-time PCR



รูปที่ 5 ผลของ cytokine mixture ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKKU100

เซลล์ KKKU100 ถูกเลี้ยงด้วย Ham's F12 medium เสริมด้วย 10% fetal calf serum ใน 24-well plate จำนวน 150,000 เซลล์/well ทำการ incubate เซลล์เป็นเวลาข้ามคืนที่ 37°C จากนั้นทำการ scratch เซลล์เพื่อให้เกิดเป็น wound ด้วยปิเปตที่ขนาด 200 μL เศษเซลล์ถูกล้างออกด้วย PBS ต่อมาทำการ treat cell ด้วย cytokine mixture เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง CK; cytokine mixture

4. อภิปรายผล

มะเร็งท่อน้ำดีหรือ cholangiocarcinoma (CCA) เป็นมะเร็งที่การวินิจฉัยโรคทำได้ยาก ผู้ป่วยมักได้รับการวินิจฉัยในช่วงท้ายๆของการเป็นมะเร็งทำให้ยากต่อการรักษา ในปัจจุบันการรักษาด้วยการผ่าตัด ฉายรังสีหรือการให้ยาเคมีบำบัดก็ยังคงให้ผลการรักษาที่ไม่ดีนัก จึงยังคงมีความพยายามในการศึกษาถึงกลไกระดับโมเลกุลในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อหวังให้เป็นหนทางนำไปสู่การพัฒนาที่สามารถยับยั้งที่กลไกเหล่านั้น มีรายงานการศึกษาว่า เซลล์ท่อน้ำดีมีการหลั่ง cytokines ต่างๆ ซึ่งมีผลควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของเซลล์ท่อน้ำดี (Wise *et al.*, 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสาร proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-6 และ IFN- γ ในการกระตุ้นการทำงานของ JAK/STAT3 signaling cascade ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถวัดปริมาณของ constitutive phosphorylated STAT3 ได้ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหลายชนิดที่นำมาศึกษา ถึงแม้ว่ารายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่ามีการกระตุ้นการทำงานของ STAT3 ในโรคมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งตับ, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งปอด, มะเร็งเม็ดเลือด เป็นต้น (Hodge *et al.*, 2005) ซึ่งการตรวจไม่พบ constitutive p-STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอาจเป็นเพราะความแตกต่างระหว่างสภาพแวดล้อมของ cell culture กับในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีในร่างกายของผู้ป่วยจริงๆ ทั้งนี้ใน cell culture ไม่มีสภาวะของการอักเสบซึ่งทำให้มี cytokines ชนิดต่างๆถูกปล่อยออกมา และสามารถกระตุ้นการทำงานของ STAT3 signaling cascade ได้ ซึ่งแตกต่างจากสภาวะการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า JAK/STAT signaling pathway มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดมะเร็งได้แก่ iNOS และ ICAM-1 การเพิ่มการแสดงออกของยีน iNOS สามารถนำไปสู่การเพิ่มการผลิต nitric oxide ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เป็นสาเหตุของการอักเสบ กระบวนการแพร่กระจาย และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Kostourou *et al.*, 2011) นอกจากนี้การกระตุ้น iNOS ในเซลล์ท่อน้ำดี ยังก่อให้เกิดการผลิต nitric oxide และสารอนุมูลอิสระต่างๆ ก่อให้เกิดการทำลาย DNA และยับยั้งกระบวนการซ่อมแซม DNA นอกจากนี้ nitric oxide ยังสามารถทำให้เกิด DNA mutation ได้ด้วย และผลของความผิดปกติของ DNA นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Kostourou *et al.*, 2011) สำหรับ ICAM-1 เป็นโมเลกุลที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวผ่าน endothelium มีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Yamada *et al.*, 2006) มีรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการใช้สาร ICAM-1 inhibitor ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Lee *et al.*, 2012) ดังนั้น สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง iNOS และ ICAM-1 สามารถนำมาใช้เป็นสารสำหรับป้องกันหรือรักษามะเร็งได้

การเพิ่มการเคลื่อนที่หรือเพิ่มความสามารถในการบุกรุกเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีรายงานว่า ICAM-1 มีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัตินี้ (Yamada *et al.*, 2006) ในการศึกษาพบว่า สาร cytokine สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการศึกษาเป็นหลักฐานสนับสนุนบทบาทของสาร cytokine ต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

5. สรุปผลและข้อเสนอแนะ

โดยสรุป ผลงานศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการทำงานของ JAK/STAT3 signaling cascade เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร proinflammatory cytokines และ JAK/STAT signaling pathway มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดมะเร็งได้แก่ iNOS และ ICAM-1 ดังนั้น JAK/STAT3 signaling pathway จึงเป็นเป้าหมายใหม่ในการออกฤทธิ์ของเคมีป้องกันหรือรักษามะเร็งท่อน้ำดีในอนาคตได้ ในการวิจัยในขั้นต่อไป จึงควรทำการศึกษาถึงฤทธิ์ในการยับยั้ง JAK/STAT3 signaling cascade ของสารต่างๆ เช่นสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อจะได้เป็นแนวทางในการนำสารเหล่านี้มาพัฒนาเป็นเคมีป้องกันหรือยารักษาสำหรับรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

- Barton BE, Karras JG, Murphy TF, Barton A, Huang HF. 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther* 3(1):11-20.
- Bromberg J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109(9):1139-42.

- Darnell JE, Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277(5332):1630-5.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19(21):2548-56.
- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41(16):2502-12.
- Kaewpitoon N, Kaewpitoon SJ, Pengsaa P, Sripa B. 2008. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol* 14(5):666-74.
- Kaur N, Kim IJ, Higgins D, Halvorsen SW. 2003. Induction of an interferon-gamma Stat3 response in nerve cells by pre-treatment with gp130 cytokines. *J Neurochem* 87(2):437-47.
- Khan SA, Davidson BR, Goldin R, Pereira SP, Rosenberg WM, Taylor-Robinson SD, *et al.* 2002. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 51 **Suppl** 6:VI1-9.
- Kim YS, Im J, Choi JN, Kang SS, Lee YJ, Lee CH, *et al.* 2010. Induction of ICAM-1 by *Armillariella mellea* is mediated through generation of reactive oxygen species and JNK activation. *J Ethnopharmacol* 128(1):198-205.
- Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JK, Cullis ER, Whitley G, *et al.* 2011. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br J Cancer* 104(1):83-90.
- Kurathong S, Lerdverasirikul P, Wongpaitoon V, Pramoolsinsap C, Kanjanapitak A, Varavithya W, *et al.* 1985. *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. *Gastroenterology* 89(1):151-6.
- Lazaridis KN, Gores GJ. 2005. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 128(6):1655-67.
- Lee IT, Lin CC, Lee CY, Hsieh PW, Yang CM. 2012. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against TNF- α -induced lung inflammation via ROS-dependent ICAM-1 inhibition. *J Nutr Biochem*.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203):436-44.
- Nair SS, Bommana A, Pakala SB, Ohshiro K, Lyon AJ, Suttiprapa S, *et al.* 2011. Inflammatory response to liver fluke *Opisthorchis viverrini* in mice depends on host master coregulator MTA1, a marker for parasite-induced cholangiocarcinoma in humans. *Hepatology* 54(4):1388-97.
- Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, *et al.* 2009. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214(9-10):761-77.

- Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. 2006. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 56(2):69-83.
- Sripa B, Mairiang E, Thinkhamrop B, Laha T, Kaewkes S, Sithithaworn P, *et al.* 2009. Advanced periductal fibrosis from infection with the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* correlates with elevated levels of interleukin-6. *Hepatology* 50(4):1273-81.
- Valle JW, Wasan H, Johnson P, Jones E, Dixon L, Swindell R, *et al.* 2009. Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinomas or other biliary tract tumours: a multicentre randomised phase II study - The UK ABC-01 Study. *Br J Cancer* 101(4):621-7.
- Wise C, Pisanthananon M, Perry BF, Alpini G, McNeal M, Glaser SS. 2008. Mechanisms of biliary carcinogenesis and growth. *World J Gastroenterol* 14(19):2986-9.
- Wu SQ, Otero M, Unger FM, Goldring MB, Phrutivorapongkul A, Chiari C, *et al.* 2011. Anti-inflammatory activity of an ethanolic *Caesalpinia sappan* extract in human chondrocytes and macrophages. *J Ethnopharmacol* 138(2):364-72.
- Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, *et al.* 2005. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 24(36):5552-60.
- Yamada M, Yanaba K, Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Komura K, *et al.* 2006. Regulation of local and metastatic host-mediated anti-tumour mechanisms by L-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *Clin Exp Immunol* 143(2):216-27.
- Yoshimura A. 2006. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 97(6):439-47.