ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47370

EFFECT OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES ON MASPIN EXPRESSION IN CANCER CELLS

ANUSORN LEKAWIPAT

MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
AUGUST 2011

600254946

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

E47370

EFFECT OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES ON MASPIN EXPRESSION IN CANCER CELLS

ANUSORN LEKAWIPAT

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN

PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

AUGUST 2011

EFFECT OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES ON MASPIN EXPRESSION IN CANCER CELLS

ANUSORN LEKAWIPAT

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED

TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

IN BIOCHEMISTRY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON

Asst. Prof. Dr. Pintusorn Hansakul

.....MEMBER

Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul

.....MEMBER

Asst. Prof. Dr. Pichapat Piamrojanaphat

.....MEMBER

Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich

.....MEMBER

Dr. Arisa Bonness

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR

Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich

.....CO-ADVISOR

Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul

.....CO-ADVISOR

Dr. Arisa Bonness

16 August 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Assist. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich, for his patient guidance, precious advice, and persistent encouragement during the preparation and investigation of this thesis.

I would like to thank Assist. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul and Dr. Arisa Bonness, my thesis co-advisors for their special efforts, unforgettable support, and encouragement.

I would like to give special thanks to Mr. Thanachai Taka and Mr. Khajohn Joonlasak, for their excellent training and advice in this thesis.

Thank you for my friends and colleagues in the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for their kindness and friendship.

I would like to thank The National Research Council of Thailand for research support.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family for their support, love and encouragement throughout my study.

Anusorn Lekawipat

Thesis Title Effect of Pro-inflammatory Cytokines on Maspin Expression in Cancer Cells

Author Mr. Anusorn Lekawipat

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich	Advisor
Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul	Co-advisor
Dr. Arisa Bonness	Co-advisor

ABSTRACT

E 47370

Maspin or SERPIN B5 belongs to the serine protease inhibitor superfamily of proteins. Maspin is a tumor suppressor SERPIN because it can inhibit growth, invasion and metastasis of cancer *in vitro* and *in vivo*. Normal epithelial cells express Maspin at high levels, but its expression is lost upon cancer progression in many invasive cancer cell lines. The down-regulation of maspin expression has recently shown to connect with inflammation process during carcinogenesis that eventually leads to cancer metastasis. The goals of this study are to determine pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TGF-β1, TNF-α) and their molecular mechanism that have an effect on Maspin expression in cancer cells. A variety of human cancer cell lines including cervical (HeLa), breast (MCF-7), ovarian (SKOV3), colon (SW620) carcinoma, synovial sarcoma (SW982) and lung fibroblast (MRC5) cells were treated with various concentrations (0.1, 1 and 10 ng/mL) of each cytokine. Next, the

E47370

expression of Maspin was determined by RT-PCR, qPCR, and Western blot analysis. Only HeLa cells constitutively expressed Maspin whereas the other cancer cell lines and normal lung fibroblast, MRC5 had no Maspin expression. After 24 h treatment in HeLa cells, IL-1β did not alter the level of Maspin expression. TGF-β1 clearly increased the amount of Maspin transcript in HeLa cells, but could not stimulate its expression in the other cell lines. In contrast, the expression of Maspin was significantly reduced by TNF-α. Furthermore, TGF-β1 and TNF-α at the dose of 0.1 – 10 ng/mL were not cytotoxic to the HeLa cells as determined by Sulforhodamine B (SRB) assay. Next, migratory and invasive properties of HeLa cells were analzyed using *in vitro* Transwell assays. TGF-β1 significantly increased both migration and invasion of the cells by approximately 40 percent. Although TNF-α could induce the migration and invasiveness of HeLa cells to some extent (10%), the effect on cell invasion was not statistically significant. In addition, epigenetic regulation of Maspin gene in HeLa cells was studied to examine the methylation status of Maspin promoter between -254 to +152 relative to the transcription start site. The result showed that TGF-β1 and TNF-α had no effect on CpG methylation sites of Maspin promoter. In conclusion, this study supports a connection between inflammation and cancer progression via regulation of Maspin expression by cytokine signaling. Further studies are needed to elucidate at a signaling pathway of the cytokine leading to a transcriptional regulation of Maspin expression.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของไซโตไคน์ก่อนการอักเสบต่อการแสดงออกของแมสปินในเซลล์มะเร็ง

ผู้เขียน นายอนุสรณ์ เลขะวิพัฒน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อริยพงษ์ วงษ์นพวิชญ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. อริสา บอนเนซซ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E47370

แมสปิน หรือ เซอร์ปิน บี 5 จัดอยู่ในตระกูลของโปรตีนตัวยับยั้งเซอรีนโปรติเอส แมสปินเป็นเซอร์ปินมีคุณสมบัติต้านมะเร็งเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญ การรุกรานและแพร่กระจายของมะเร็งได้ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง เซลล์เยื่อบุปรกติมีการแสดงออกของแมสปินในปริมาณสูงแต่ปริมาณของแมสปินจะลดลงตามพัฒนาการของเซลล์ไปเป็นมะเร็งชนิดรุกราน การแสดงออกของแมสปินที่ลดลงพบว่าสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบในระหว่างการเกิดมะเร็งจนก่อให้เกิดการแพร่กระจายในที่สุด วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบชนิดและกลไกของไซโตไคน์ก่ออักเสบ (IL-1β, TGF-β1, TNF-α) ต่อการแสดงออกของแมสปิน เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เต้านม (MCF-7) รังไข่ (SKOV3) ลำไส้ใหญ่ (SW620) ไขข้อ (SW982) และ ไฟโบบลาสต์ปอด (MRC5) ถูกเติมด้วยไซโตไคน์ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของแมสปินโดยวิธี RT-PCR, qPCR และ Western blot ผลการทดลองพบการแสดงออกของแมสปินในเซลล์มะเร็งปากมดลูกเท่านั้น แต่ไม่พบในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นรวมถึงในไฟโบบลาสต์ปอด เมื่อเติมไซโตไคน์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า IL-1β ไม่มีผลต่อการแสดงออกของแมสปินในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ในทางกลับกัน TGF-β1 สามารถเพิ่มการแสดงออกของแมสปิน ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของไซโตไคน์อย่างมีนัยสำคัญ ในทางกลับกัน TNF-α ลดการแสดงออกของแมสปินในเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ รวมถึงไฟโบบลาสต์ปอด จากการทดสอบด้วยวิธี Sulforhodamine B พบว่าความเข้มข้นของไซโตไคน์ที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้ไม่ส่งผลต่อการฆ่าเซลล์มะเร็ง และเมื่อทดสอบการเคลื่อนที่และ รุกรานของเซลล์มะเร็ง TGF-β1ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่และการ

E47370

รุกรานของเซลล์มะเร็งปากมดลูกประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนTNF-α ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบ้างแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของแมสปินในระดับการถอดรหัสที่บริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ตำแหน่ง -254 ถึง +152 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัส ผลที่ได้แสดงว่า TGF-β1 และ TNF-α ไม่มีผลต่อการเติมหมู่เมทิลบริเวณแมสปินโปรโมเตอร์ จากผลการทดลองเหล่านี้เน้นย้ำการเชื่อมโยงระหว่างกระบวนการอักเสบและพัฒนาการของมะเร็งผ่านกลไกการควบคุมการแสดงออกของแมสปินโดยอาศัยสัญญาณจากไซโตไคน์ก่ออักเสบ การศึกษาในอนาคตจะตรวจสอบที่วิถีของการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ต่อการควบคุมการแสดงออกของแมสปินที่ระดับการถอดรหัสของยีน

TABLE OF CONTENTS

		Page
ACKNOWLEDGEMENTS		iii
ABSTRACT		iv
LIST OF TABLES		xi
LIST OF FIGURES		xii
ABBREVIATIONS		xiv
CHAPTER I INTRODUCTION		1
1.1	Statement and significance of problem	1
1.2	Literature reviews	3
	Carcinogenesis	3
	Maspin	8
	Biological function of Maspin	9
	Expression of Maspin	11
	Regulation of Maspin expression	13
	Epigenetic regulation of gene expression	14
	Tissue specific control of Maspin expression by DNA methylation	16
	Connection between DNA methylation and cancer	18
	Relationship between cancer and inflammation	20
	Role of cytokines in cancer development	22
	Transforming growth factor beta (TGF-β)	24
	Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)	25
	Interleukin 1 (IL-1)	27
	Maspin and inflammation	28
	Hypothesis	30
1.3	Objectives	30
CHAPTER II MATHERIALS AND METHODS		31
2.1	Chemicals and materials	31

2.2	Effect of IL-1β, TGF-β1 and TNF-α on Maspin gene expression in human cancer cells and human lung fibroblast	31
2.2.1	Cell lines and culture conditions	31
2.2.2	Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)	32
2.2.2.1	RNA extraction	34
2.2.2.2	cDNA synthesis by reverse transcription	35
2.2.2.3	Polymerase chain reaction (PCR)	36
2.2.3	Quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR/qPCR)	37
2.2.4	Western blot analysis	39
2.2.4.1	Protein determination	40
2.2.4.2	SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting	41
2.3	The Cytotoxicity effect of TGF-β1 and TNF-α in HeLa cells	42
2.3.1	Cell preparation	43
2.3.2	Sulforhodamine B assay protocol	44
2.4	The effect of TGF-β1 and TNF-α on cancer cell migration and invasion related to Maspin expression	45
2.4.1	Migration assay	45
2.4.2	Invasion assay	47
2.5	Alteration of Maspin promoter methylation by TGF-β1 and TNF-α	49
2.5.1	DNA extraction	50
2.5.2	Sodium bisulfate treatment and polymerase chain reaction	52
2.6	Statistic analysis	54
CHAPTER III RESULTS		55
3.1	Effect of IL-1β, TGF-β1 and TNF-α on Maspin gene expression in human cancer cells and human lung fibroblast	55
3.2	Effect of IL-1β, TGF-β1 and TNF-α on Maspin gene expression in HeLa cells	57
3.3	Effect of TGF-β1 and TNF-α on Maspin protein level in HeLa cells	61

3.4	Combination effects of TGF-β1 and TNF-α on Maspin gene expression in HeLa cells	61
3.5	Cytotoxic effect of TGF-β1 and TNF-α on HeLa cells	65
3.6	Effect of TGF-β1 and TNF-α on migration and invasion of HeLa cells	68
3.7	Characterization of Maspin promoter methylation	71
CHAPTER IV DISCUSSION AND CONCLUSION		76
REFERENCES		82
APPENDICES		93
APPENDIX A		94
APPENDIX B		99
APPENDIX C		101
CURRICULUM VITAE		111

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Tissue Distribution of Maspin	12
2	The promoter methylation status of Maspin in cancer	20
3	Primer sequences of Maspin and GAPDH for RT-PCR	34
4	Primer sequences of Maspin and GAPDH for qPCR	38
5	The steps of cytokines treatment	64

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	A diagram of the initiation process	4
2	The processes of metastasis and angiogenesis	6
3	The hallmarks of cancer	7
4	A model depiciting possible functions for Maspin based on it's localization within or without the cell	11
5	Hypothetical model for the expression of Maspin	14
6	Picture of epigenetic regulation mechanism	15
7	Model of the cell-type–specific control of Maspin expression by methylation	17
8	Chronic inflammation, tissue damage, and chronic infection may stimulate cytokines and chemokines that contribute to development of malignant disease	21
9	Two outcomes of interactions between tumor cells and infiltrating inflammatory and/or immune cells in the tumor microenvironment	23
10	Inflammation suppress Maspin expression leading to Metastasis	29
11	Hypothetical model of inflammation-altered Maspin expression	30
12	The step of reverse transcription	33
13	A diagram illustrating the method of PCR	36
14	The principle of SYBR Green detection in real-time PCR	38
15	Western blotting workflow	39
16	The standard curve of bovine serum albumin (BSA)	41
17	Structure of Sulforhodamine B	43
18	Experimental setup to study cell Migration *in vitro*	46
19	Illustration of *in vitro* Invasion	48
20	The biochemical reaction pathways of cytosine *in vitro*	50
21	Diagram of the Maspin gene promoter region	53

22	Effect of IL-1β, TGF-β1 and TNF-α on Maspin gene expression in human cancer cell lines and human lung fibroblast	56
23	Effect of IL-1β (A), TGF-β1 (B) and TNF-α (C) on Maspin gene expression in HeLa cells	58
24	Effect of TGF-β1 on Maspin gene expression in HeLa cells	59
25	Effect of TNF-α on Maspin gene expression in HeLa cells	60
26	Effect of TGF-β1 on Maspin protein expression in HeLa cells	62
27	Effect of TNF-α on Maspin protein expression in HeLa cells	63
28	Effect of TGF-β1 and TNF-α on Maspin gene expression in HeLa cells	64
29	Effect of TGF-β1on viability of HeLa cells	66
30	Effect of TNF-α on viability of HeLa cells	67
31	Effect of TGF-β1 and TNF-α on migrationof HeLa cells	69
32	Effect of TGF-β1 and TNF-α on HeLa cell invasion	70
33	PCR amplification of Maspin promoter before bisulfite conversion of DNA	72
34	PCR amplification of Maspin promoter after bisulfite conversion of DNA	73
35	Optimization of PCR annealing condition using U2,D2 primer	74
36	Examples of the Maspin promoter sequences obtained following bisulfite treatment in HeLa cells	75

ABBREVIATIONS

%	Percent
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degree celsius
Cd	Correction factor of dilution
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
cm	Centimeter
cm^3	Cubic centimeter
CO_2	Carbondioxide
Cv	Correction factor of volume
CTLs	Cytotoxic T cell
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMTs	DNA methyltransferase
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
DTT	Dithiotheritol
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

Em	Emission
EMT	Epithelial-enhancing angiogenesis
EtBr	Ethidium bromide
Ex	Excited
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas
GSH	Glutathione S transferase
h	Hour
HDAC1	Histone deacetyl
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HIF	Hypoxia-inducible factors
HRE	Hormone-responsive element
HRP	Horseradish peroxidase
ICE	Interleukin-1 converting enzyme
i.e.	Id est
IgG	Immunoglobulin G
IKK	IκB kinase
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-1ra	Interleukin-1 receptor antagonist
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10

IL-17	Interleukin-17
IL-23	Interleukin-23
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MeCP	Methyl CpG-binding protein
mg	Milligram
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MW	Molecular weight
NaCl	Sodium chloride
$NaHCO_3$	Sodium bicarbonate
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogram
NK cell	Natural killer cell
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

PAI2	Plasminogen activator inhibitor2
PBS	Phosphate buffer saline
qPCR	Quantitative real time PCR
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RCL	Reactive center loop
rMaspin	Recombinant Maspin
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
s-s	Disulfide bond
SD	Standard deviation
sec	Second
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH	Sulhydryl group
SiRNA	Small interference RNA
SRB	Sulforhodamine
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	*N,N,N,N*-tetamethyl ethylene-diamine
TF	Transcription factor
TGF-β1	Tumor growth factor beta one
Th1	T helper1
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha

TPBS	Tween-20 phosphate buffer saline
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
uPA	Urokinase plasminogen activator
uPAR	Urokinase plasminogen activator receptor
µg	Microgram
µL	Microliter
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume
w/w	Weight by weight