



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ฤทธิ์ของ cyanidin ต่อ IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

โดย

ดร.วราภรณ์ คำยอด

มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5380073

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ฤทธิ์ของ cyanidin ต่อ IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผู้วิจัย สังกัด

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

The inflammatory mediator interleukin-6 (IL-6) has been implicated in the pathophysiology of cholangiocarcinoma (CCA), a bile duct cancer with high prevalence in northeastern Thailand. IL-6 is capable of serving both as a mitogen and a survival factor for cholangiocytes and cholangiocarcinoma cells. IL-6 mediates its activity via a cell surface receptor complex composed of two subunits, a ligand-binding protein, interleukin-6 receptor (IL-6R, gp80) and a signal transducer gp130. Transcription factor STAT3 is the major mediator of IL-6 signaling. Cyanidin, an anthocyanidin found in pomegranate (*Punica granatum* L.) and berries, is reported to possess strong antioxidant and anti-tumorigenic properties. Interestingly, cyanidin was shown to downregulate IL-6 expression in human adipocytes. Therefore, the aim of this study is to examine whether cyanidin may mediate a protective effect against cholangiocarcinoma by inhibiting IL-6 signaling. In order to determine the importance of this cell signaling pathway in CCA, we examined the role of IL-6 in proliferation and migration of two CCA cell lines, KKU-M213 and KKU-100. Exogenous IL-6 stimulated tyrosine phosphorylation of transcription factor STAT3 and migration of KKU-M213 but not KKU-100 cells, as the latter contain low amounts of IL-6 receptor (gp80). However, IL-6 did not stimulate the proliferation of both cell lines. Cyanidin treatment inhibited IL-6-induced STAT3 phosphorylation and migration of KKU-M213 but not KKU-100 cells, suggesting that cyanidin acts on IL-6/STAT3 signaling pathway. This novel bioactivity of cyanidin could be exploited as a potential adjunct treatment of IL-6 responsive CCA.

Keywords : Interleukin-6, STAT3, cyanidin, cholangiocarcinoma

Project Code : MRG5380073

Project Title : Effect of cyanidin on IL-6 signaling in cholangiocarcinoma cell lines

Investigator : Dr. Waraporn Komyod

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : waraporn.kom@mahidol.ac.th

Project Period : 15 June 2010- 14 June 2012

บทคัดย่อ

Interleukin-6 (IL-6) เป็น inflammatory cytokine ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการศึกษาวิจัยพบว่า IL-6 ช่วยให้เซลล์ท่อน้ำดี และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี มีการเพิ่มจำนวน (mitogen) และอยู่รอด (survival) ได้ดีขึ้น IL-6 ทำงานผ่านทางตัวรับสัญญาณ (receptor) ซึ่งประกอบด้วยสองหน่วยย่อยของโปรตีน คือตัวจับกับ IL-6 (IL-6R, gp80) และตัวส่งสัญญาณ คือ gp130 การส่งสัญญาณของ IL-6 จะผ่านตัวกลางที่สำคัญ คือ STAT3 Cyanidin เป็นสารประกอบ anthocyanidin ที่พบได้ในน้ำทับทิมและผลไม้กลุ่มเบอร์รี่ มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง ที่น่าสนใจก็คือ มีผลการวิจัยระบุว่า cyanidin สามารถลดการแสดงออกของ IL-6 ใน adipocyte ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ cyanidin ว่ามีผลต่อการยับยั้ง IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้หรือไม่ เราตรวจสอบบทบาทของ IL-6 ต่อการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์แบบ migration ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสองสายพันธุ์ ได้แก่ KKU-M213 และ KKU-100 พบว่า IL-6 กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟต ที่ตำแหน่งไทโรซีนของ STAT3 และกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-M213 แต่ไม่มีผลใดๆต่อเซลล์ KKU-100 เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ไม่ตอบสนองต่อ IL-6 เนื่องจากไม่ค่อยมีตัวจับกับ IL-6 (IL-6R, gp80) อย่างไรก็ตาม IL-6 ไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสองสายพันธุ์ หลังจากใส่ cyanidin ลงไป พบว่า cyanidin สามารถยับยั้ง IL-6 กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตของ STAT3 และยับยั้ง IL-6 กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-M213 แต่ cyanidin ไม่มีผลต่อเซลล์ KKU-100 งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า cyanidin ยับยั้งการส่งสัญญาณของ IL-6 ผ่านทาง STAT3 และ cyanidin อาจจะใช้เป็นยารักษาาร่วมกันสำหรับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่ตอบสนองต่อ IL-6

คำสำคัญ : Interleukin-6, STAT3, cyanidin, มะเร็งท่อน้ำดี

รหัสโครงการ : MRG5380073

ชื่อโครงการ : ฤทธิ์ของ cyanidin ต่อ IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ชื่อนักวิจัย : ดร.วราภรณ์ คำยอด

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : waraporn.kom@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2553 ถึงวันที่ 14 มิถุนายน 2555

(งานวิจัยยังไม่ตีพิมพ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิงหรือเผยแพร่)

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ยังมีการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับ ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีให้หายขาดมีเพียงวิธีเดียว คือการผ่าตัดเอาเนื้องอกพร้อมกับเนื้อดีที่อยู่ข้างเคียงออก การใช้เคมีบำบัด หรือรังสีรักษา ไม่ค่อยได้ผล ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะค้นคว้าวิธีการรักษาที่นอกเหนือไปจากการผ่าตัด เพื่อการบำบัดรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีประสิทธิภาพ

มะเร็งท่อน้ำดีมักมีความสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) จากรายงานวิจัยพบว่า Interleukin-6 (IL-6) ซึ่งเป็น inflammatory cytokine ชนิดหนึ่ง มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี และช่วยให้เซลล์มะเร็งมีการเพิ่มจำนวนได้ดี (cell proliferation) ที่สำคัญสามารถตรวจวัดระดับ IL-6 ได้ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และสามารถใช้เป็น biomarker ในการวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ในระยะเริ่มต้นได้ IL-6 ทำงานโดยจับกับ IL-6 receptor ซึ่งประกอบด้วยสองหน่วยย่อยของโปรตีน คือตัวจับกับ IL-6 (IL-6R, gp80) และตัวส่งสัญญาณ คือ gp130 แล้วจึงส่งสัญญาณผ่านทาง Jak/STAT pathway โดยมี STAT3 ซึ่งเป็น transcription factor ทำหน้าที่หลักในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องมะเร็ง รวมทั้งยีนดีเอ็นเอ ดังนั้นการยับยั้ง signal transduction ของ IL-6 โดยการยับยั้ง STAT3 จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่น่าจะมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันแนวทางการป้องกันและการรักษาโรคมะเร็งโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่พบในพืชสมุนไพรไทยรวมทั้งผักและผลไม้กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก ยกตัวอย่างเช่น สารสกัดจากทับทิม (pomegranate) ผลไม้ที่ปลูกได้ในประเทศไทย จากการศึกษารายงานพบว่าทับทิมมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดซึ่งมีมากทั้งใน เปลือก เมล็ด และน้ำทับทิม ได้แก่ polyphenols, anthocyanins, anthocyanidins, ellagic acid derivatives และ hydrolyable tannins สารในกลุ่มนี้ มีคุณสมบัติเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีสรรพคุณลดอาการอักเสบ ทั้งยังมีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งไม่ให้เพิ่มจำนวนขึ้น เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำไส้ มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งตับ ฯลฯ รวมทั้งยังมีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งหลอดอาหารและลำไส้ใหญ่อีกด้วย ในงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาผลทางยาของน้ำทับทิมยังพบอีกว่า น้ำทับทิมมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) และมีคุณสมบัติที่สามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในคน ปัจจุบันนี้งานวิจัยของน้ำทับทิมยังมีตลอดเวลา โดยมีแนวโน้มที่จะนำสารสกัดมาศึกษาเพิ่มเติม

Cyanidin เป็นสารประกอบ anthocyanidin ที่พบได้ในน้ำทับทิม และผลไม้กลุ่มเบอร์รี่มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ที่น่าสนใจก็คือ มีผลการวิจัยระบุว่า cyanidin สามารถลดการแสดงออกของ IL-6 ใน adipocyte ได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ cyanidin ว่ามีผลต่อการยับยั้ง IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่

และมีกลไกในการยับยั้งอย่างไร

จากการศึกษาบทบาทของ IL-6 และ cyanidin ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-M213 และ KKU-100 พบว่า (1) IL-6 สามารถกระตุ้น STAT3 phosphorylation และ migration ของเซลล์ KKU-M213 ได้ แต่ IL-6 ไม่มีผลใดๆ ต่อเซลล์ KKU-100 เนื่องจากไม่ค่อยมีตัวจับกับ IL-6 (IL-6R, gp80) อย่างไรก็ตาม IL-6 ไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (proliferation) ทั้งสองชนิด (2) เมื่อ treat เซลล์ ด้วย cyanidin ที่ความเข้มข้น 100 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cyanidin สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง IL-6 กระตุ้น STAT3 phosphorylation และยับยั้ง IL-6 กระตุ้น migration ของเซลล์ KKU-M213 แต่ cyanidin ไม่มีผลต่อเซลล์ KKU-100 และ (3) เมื่อศึกษากลไกการยับยั้งของ cyanidin พบว่า การที่ IL-6 กระตุ้น STAT3 phosphorylation ได้ลดลง เนื่องจาก cyanidin ไปลดการแสดงออกของยีน IL-6R (gp80) ในระดับ mRNA ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า cyanidin ยับยั้งการส่งสัญญาณของ IL-6 ผ่านทาง STAT3 และ cyanidin อาจจะใช้เป็นยารักษาาร่วมกันสำหรับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่ตอบสนองต่อ IL-6

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาบทบาทของ IL-6 ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ cyanidin ว่ามีผลต่อการยับยั้ง IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่ และมีกลไกในการยับยั้งอย่างไร เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

วิธีทดลอง

Cell lines ที่ใช้ในการทดลอง:

Human cholangiocarcinoma cell lines 3 ชนิด ที่มาจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชาวไทย ได้แก่ KKU-100, KKU-M213, และ HuCCA-1 และ immortalized cholangiocyte 1 ชนิด คือ MMNK1 จะถูกเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ (HAM) ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) ในตู้บัพที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และ 5% CO₂

1. ตรวจสอบการส่งสัญญาณของ IL-6 ผ่านทาง STAT3 ใน CCA cell lines โดยวิธี

Western blot

เลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี IL-6 ที่เวลาต่างๆ จากนั้นสกัดโปรตีน จาก CCA cell lines โดยการล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 สองครั้ง จากนั้นเติม lysis buffer (Hepes buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM HEPES, pH 7.4, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride และ protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche), ลงไป บ่มไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 10 นาทีเพื่อกำจัด cell debris แล้ววัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford จากนั้น ผสมโปรตีน (40 μ g) กับ SDS sample buffer ต้ม 5 นาที ที่ 95°C แล้วนำโปรตีนไป load ลงบน SDS-PAGE เพื่อแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้น transfer proteins ไปบน PVDF membrane โดย semi-dry blotting เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 120 volts โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 25 mM Tris base, pH 8.5, 200 mM glycine, 20% methanol จากนั้น block non-specific binding ด้วย 5% BSA ใน TBS-N buffer 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม phospho-STAT3 primary antibody แล้วบ่ม 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-N 3 ครั้ง เติม secondary antibody แล้วบ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง กระตุ้นสัญญาณโดยใช้ Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) แล้วประกบฟิล์ม จากนั้นนำ membrane มา strip แล้ว reprobe โดยใช้ STAT3 antibody

2. ศึกษาบทบาทของ IL-6 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี MTT assay

เลี้ยงเซลล์มะเร็งใน 96-well microtiter plate เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึง treat ด้วย IL-6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วย MTT assay โดยย่อ เติมสารละลาย MTT 10 μ l ลงไปในเซลล์แต่ละหลุม แล้ว incubate ที่ 37°C ใน CO₂ incubator อีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม DMSO ลงไป 200 μ l เพื่อละลายสีออกจากเซลล์ วัด OD ที่ความยาวคลื่น 540 nm เปรียบเทียบกับค่า OD ของหลุมที่ไม่มี IL-6 (control)

3. ศึกษาบทบาทของ IL-6 ต่อความสามารถในการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง โดยการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยวิธี Wound healing assay

เลี้ยงเซลล์มะเร็งที่หน้าดีใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติจนเซลล์เจริญเติบโตมีปริมาณมากพอ (90-95% confluence) เลี้ยงต่ออีก 24 ชม. ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี IL-6 จากนั้นขูดเซลล์ออกเป็นแนวเส้นตรงโดยใช้ปลายของ pipet tip และเลี้ยงต่อในสภาวะเดิม สังเกตเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามาปิดช่องว่างที่ขูดไว้ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (12-24 ชม.) ถ่ายรูปเก็บไว้

4. ศึกษาฤทธิ์ของ cyanidin ต่อ IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งที่หน้าดี

เซลล์จะถูก treat ด้วย cyanidin ที่ความเข้มข้น 100 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม IL-6 ลงไป และดูฤทธิ์ของ cyanidin ต่อ IL-6 signaling โดยดูการกระตุ้น STAT3 phosphorylation โดยใช้วิธี Western blot ดังข้อ 1 และ ฤทธิ์ของ cyanidin ต่อการยับยั้ง cell migration โดยวิธี Wound healing assay ดังข้อ 3

5. ศึกษาฤทธิ์ของ cyanidin ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน IL-6R (gp80) ใน CCA cell lines โดยวิธี Real-time RT-PCR

การตรวจสอบการแสดงออกของ IL-6R (gp80) ระดับ mRNA จะใช้วิธี real-time RT-PCR โดยนำเซลล์มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNeasy mini kit จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้ไปเป็น cDNA ด้วย ImProm-II™ Reverse Transcription System แล้วนำ cDNA ที่ได้ ไปทำการหาปริมาณของการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี realtime RT-PCR โดยใช้ beta-actin เป็นตัว normalizer เปรียบเทียบกับ MMNK ด้วยวิธี comparative Ct method ($\Delta\Delta$ CT) โดยย่อ real-time RT-PCR ทำใน 96-well Optical Reaction Plate ส่วนผสมของ reaction mixture ประกอบด้วย 5 μ l template cDNA, 1X SYBR® Green PCR MasterMix และ 300 nM forward primer, 300 nM reverse primer ส่วน PCR condition ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 95°C 10 minutes ตามด้วย denaturation 94°C 30 seconds, annealing 55°C 30 seconds และ extension 72°C 30 seconds จำนวน 40 รอบ

gene	primer
human gp80	forward: 5'- CTCCTGCCAGTTAGCAGTCC-3' reverse: 5'- TCTTGCCAGGTGACACTGAG-3'
human β -actin	forward: 5'- CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' reverse: 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

ผลการทดลอง

1. ตรวจสอบการส่งสัญญาณของ IL-6 ผ่านทาง STAT3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

IL-6 เป็น inflammatory cytokine ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี IL-6 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ โดยทำงานผ่าน receptor 2 ชนิด คือ gp 80 และ gp 130 จากนั้นก็จะกระตุ้นสัญญาณผ่าน Jak/STAT pathway ต่อไปโดยที่ STAT3 ซึ่งเป็น transcription factor เป็นตัวหลักของการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ในการทดลองนี้ ต้องการหาเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (CCA cell lines) ที่สามารถตอบสนองต่อ IL-6 ในขั้นพื้นฐานได้ โดยใช้ western blot ดูระดับ phosphorylation ของ STAT3 โปรตีนหลังจากกระตุ้นด้วย IL-6 (20 ng/ml) เป็นเวลา 15 นาที จาก Fig.1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด คือ MMNK1, HuCCA-1 และ KKU-M213 มีการตอบสนองต่อ IL-6 ยกเว้นเซลล์ KKU-100 ไม่พบ phospho-STAT3 เนื่องจากเซลล์นี้มีการแสดงออกของ IL-6R (gp80) mRNA น้อยกว่าเซลล์อื่นๆ (data not shown)

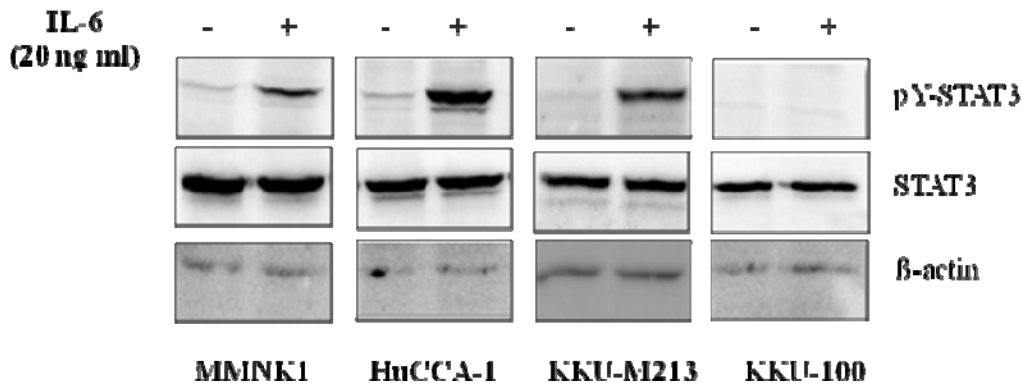


Fig.1 Cells were stimulated with IL-6 (20 ng/ml) for 15 min or left untreated. Total cellular lysates were analysed by Western blotting for the presence of phosphorylated STAT3 before re-probing of the blots with antibodies to STAT3 and β -actin.

2. IL-6 มีบทบาทต่อการเพิ่ม migration ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 โดยใช้เทคนิค wound healing assay แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี MTT assay

การทดลองนี้ต้องการศึกษาว่า IL-6 มีบทบาทต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างไร ผลการทดลองพบว่า IL-6 กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-M213 โดยเพิ่ม migration 64% เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใส่ IL-6 ลงไป มีการเคลื่อนที่ 46% (Fig.2) แต่ IL-6 ไม่มีผลต่อ migration ของเซลล์ KKU-100 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ตอบสนองต่อ IL-6 นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของเซลล์ KKU-M213 ไม่ได้เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เพราะผลการทดลองจาก Fig.3 แสดงให้เห็นว่า IL-6 ความเข้มข้นตั้งแต่ (20-60 ng/ml) ไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-M213

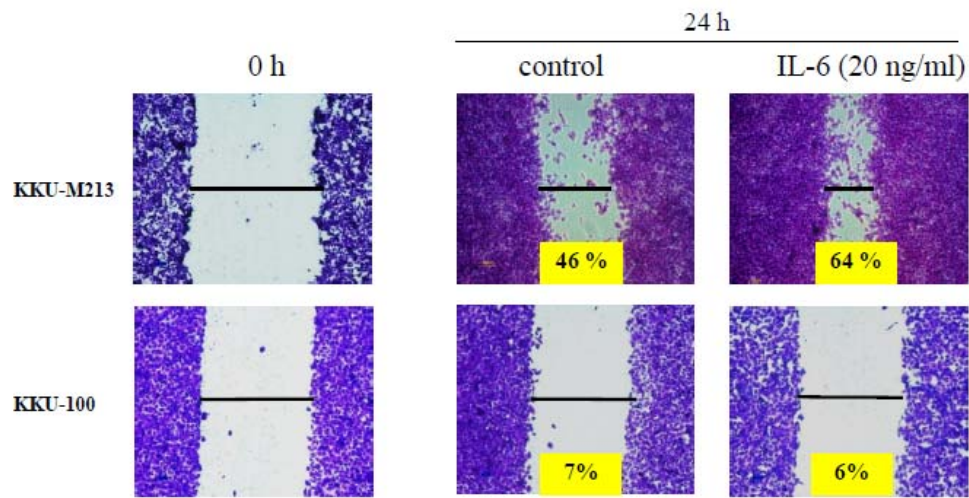


Fig.2 Cells were allowed to form a confluent monolayer in a 24-well plate before wounding. The wound was made by scraping a conventional pipette tip across the monolayer. Cell migration was induced by adding IL-6 (20 ng/ml). Cells were monitored at various time points and were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with crystal violet staining solution

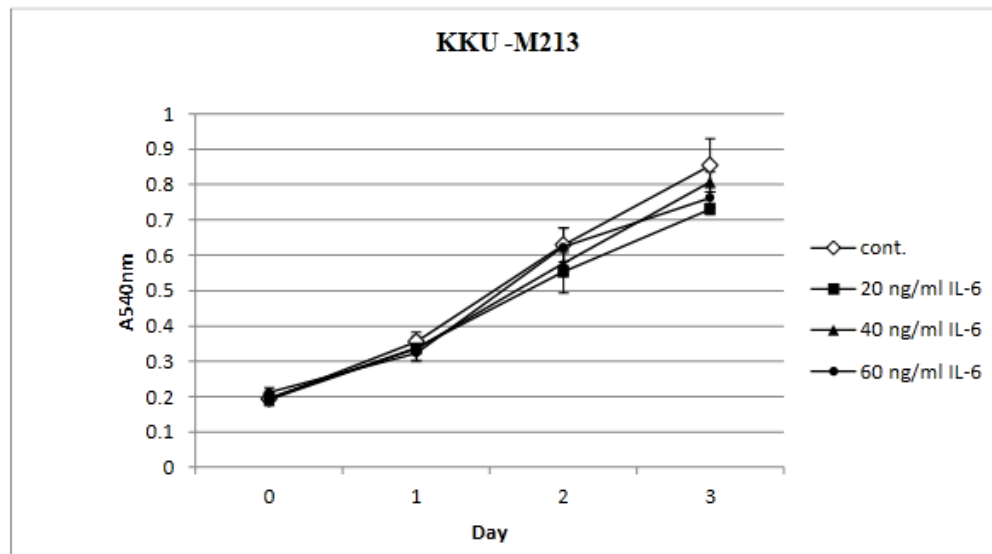


Fig.3 KKU-M213 cells (5000 cells/well) were seeded into 96 well plates and cultured for different periods of time in the presence of IL-6 or with no cytokine added. Growth was assessed by MTT assay. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

3. Cyanidin ที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้ง IL-6 ไม่ให้กระตุ้น STAT3

phosphorylation และยับยั้ง IL-6 กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) KKU-M213

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ cyanidin ว่ามีผลต่อการยับยั้ง IL-6 signaling ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า cyanidin ที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้ง IL-6 ไม่ให้กระตุ้น STAT3 phosphorylation (Fig.4) และ migration ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 (Fig.5)

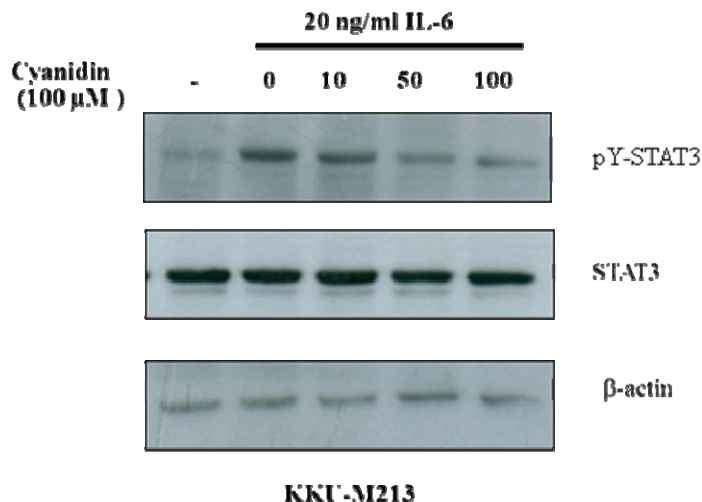


Fig.4 Cells were pretreated or not for 24 h with cyanidin and then stimulated with IL-6 (20 ng/ml) for 15 min or left untreated. Total cellular lysates were analysed by Western blotting for the presence of phosphorylated STAT3 before re-probing of the blots with antibodies to STAT3 and β -actin.

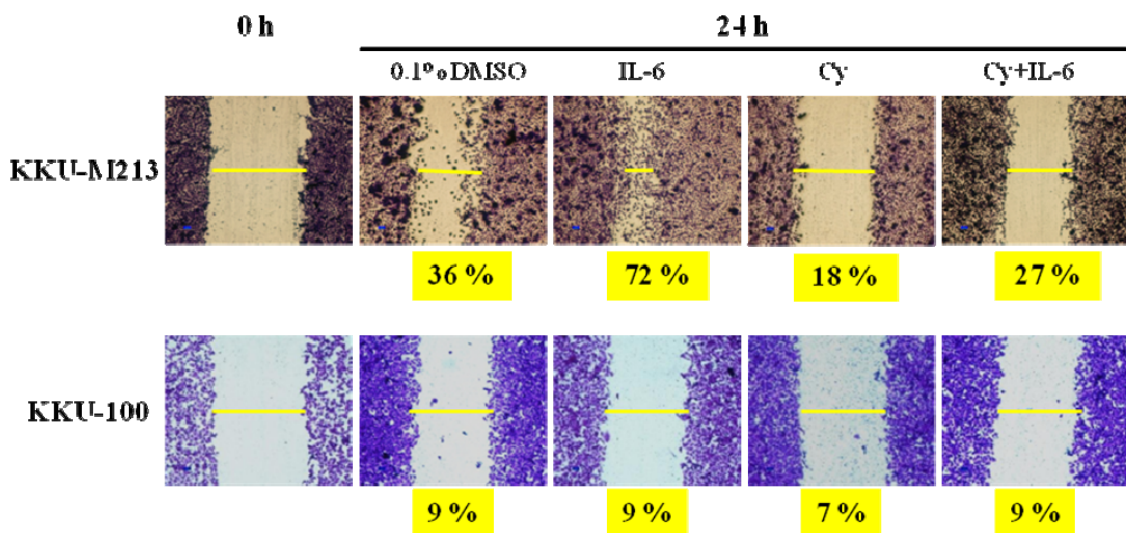


Fig.5 Cells were allowed to form a confluent monolayer in a 24-well plate before wounding. The wound was made by scraping a conventional pipette tip across the monolayer. Cell migration was induced by adding IL-6 (20 ng/ml) in the presence of cyanidin or without cyanidin. Cells were monitored at various time points and were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with crystal violet staining solution

4. การยับยั้ง IL-6 signaling โดยใช้ anti-IL-6 antibody

เพื่อเป็นการยืนยันว่า IL-6 มีบทบาทต่อการกระตุ้นการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์ KKU-M213 ในการทดลองนี้จึงต้องการยับยั้งการทำงานของ IL-6 โดยใช้ anti-IL-6 antibody ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า anti-IL-6 antibody ไปยับยั้งการทำงานของ IL-6 ต่อการกระตุ้น STAT3 phosphorylation (Fig.6) และ migration ของเซลล์ KKU-M213 (Fig.7)

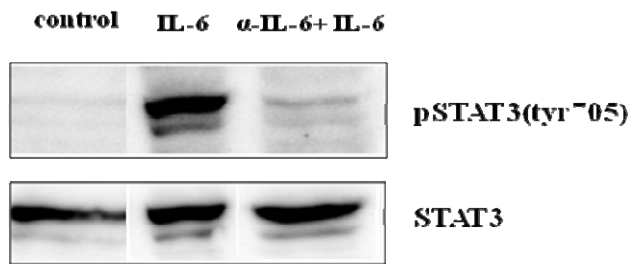


Fig.6 KKU-M213 cells were pretreated with anti-IL-6 antibody and then stimulated with IL-6 (20 ng/ml) for 15 min or left untreated. Total cellular lysates were analysed by Western blotting for the presence of phosphorylated STAT3 before re-probing of the blots with antibodies to STAT3 and β -actin.

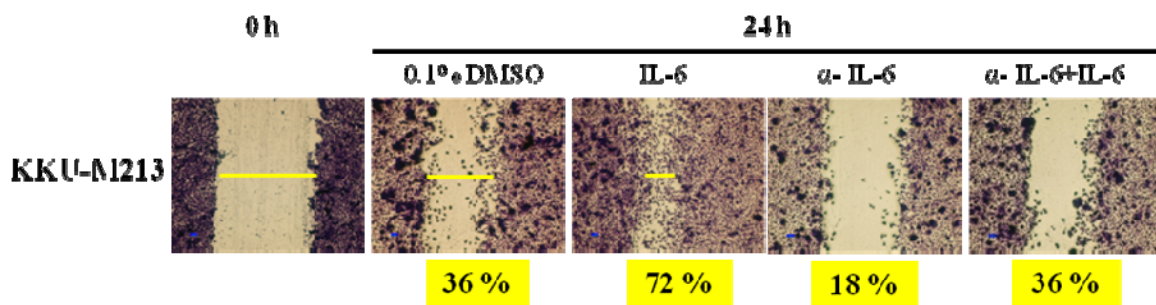


Fig.7 Cells were allowed to form a confluent monolayer in a 24-well plate before wounding. The wound was made by scraping a conventional pipette tip across the monolayer. Cell migration was induced by adding IL-6 (20 ng/ml) in the presence of anti-IL-6 antibody or without anti-IL-6 antibody. Cells were monitored at various time points and were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with crystal violet staining solution

5. Cyanidin ลดการแสดงออกของยีน IL-6R (gp80) โดยใช้เทคนิค Realtime-PCR

การที่ cyanidin ยับยั้ง IL-6 ไม่ให้กระตุ้น STAT3 phosphorylation และ migration ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อาจเนื่องมาจาก เซลล์มีการแสดงออกของ IL-6 receptor (gp80) ลดลง ดังนั้นจึงใช้เทคนิค Realtime-PCR ทดสอบ ผลการทดลองพบว่า cyanidin ไปลดการแสดงออกของยีน IL-6 receptor หรือ gp80 ได้ในเซลล์ KKU-M213 (Fig.8) แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน gp80 ในเซลล์ KKU-100

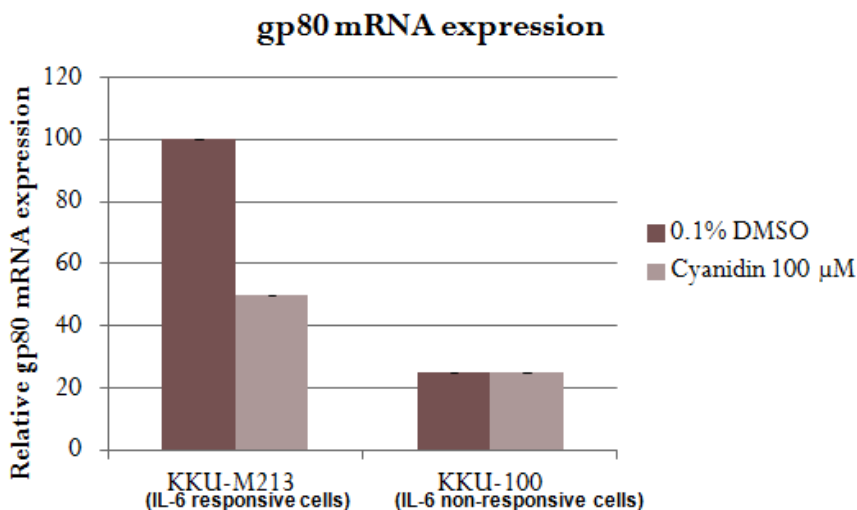


Fig.8 Cells were treated with cyanidin (100 µM) for 24 h or left untreated. Total RNA was analysed by real-time PCR for expression of IL-6R (gp80) mRNA (normalized to mRNA levels of the β -actin housekeeping gene).

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาบทบาทของ IL-6 และ cyanidin ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-M213 และ KKU-100 พบว่า (1) IL-6 สามารถกระตุ้น STAT3 phosphorylation และ migration ของเซลล์ KKU-M213 ได้ แต่ IL-6 ไม่มีผลใดๆ ต่อเซลล์ KKU-100 เนื่องจากไม่ค่อยมีตัวจับกับ IL-6 (IL-6R, gp80) อย่างไรก็ดีตาม IL-6 ไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (proliferation) ทั้งสองชนิด (2) เมื่อ treat เซลล์ ด้วย cyanidin ที่ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cyanidin สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง IL-6 กระตุ้น STAT3 phosphorylation และยับยั้ง IL-6 กระตุ้น migration ของเซลล์ KKU-M213 แต่ cyanidin ไม่มีผลต่อเซลล์ KKU-100 และ (3) เมื่อศึกษากลไกการยับยั้งของ cyanidin พบว่า การที่ IL-6 กระตุ้น STAT3 phosphorylation ได้ลดลงเนื่องจาก cyanidin ไปลดการแสดงออกของยีน IL-6R (gp80) ในระดับ mRNA ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า cyanidin ยับยั้งการส่งสัญญาณของ IL-6 ผ่านทาง STAT3 และ cyanidin อาจจะใช้เป็นยารักษาาร่วมกันสำหรับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่ตอบสนองต่อ IL-6

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
กำลังเขียน manuscript เพื่อตีพิมพ์
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
มี collaboration กับ Prof. Dr. Iris Behrmann
Life Sciences Research Unit-Signal Transduction Laboratory
University of Luxembourg
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
มีการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท 1 คน และ ปริญญาตรี 2 คน
(สำเร็จการศึกษาแล้ว)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
Oral Presentation ในการประชุมวิชาการ 16th International conference
“ Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes” เรื่อง Cyanidin
inhibition of IL-6-induced migration of cholangiocarcinoma cells through
the JAK/STAT3 signaling pathway” ณ เมือง Weimar ประเทศ Germany
ระหว่างวันที่ 5-7 พฤศจิกายน 2555