

**ACTIVATION OF CHOLANGIOCARCINOMA CELL  
INVASIVENESS BY TNF- $\alpha$**



**PANTHIP RATTANASINGANCHAN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

กลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการกระตุ้นจาก TNF- $\alpha$   
(ACTIVATION OF CHOLANGIOCARCINOMA CELL INVASIVENESS BY  
TNF- $\alpha$ )

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ 4637318 SCBC/D

ปร.ค. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ฤทัยวรรณ โต้ะทอง, Ph.D. (MOLECULAR  
GENETICS), ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), กวิญญู ลีละวัฒน์, Ph.D.  
(ANATOMY)

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยมีความสัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ในตับและการอักเสบเรื้อรัง TNF- $\alpha$  คือไซโตไคน์ที่มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันและการอักเสบซึ่งมีผลต่อการตอบสนองต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์, การเพิ่มจำนวนของเซลล์, การตายของเซลล์ และการหลั่งเอนไซม์ MMP

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษากลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการกระตุ้นจาก TNF- $\alpha$  โดยใช้เซลล์ RMCCA-1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เพาะเลี้ยงขึ้นเองเป็นแบบอย่าง

RMCCA-1 เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่ประสบความสำเร็จจากการนำชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีของชายไทยที่ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงและพบว่า RMCCA-1 คงคุณสมบัติเช่นเดียวกับชิ้นเนื้อมะเร็งคือมีการหลั่งโปรตีนซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้มะเร็งคือ CA19-9 สูงมากกว่าค่าปกติ นอกจากนี้ RMCCA-1 ยังมีความสามารถในการเคลื่อนที่สูงแต่ความสามารถในการบุกรุกดำในภาวะปกติ การวิเคราะห์โดยวิธี RT-PCR พบ TNFR2 และพบความผิดปกติในการแสดงออกของ TNFR1 ใน RMCCA-1

เพื่อศึกษากลไกการบุกรุกของเซลล์มะเร็งจึงกระตุ้นด้วย TNF- $\alpha$  พบว่าเพิ่มการบุกรุกของเซลล์ตามขนาดความเข้มข้นในขณะที่การแบ่งตัวของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง และยังพบว่า TNF- $\alpha$  ได้กระตุ้นการหลั่งและการแสดงออกของ MMP-9 การกระตุ้นการบุกรุกและ MMP-9 ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดย TNF- $\alpha$  ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งต่อ MAPK, PI3K pathway และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- $\kappa$ B จึงกล่าวได้ว่าการกระตุ้นนี้ผ่านโมเลกุลเหล่านี้ซึ่งทดสอบยืนยันโดยวิธี western blot นอกจากนี้การใช้สารยับยั้งการกระตุ้น MAPK, PI3K และ NF- $\kappa$ B pathway มีผลต่อการลดการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและการหลั่งของ MMP-9 ซึ่งยืนยันโดย Western Blot นอกจากนี้ PSI ยับยั้ง NF- $\kappa$ B เคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสในขณะที่ LY294002 และ U0126 ซึ่งยับยั้งการกระตุ้น phospho-S6 และ phospho-42/44 MAPK ไม่สามารถยับยั้งได้ การวิเคราะห์ด้วยวิธี proteomics พบว่า 100 ng/ml TNF- $\alpha$  กระตุ้นการแสดงออกของ CDC42 โปรตีนอย่างเด่นชัดซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่และบุกรุกของเซลล์มะเร็ง

ACTIVATION OF CHOLANGIOCARCINOMA CELL INVASIVENESS BY  
TNF- $\alpha$

PANTHIP RATTANASINGANCHAN 4637318 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: RUTAIWAN TOHTONG, Ph.D. (MOLECULAR  
GENETICS), TUANGPORN SUTHIPHONGCHAI, Ph.D. (BIOCHEMISTRY),  
KAVIN LEELAWAT, M.D., Ph.D. (ANATOMY)

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) in Thai patients is closely associated with liver fluke infection and chronic inflammation. TNF- $\alpha$  is a cytokine that has been shown to be involved in immunity and inflammation by eliciting a broad spectrum of responses, including cell motility, proliferation, apoptosis and MMP secretion.

This study investigated if, and how, TNF- $\alpha$  is involved in controlling the invasiveness of cholangiocarcinoma using RMCCA-1 cell line that was established as a model. A cholangiocarcinoma cell line was successfully established from a Thai patient, named RMCCA-1. The cell line expressed general characteristics of biliary epithelium and retained some characteristics of the original tumor including overexpression of the tumor marker CA19-9. It also exhibited a high degree of *in vitro* motility, although the invasiveness was low. The RMCCA-1 cell expressed a TNFR2 receptor as determined by RT-PCR. It remains unproven whether RMCCA-1 expressed TNFR1, as an aberrant-sized PCR product was amplified when primers specific for TNFR1 receptor were used.

To understand the role of TNF- $\alpha$  in regulating the invasiveness of cholangiocarcinoma, the RMCCA-1 cells were treated with various doses of TNF- $\alpha$  and assayed for *in vitro* invasiveness. *In vitro* invasion of RMCCA-1 increased dose-dependently with TNF- $\alpha$  treatment while cell proliferation was virtually unaltered. MMP-9 activity in the conditioned medium increased in response to TNF- $\alpha$ , although independent of the dosage applied. Enhancement of *in vitro* invasion and MMP-9 activity was significantly reduced by inhibitors of ERK1/2, PI3-kinase and NF- $\kappa$ B, suggesting that the TNF- $\alpha$ -activated phenotypes were mediated by these molecular signaling pathways. Involvement of ERK1/2, PI3-kinase and NF- $\kappa$ B-mediated signaling was confirmed by a Western Blot. Furthermore, LY294002 and U0126 suppressed phospho-S6 ribosomal protein and phospho-42/44 MAPK, but not NF- $\kappa$ B translocation which was, instead, blocked by PSI. Proteomics analysis of RMCCA-1 cells treated with 100 ng/ml TNF- $\alpha$  demonstrated a significant up-regulation of CDC42, correlating with enhancement of *in vitro* invasiveness by TNF- $\alpha$ .

KEY WORDS: TNF- $\alpha$ /CHOLANGIOCARCINOMA/INVASION/MMP-9  
162 P.