

การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและ ออโตฟาจีในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Silencing of SRSF1 Expression Induces Apoptosis and Autophagy-dependent Cell Death in Cholangiocarcinoma Cell

พิชามนช์ เพ็ชรฉวาง (Phichamon Phetchahwang)* ปวีร์ ตั้งวิริยโรจน์กุล (Pawee Tangwirirotkul)*

ศิรินทิพย์ สีสุกใส (Sirinthip Seesuksai)** ดร.ณัฐนันท์ หงษ์ศรีจันทร์ (Dr.Nuttanan Hongsrichan)***

ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง (Dr.Worasak Kaewkong)****

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งชนิดที่มีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย มีอัตราการตายสูงเนื่องจากวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ยังไม่มีประสิทธิภาพเนื่องจากยังไม่มีตัวบ่งชี้สำหรับการวินิจฉัยในระยะแรก ข้อมูลล่าสุดได้มีการรวบรวมไอโซฟอร์มของโปรตีนที่เกิดจากการตัดแต่งยีนที่ผิดปกติและสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคมะเร็งท่อน้ำดี กระบวนการนี้ถูกควบคุมโดย Serine/Arginine-rich Splicing Factors (SRSFs) การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโปรตีน SRSF1 และผลการศึกษายืนยันว่าการแสดงออกสูงขึ้นในเนื้อเยื่อผู้ป่วยและในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เมื่อศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วย small interfering RNA (siRNA) พบว่าการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มขึ้น โดยพบการตายของเซลล์ทั้งแบบอะพอพโทซิสและออโตฟาจี ดังนั้น โปรตีน SRSF1 อาจสามารถใช้เป็นโมเลกุลเป้าหมายใหม่เพื่อพัฒนาการรักษาแบบการแพทย์แม่นยำสำหรับโรคมะเร็งท่อน้ำดี

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is a high incidence cancer in Thailand which presents high mortality rate resulting from low sensitivity of diagnosis. Recent publication summarized the contribution of aberrant alternative splicing with CCA development, this process is regulated by Serine/Arginine-rich splicing factors or SRSFs. In this study, we focused on SRSF1 and demonstrated that SRSF1 was upregulated in both CCA patients' tissues and CCA cells. After SRSF1 expression was suppressed by small interfering RNA (siRNA). Increasing of death cell number was demonstrated and categorized into apoptosis and autophagy-dependent cell death. Therefore, SRSF1 might be serving as a new alternative target for precision therapeutic strategy of CCA.

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำดี SRSF1 การตายของเซลล์

Keywords: Cholangiocarcinoma, SRSF1, Cell death

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

***อาจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma หรือ CCA) เกิดจากการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังท่อน้ำดีในท่อน้ำดี มีอุบัติการณ์สูงในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย (Bridgewater et al., 2014) ปัจจัยเสี่ยงสำคัญเกิดจากการรับประทานปลาน้ำจืดที่ปรุงไม่สุกที่ปนเปื้อนตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchis viverrini) และนำสู่การพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยมะเร็งท่อน้ำดีจะไม่แสดงอาการจำเพาะในระยะเริ่มต้น จนกระทั่งเข้าสู่ระยะรุนแรงของโรคและมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่าง ๆ (Prueksapanich et al., 2018) วิธีการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันยังมีความไวและความจำเพาะต่ำเป็นผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยลดลง อีกทั้งการรักษาโดยการผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัดหรือการฉายรังสีที่อาจยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยในระยะแรก รวมทั้งการรักษาผู้ป่วยโดยเฉพาะในระยะรุนแรงของโรค ดังนั้นการเข้าใจถึงความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกระบวนการเกิดของโรคมะเร็งท่อน้ำดีและการทำงานของโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องนั้น อาจนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนาแนวทางและกลยุทธ์การรักษาแบบการแพทย์แม่นยำให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

กระบวนการสำคัญระดับเซลล์ที่ผู้วิจัยสนใจ คือ กระบวนการตัดแต่งชิ้นส่วนของ mRNA หรือ Alternative Splicing ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการถอดรหัสของยีน (Post-transcriptional modification) โดยหากกระบวนการตัดแต่งชิ้นส่วนของ mRNA ผิดปกติหรือไม่สมบูรณ์จะสามารถนำไปแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีไอโซฟอร์มที่แตกต่างกันไป (Wang et al., 2015) ซึ่งอาจได้เป็นไอโซฟอร์มที่สามารถส่งเสริมการเกิดและการพัฒนาของมะเร็งได้ (oncogenic isoform) จึงมีการบันทึกให้เป็นอีกหนึ่งเครื่องหมายบ่งชี้การเป็นมะเร็ง (cancer hallmark) (Ladomery, 2013) ก่อนหน้านี้นักการตีพิมพ์งานวิจัยเกี่ยวกับการเกิดความผิดปกติของกระบวนการ Alternative splicing ในมะเร็งท่อน้ำดี โดยได้ยกตัวอย่างความผิดปกติที่เกิดขึ้นในยีนสำคัญ ได้แก่ CD44 (CD44v6/CD44v8-10) Wnt-Inducible Secreted Protein 1 (WISP1v) Tumor Protein 53 ($\Delta 133p53$) และ Anterior gradient2 (AGR2vH) ซึ่งไอโซฟอร์มที่เกิดขึ้นเหล่านี้ช่วยส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็ง ได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเกิดเนื้องอก การดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิส การแพร่กระจายและการดื้อต่อยาเคมีบำบัด เป็นต้น (Yosudjai et al., 2019) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาบทบาทของโปรตีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการนี้ ได้แก่ Serine/Arginine-rich Splicing Factors (SRSFs) ซึ่งมีจำนวน 12 ชนิด (SRSF1-SRSF12) แต่ละชนิดประกอบด้วย 2 โดเมนสำคัญ ได้แก่ โดเมนสำหรับการจดจำ mRNA เป้าหมาย (RNA recognition motif; RRM) และโดเมนสำหรับการถูกกระตุ้นการทำงานโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตซึ่งมีการเรียงตัวซ้ำของกรดอะมิโนชนิดเซอรีนและอาร์จินีน (Serine/Arginine rich domain; RS domain) (Änkö, 2014) ซึ่งนอกเหนือจากการทำหน้าที่ในการนำส่ง mRNA (mRNA export) จากนิวเคลียสออกไปยังไซโทพลาสซึม (Das, Krainer, 2014) โปรตีนกลุ่ม SRSFs ยังมีการทำงานร่วมกับ spliceosome โดยเข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะเพื่อทำการตัด intron ออกจาก pre-mRNA จากนั้นเชื่อมต่อ exon เข้ารวมกัน (Wang et al., 2015) ดังนั้น หาก SRSFs มีการทำงานที่ผิดปกติไปอาจนำไปสู่การสังเคราะห์ได้เป็นไอโซฟอร์มของโปรตีนที่อาจส่งเสริมคุณสมบัติการเป็นมะเร็ง (oncogenic isoform) (Bonomi et al., 2003; Pajares et al., 2007; Silva et al., 2015)

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจมุ่งเป้าศึกษา SRSF1 เนื่องจากมีการแสดงออกที่สูงขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติและมีความแตกต่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ SRSF โมเลกุลอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับหลอดทดลอง (ผู้วิจัยไม่ได้แสดงข้อมูลในบทความนี้) อีกทั้ง มีการรายงานแสดงข้อมูลว่า SRSF1 มีการแสดงออกสูงในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม (Anczuków et al., 2015) มะเร็งลำไส้ (Chen et al., 2017) และมะเร็งปอด (Jiang et al., 2016) โดยพบว่า SRSF1 มีบทบาทเกี่ยวข้องในการส่งเสริมคุณสมบัติในการหลบหนีการตายของเซลล์มะเร็ง ยกตัวอย่างเช่น SRSF1 ที่มีการแสดงออกสูงในมะเร็งเต้านมทำให้ยีน BIM ถูกตัดแต่งได้เป็น BIM Ψ 1 ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ Bcl-2 ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมสามารถหลบ

หลักกระบวนการตายของเซลล์ แต่เมื่อยับยั้งการทำงานของ SRSF1 ด้วย short hairpin RNA (shRNA) พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านมมีการเข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมากขึ้น (Anczuków et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายืนยันการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยและในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 เพื่อศึกษาการตายในรูปแบบที่จำเพาะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยดูการแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้การตายในรูปแบบอะพอพโทซิสและออโตฟาจี

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยและในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และการยับยั้งโปรตีน SRSF1 ด้วย small interfering RNA (siRNA) ที่จำเพาะ แล้วตรวจสอบการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งในรูปแบบอะพอพโทซิสและออโตฟาจี

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ตัวอย่างเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์และได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (HE521209) การออกแบบและขั้นตอนการทดลองได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาด้านจริยธรรมของมนุษย์ของมหาวิทยาลัยนเรศวร (NU-IRB0895/61) อ้างอิงตามเอกสาร Declaration of Helsinki, The Belmont report, CIOMS Guideline International and conference on harmonization in good clinical practice โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการระบุบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (Tumor; T) และเนื้อเยื่อปกติบริเวณข้างเคียง (Adjacent non-tumor; N)

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ประกอบด้วย เซลล์ท่อน้ำดีชนิด MMNK-1 (immortalized cholangiocyte) และเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ระดับการเปลี่ยนแปลงสภาพ (Cell differentiation) แตกต่างกัน ได้แก่ KKU-055 และ KKU-213 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin Streptomycin-antibiotic (Thermo Fisher Scientific, MA) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนและการศึกษาการแสดงออกระดับโปรตีนด้วยวิธี Western blot

ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ MMNK-1 KKU-055 และ KKU-213 ด้วย Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay โปรตีน 20 ไมโครกรัม จากแต่ละตัวอย่างเซลล์ถูกนำมาแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ก่อนทำการย้ายโปรตีนไปยังแผ่น PVDF membrane ก่อนนำไปบ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมาย (mouse anti-human SRSF1, rabbit anti-human BAX และ rabbit anti-human LC3B) จากนั้นติดตามด้วย HRP-linked secondary antibody (rabbit anti-mouse และ Donkey anti rabbit) และตรวจสอบด้วย Enhance Chemiluminescence (ECL) Prime Western Blotting Detection System สุดท้ายทำการถ่ายภาพด้วยเครื่อง ImageQuant™ 4000 image analyzer เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ™

การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนด้วย small interfering RNA (siRNA) ที่จำเพาะ

ผู้วิจัยใช้ siRNA ที่จำเพาะต่อ SRSF1 จำนวน 2 เส้น ได้แก่ siSRSF1-1; 5'-CCAACAAGATAGAGTATAA-3' (Jiang et al., 2016) และ siSRSF1-2; 5'-GGAAAGAAGATATGACCTA-3' (Fu et al., 2013) เปรียบเทียบกับ Negative control siRNA (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA) โดยขั้นตอนการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ใช้ Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, USA) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 จำนวนตั้งต้น 2×10^5 เซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในขั้นตอนสุดท้ายนำเซลล์มาสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อใช้ตรวจสอบผลการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วยเทคนิค Western blot

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมสี Trypan blue

นำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วย siRNAs แล้ว 48 ชั่วโมงผสมกับสี Trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยอาศัยหลักการการกำจัดสีออกจากเซลล์ที่มีชีวิต (Dye exclusion assay) (Xiao et al., 2006) จากนั้นนับแยกเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ที่กำจัดสีออกได้) และเซลล์ตาย (เซลล์ที่ย้อมติดสี) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้อุปกรณ์ Hemocytometer ในการนับแยกเซลล์

การศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยการย้อมสี AnnexinV/7-AAD

นำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วย siRNAs แล้ว 48 ชั่วโมงจำนวน 4×10^5 เซลล์ผสมกับ Muse™ AnnexinV & Death Cell Reagent (Merck Millipore, USA) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องและดูการตายของเซลล์ด้วยเครื่อง Muse® Cell Analyzer เพื่อจำแนกเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ที่ย้อมไม่ติดสี AnnexinV และ 7-AAD) กับเซลล์ที่ย้อมที่ตายแบบอะพอพโทซิส (เซลล์ที่ย้อมติดสี AnnexinV หรือย้อมติดสีทั้ง AnnexinV และ 7-AAD)

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้รูปแบบการตายอย่างจำเพาะ

นำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วย siRNAs แล้ว 48 ชั่วโมงมาสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อใช้ตรวจสอบผลการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ต่อการแสดงออกของ BAX (Bcl-2 associated X, Apoptosis regulator) ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายในรูปแบบอะพอพโทซิสและการแสดงออกของ LC3B (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายในรูปแบบออโตฟาจี ด้วยเทคนิค Western blot

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

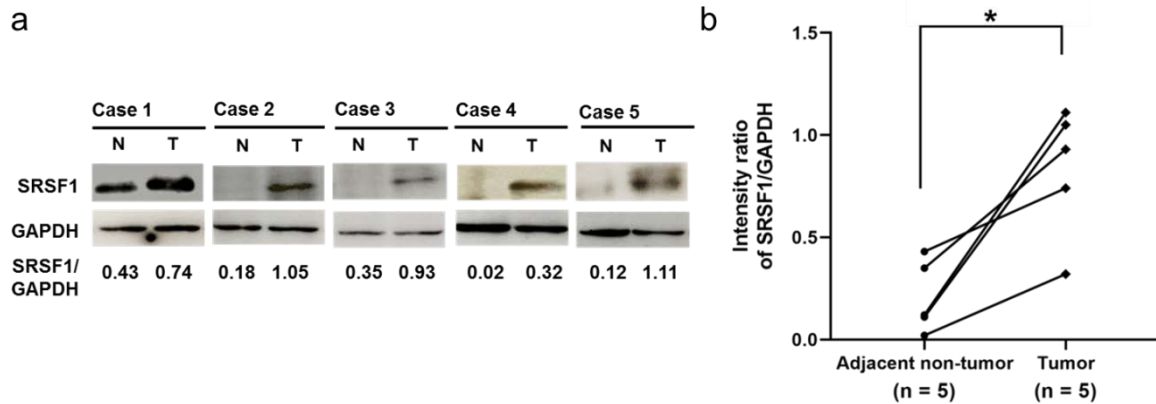
ผลการทดลองแสดงโดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ SD และใช้การเปรียบเทียบสถิติแบบ Student's t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ คำนวณค่าโดยใช้ GraphPad Prism และพิจารณาโดยใช้ค่านัยสำคัญทางสถิติ ดังนี้ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$

ผลการวิจัย

ผลการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 จากตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวนทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยได้ระบุบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (T) และเนื้อเยื่อปกติบริเวณข้างเคียง (N) พบว่าโปรตีน SRSF1 มีการแสดงออกในระดับที่ต่ำในเนื้อเยื่อปกติบริเวณข้างเคียง ยกเว้นในเนื้อเยื่อผู้ป่วยรายที่ 1 (Case 1) ที่มีการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 อยู่แล้ว อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ที่สูงขึ้นในบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

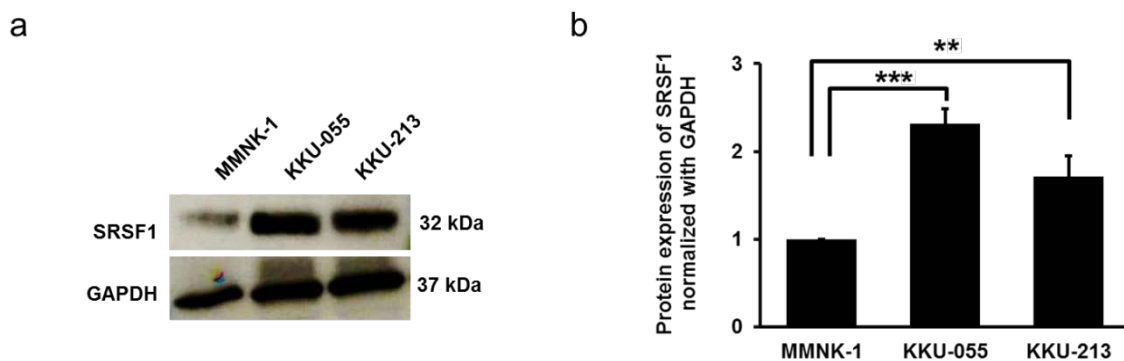
ของผู้ป่วยทั้ง 5 ราย และเมื่อนำค่าความเข้มของแถบโปรตีนที่คำนวณได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบก็พบว่า การแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (T) สูงกว่าเนื้อเยื่อปกติบริเวณข้างเคียง (N) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติบริเวณรอบๆ มะเร็ง (N) และเนื้อเยื่อบริเวณมะเร็ง (T) (a) และกราฟแสดงผลการคำนวณความเข้มของแถบโปรตีนและค่าเฉลี่ยสำคัญทางสถิติ (b)

ผลการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาการแสดงผลการคำนวณความเข้มของแถบโปรตีน SRSF1 ด้วยวิธี Western blot จากตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ท่อน้ำดี ชนิด MMNK-1 และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-055 และ KKU-213 พบว่าโปรตีน SRSF1 มีการแสดงออกที่ต่ำในเซลล์ MMNK-1 และมีการแสดงออกที่สูงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และเมื่อนำค่าความเข้มของแถบโปรตีนที่คำนวณได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบก็พบว่า การแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิดสูงขึ้นกว่าเซลล์ท่อน้ำดีปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)

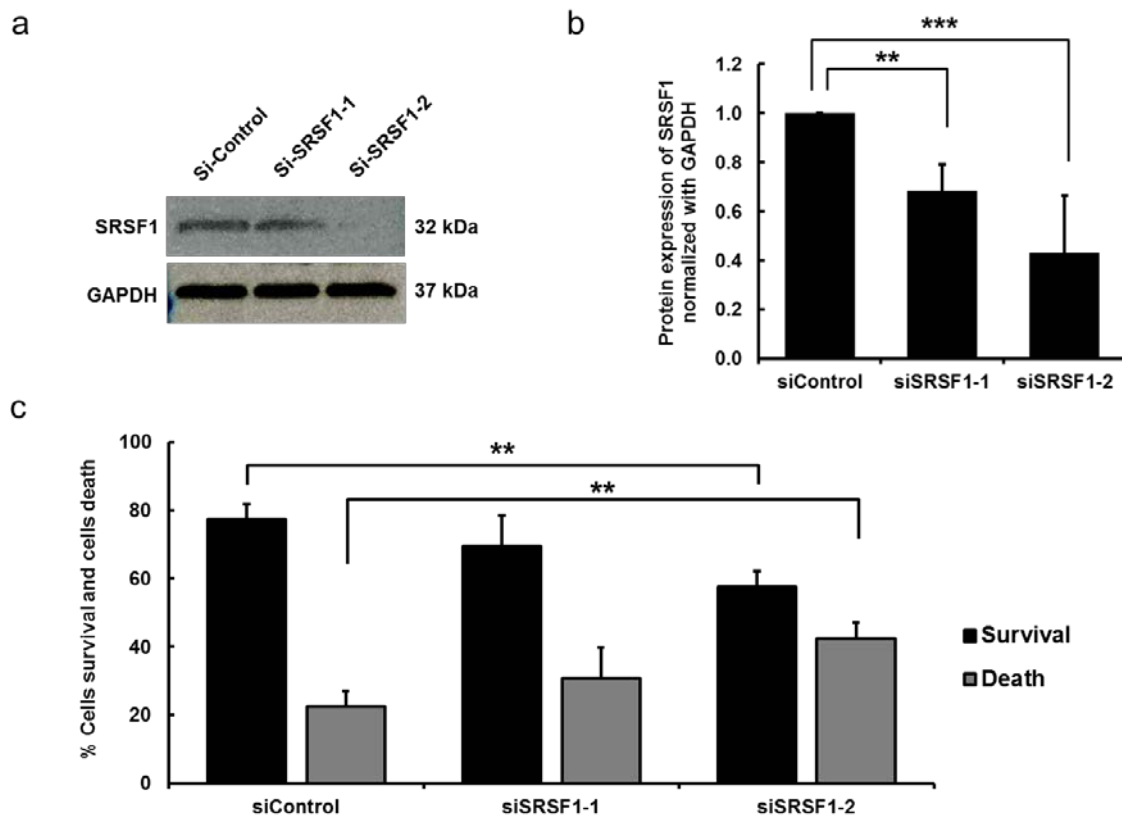


รูปที่ 2 การแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-055 และ KKU-213) เปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติ (MMNK-1) (a) และกราฟแสดงผลการคำนวณความเข้มของแถบโปรตีนและค่าเฉลี่ยสำคัญทางสถิติ (b)

ผลการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผลการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ด้วย siRNA ที่จำเพาะในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 พบว่า siRNA ทั้ง 2 เส้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ได้สำเร็จ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ siControl และเมื่อนำค่าความเข้มของแถบโปรตีนที่คำนวณได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบก็พบว่า การแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของ siRNA เส้นที่ 2 (siSRSF1-2)

นอกจากนั้น เมื่อนำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วย siRNA ทั้ง 2 เส้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมสี Trypan blue และตรวจนับแยกเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ที่กำจัดสีออกได้) และเซลล์ตาย (เซลล์ที่ย้อมติดสี) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนเซลล์ตายเพิ่มมากขึ้น โดยทำการแสดงผลเป็นกราฟการนับแยกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Survival) และเซลล์ตาย (Death) ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 สามารถส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของ siRNA เส้นที่ 2 (siSRSF1-2) ที่แสดงการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3)

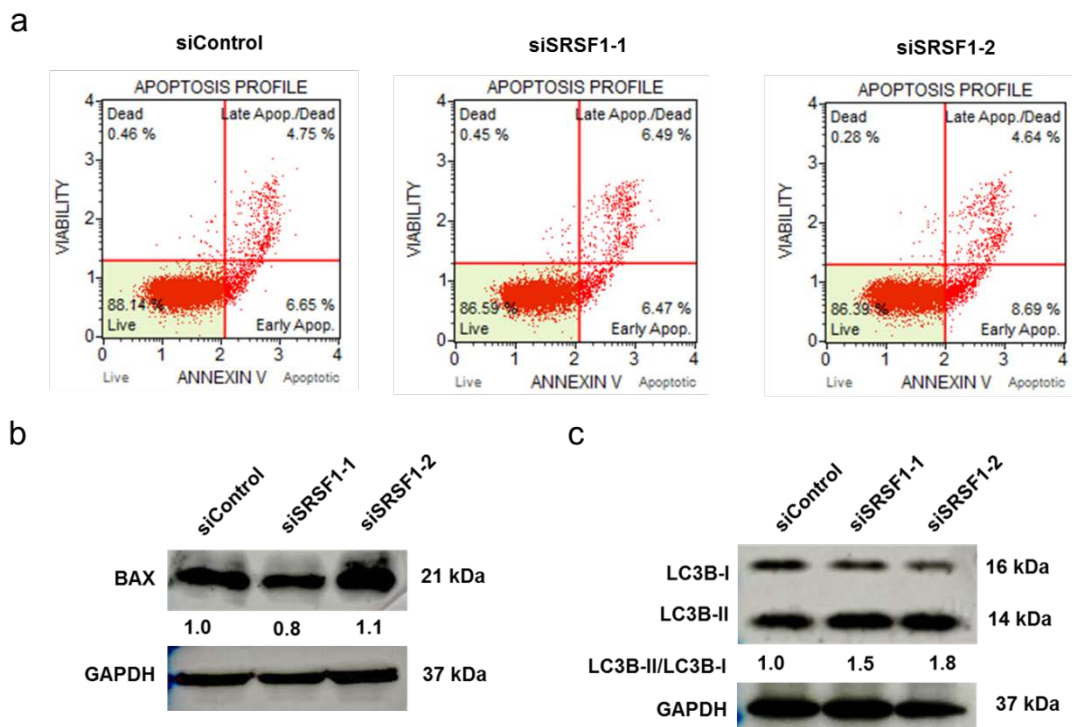


รูปที่ 3 ประสิทธิภาพของ siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 และส่งผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ผลการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 โดย siRNA จำนวน 2 เส้น (a) กราฟแสดงผลการคำนวณความเข้มของแถบโปรตีนและคำนวณค่าทางสถิติ (b) และกราฟแสดงผลการนับแยกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายที่ย้อมติดสี Trypan blue หลังยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 (c)

ผลการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ที่ส่งผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เมื่อนำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ด้วย siRNA ทั้ง 2 เส้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาศึกษาการตายโดยการย้อมสี AnnexinV/7AAD แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่ามีกลุ่มประชากรเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้น โดยการยับยั้ง siRNA เส้นที่ 1 (siSRSF1-1) ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสในระยะท้าย (Late apoptosis) ในขณะที่การยับยั้ง siRNA เส้นที่ 2 (siSRSF1-2) ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสในระยะแรก (Early apoptosis)

นอกจากนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษารูปแบบการตายที่จำเพาะโดยยืนยันด้วยการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้การตายรูปแบบต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า เมื่อยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน BAX ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยสังเกตได้จากผลจากการยับยั้ง siRNA เส้นที่ 2 (siSRSF1-2) แต่สามารถสังเกตผลได้ชัดเจนเมื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน LC3B ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายแบบออโตฟาจี โดยตรวจวัดอัตราส่วนระหว่างโปรตีน LC3B-II (ขนาด 14 kDa) ต่อโปรตีน LC3B-I (ขนาด 16 kDa) ซึ่งผลการยับยั้งโปรตีน SRSF1 ด้วย siRNA ทั้ง 2 เส้นให้ผลการเพิ่มขึ้นของโปรตีน LC3B-II ไปในทิศทางที่สอดคล้องกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ต่อรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ภาพแสดงสัดส่วนกลุ่มประชากรเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสหลังยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 (a) การแสดงออกของโปรตีน BAX ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายแบบอะพอพโทซิส (b) และการแสดงออกของโปรตีน LC3B-II ต่อโปรตีน LC3B-I ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายแบบออโตฟาจี (c)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การแสดงผลของโปรตีน SRSF1 จากตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่ามีการแสดงออกที่สูงขึ้นในบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยทั้ง 5 ราย (รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกของโปรตีน SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่พบว่าโปรตีน SRSF1 มีการแสดงออกที่สูงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา (รูปที่ 2) โดยสัมพันธ์กับการรายงานล่าสุดที่แสดงผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ SRSF1 ในมะเร็งชนิดต่างๆ โดยโปรแกรม Genevestigator พบว่า SRSF1 มีการแสดงออกสูงกว่า SRSF ชนิดอื่นๆ ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็ง 8 ชนิด ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด มะเร็งกระดุก มะเร็งเมลาโนมา มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ มะเร็งตับอ่อนและมะเร็งสมอง ยกเว้น การแสดงออกในมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่ง SRSF1 มีการแสดงออกที่น้อยกว่า SRSF9 SRSF10 SRSF2 และ SRSF3 (Zhou et al., 2019)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 โดยใช้ siRNA 2 เส้นซึ่งอ้างอิงมาจากการวิจัยในมะเร็งปอด 2 เรื่องที่ออกแบบ siRNA จากคนละตำแหน่งบนโครงสร้างของ mRNA ของ SRSF1 (Fu et al., 2013; Jiang et al., 2016) ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า siRNA เส้นที่ 2 (siSRSF1-2) มีประสิทธิภาพของการยับยั้งการแสดงออก (Knockdown efficiency) ที่เห็นได้ชัดกว่า siRNA เส้นที่ 1 (siSRSF1-1) (รูปที่ 3a และ 3b)

เมื่อนำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ทำการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 มาศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ พบว่า มีแนวโน้มของการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนเซลล์ตายจากการยับยั้งด้วย siRNA เส้นที่ 1 (siSRSF1-1) และมีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนเซลล์ตายที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการยับยั้งด้วย siRNA เส้นที่ 2 (siSRSF1-2) (รูปที่ 3c) ซึ่งสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของการยับยั้งการแสดงออกของ siRNA ซึ่งอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงจากการศึกษาครั้งนี้ก็สัมพันธ์กับการศึกษาโดยสมาชิกในกลุ่มวิจัยที่พบว่ามีการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับหลอดทดลองที่ลดลงหลังยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 (ผู้วิจัยไม่ได้แสดงข้อมูลในบทความนี้) นอกเหนือจากนี้ผลการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่นก็ยังพบว่า การยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 นั้นสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด RKO และ SW620 ได้ (Chen et al., 2017) และเซลล์มะเร็งสมองชนิด U87MG และ U251 (Zhou et al., 2019) ที่นอกเหนือจากการเจริญเติบโตของเซลล์แล้วยังส่งผลต่อการหยุดวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 ของเซลล์มะเร็งสมองอีกด้วย

สำหรับบทบาทของโปรตีน SRSF1 ที่เกี่ยวข้องในการส่งเสริมคุณสมบัติในการหลบหลีกการตายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของมะเร็งที่ผู้วิจัยสนใจก็มีรายงานการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านมที่รายงานว่า SRSF1 ที่มีการแสดงออกสูงขึ้นทำให้ยีน BIM ถูกตัดแต่งได้เป็น BIM Ψ 1 ที่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ Bcl-2 แล้วส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมสามารถหลบหลีกกระบวนการตายของเซลล์ได้ (Anczuków et al., 2012)

ในการศึกษาครั้งนี้ การยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของกลุ่มประชากรเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส (รูปที่ 4a) และการแสดงออกของโปรตีน BAX ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้การตายแบบอะพอพโทซิส (รูปที่ 4b) อีกทั้งเมื่อตรวจสอบการตายอีกรูปแบบหนึ่งที่สำคัญ คือ การตายแบบออโตฟาจีหรือการกลืนกินตัวเองของเซลล์ก็พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ SRSF1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนระหว่างโปรตีน LC3B-II ต่อโปรตีน LC3B-I (รูปที่ 4c) ซึ่งบ่งชี้การตายแบบออโตฟาจีได้

ลำดับต่อไป ผู้วิจัยสนใจศึกษาลักษณะการตายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron microscope) ซึ่งสามารถสังเกตเพื่อแยกรูปแบบการตายจากลักษณะภายในเซลล์หรืออวัยวะที่เกิดความเสียหายได้ (Phimsen et al., 2012; Shan et al., 2018) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาเบื้องต้นของงานวิจัยนี้พบว่าการยับยั้งโปรตีน SRSF1 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเกิดการตายทั้งแบบอะพอพโทซิสและ

อโธพาลิจ ดังนั้น จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการสนับสนุนและต่อยอดเพื่อวางแผนงานวิจัยในการประยุกต์ใช้โปรตีน SRSF1 เป็นโมเลกุลเป้าหมายใหม่เพื่อพัฒนากลยุทธ์และวิธีการรักษาแบบการแพทย์แม่นยำสำหรับโรคมะเร็งท่อน้ำดี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างในงานวิจัย และการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ MRG608014) และทุนบัณฑิตศึกษาสำหรับนิสิตที่มีผลการเรียนดี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

- Anczuków O, Rosenberg AZ, Akerman M, Das S, Zhan L, Karni R, et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(2): 220-8.
- Anczuków O, Akerman M, Cléry A, Wu J, Shen C, Shirole NH, et al. SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer. *Mol Cell* 2015; 60(1): 105-17.
- Änkö ML. Regulation of gene expression programmes by serine-arginine rich splicing factors. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 32: 11-21.
- Bonomi S, Gallo S, Catillo M, Pignataro D, Biamonti G, Ghigna C. Oncogenic Alternative Splicing Switches: Role in Cancer Progression and Prospects for Therapy. *Int J Cell Biol* 2003; 22(9): 1285-1301
- Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2014; 60(6): 1268-89.
- Chen L, Luo C, Shen L, Liu Y, Wang Q, Zhang C, et al. SRSF1 Prevents DNA Damage and Promotes Tumorigenesis through Regulation of DBF4B Pre-mRNA Splicing. *Cell Rep* 2017; 21(12): 3406-13.
- Das S, Krainer AR. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 12(9): 1195-204.
- Fu Y, Huang B, Shi Z, Han J, Wang Y, Huangfu J, et al. SRSF1 and SRSF9 RNA binding proteins promote Wnt signalling-mediated tumorigenesis by enhancing β -catenin biosynthesis. *EMBO Mol Med* 2013; 5(5): 737-50.
- Jiang L, Huang J, Higgs BW, Hu Z, Xiao Z, Yao X, et al. Genomic Landscape Survey Identifies SRSF1 as a Key Oncodriver in Small Cell Lung Cancer. *PLoS Genet* 2016; 12(4): 654-62.
- Ladomery M. Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. *Int J Cell Biol* 2013; 2013: 463786.
- Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007; 8(4): 349-57.

- Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, et al. Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis* 2012; 17(7): 679-90.
- Prueksapanich P, Piyachaturawat P, Aumpansub P, Rittitid W, Chaiteerakij R, Rerknimitr R. Liver Fluke-Associated Biliary Tract Cancer. *Gut Liver* 2018; 12(3): 236-45.
- Shan T, Chen S, Chen XD, Kong D, Lin W, Li W, et al. Impact of AQP-5 on the growth of colorectal cancer cells and the underlying mechanism. *J Clin Exp Pathol* 2018; 11(1): 58-67
- Silva MR, Moreira GA, Silva RA, Barbosa É, Pais SR, Teixeira RR, et al. Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. *Biomed Res Int* 2015; 2015:150514.
- Wang Y, Liu J, Huang B, Xu YM, Li J, Huang LF, et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed Rep* 2015; 3(2): 152-58.
- Xiao D, Vogel V, Singh SV. Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(11): 2931-45.
- Yosudjai J, Wongkham S, Jirawatnotai S, Kaewkong W. Aberrant mRNA splicing generates oncogenic RNA isoforms and contributes to the development and progression of cholangiocarcinoma. *Biomed Rep* 2019; 10(3): 147-55.
- Zhou X, Li X, Yu L, Wang R, Hua D, Shi C, et al. The RNA-binding protein SRSF1 is a key cell cycle regulator via stabilizing NEAT1 in glioma. *Int J Biochem Cell Biol* 2019; 113: 75-86.