

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42149



CHARACTERIZATION OF CHOLANGIOCARCINOMA
ASSOCIATED PERIPHERAL BLOOD LUEKOCYTES
AND ITS APPLICATION

MISS CHUTIMA SUBIMERB

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY

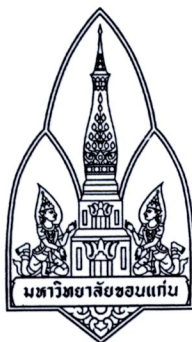
2009

600256334

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42149



**CHARACTERIZATION OF CHOLANGIOCARCINOMA
ASSOCIATED PERIPHERAL BLOOD LUEKOCYTES
AND ITS APPLICATION**



MISS CHUTIMA SUBIMERB

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

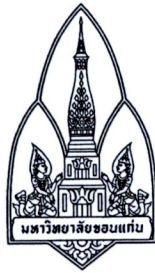
2009

**CHARACTERIZATION OF CHOLANGIOCARCINOMA
ASSOCIATED PERIPHERAL BLOOD LUEKOCYTES
AND ITS APPLICATION**

MISS CHUTIMA SUBIMERB

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MEDICAL BIOCHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2009



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MEDICAL BIOCHEMISTRY

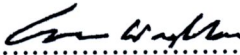
Thesis Title: Characterization of cholangiocarcinoma associated peripheral blood leukocytes and its application


Author: Miss Chutima Subimerb

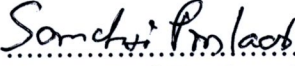
Thesis Examination Committee:


Assoc. Prof. Dr. Viraphong Lulitanond	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham	Member
Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat	Member
Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor	Member
Professor Dr. Seiji OKADA	Member

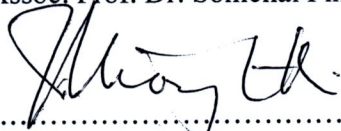
Thesis Advisors:


.....Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham)


.....Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat)


.....Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor)


.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School


.....
(Prof. Dr. Wiroon Laupattarakasem)
Dean, Faculty of Medicine

Copyright of Khon Kaen University

ชุดิมา ทรัพย์อิมเอบ. 2552. **คุณลักษณะของเม็ดเลือดขาวที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการ
ประยุกต์ใช้.** วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ, รศ.ดร.ชาญวิทย์ ติลาวัฒน์,
รศ.ดร.สมชาย ปิ่นละออ

บทคัดย่อ

E42149

เป็นที่ทราบกันดีว่าการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิด
ความผิดปกติของเซลล์ การอักเสบเรื้อรังร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของยีนภายในเซลล์ส่งเสริมให้เกิด
กระบวนการก่อมะเร็งได้ รายงานการศึกษาในมะเร็งหลายชนิดชี้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด
monocyte และ macrophage ส่งเสริมการก่อมะเร็งโดยการสร้างสารที่มีผลต่อการเจริญพัฒนาและ
การอยู่รอดของมะเร็ง โดยการสนับสนุนกระบวนการสร้างหลอดเลือดและการพัฒนาของเซลล์

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่สัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบเรื้อรัง การศึกษานี้ได้ทำการ
ศึกษาคุณลักษณะและบทบาทของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ macrophage ในการ
สนับสนุนการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าระดับของเซลล์ชนิด $CD14^+CD16^+$ monocyte ในเลือด
ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ $CD14^+CD16^+$ monocyte
ที่ตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและกลุ่มคนปกติ และระดับของ
 $CD14^+CD16^+$ monocyte ที่สูงในเลือดจะลดลงสู่ระดับปกติเมื่อผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดเอาเนื้อเยื่อ
มะเร็งออก การศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์กลุ่มดังกล่าวกับภาวะโรคพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับของ
 $CD14^+CD16^+$ monocyte ในเลือดต่ำสัมพันธ์กับมะเร็งที่เป็นลักษณะ papillary type CCA ซึ่งโดย
ปกติแล้วจะมีพยากรณ์ของโรคที่ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า monocyte ชนิดนี้มี
ลักษณะการแสดงออกที่คล้าย macrophage โดยมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของ adhesion
molecules ($CD11c$, $CD49d$ และ $CD54$) และ scavenger receptors ($CD163$) และพบว่า
 $CD14^+CD16^+$ monocyte ที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี สัมพันธ์กับปริมาณ
macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (Tumor associated macrophage; TAMs) ที่มี $MAC387 +ve$
ซึ่งชี้แนะว่า $CD14^+CD16^+$ monocyte ในเลือดอาจจะพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ของ TAMs ในเนื้อเยื่อ
มะเร็งท่อน้ำดี

เม็ดเลือดขาวในระบบไหลเวียนโลหิตเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการทำหน้าที่ตรวจตรา
สิ่งแปลกปลอมโดยกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากการติดเชื้อการอักเสบ รวมไปถึงภาวะมะเร็งปัจจุบัน
พบว่า การแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวในเลือดเปลี่ยนแปลงและสัมพันธ์กับภาวะโรคของ
ผู้ป่วย และสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ภาวะของโรคและกระบวนการเกิดโรคได้ การศึกษา

E42149

ครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับคนปกติมีความแตกต่างกัน และสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากคนปกติได้ โดยพบว่ายีนของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 177 ยีนมีการแสดงออกที่แตกต่างจากที่พบในคนปกติ โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 117 ยีนและมีการแสดงออกลดลง 60 ยีน คาดว่ากลุ่มยีนเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย การส่งเสริมการเจริญและการลุกลามของมะเร็ง โดยส่งเสริมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และการทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง ยีนที่พบว่ามีการแสดงออกเด่นชัดในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้แก่ growth factor และ angiogenic factor (EREG, TGF β 1, CXCL2, CXCL3, IL-8 และ VEGFA), และ protease enzyme (PLAU, MMP9, CTSL, และ SERPINB2) เป็นต้น นอกจากนี้ได้ทดสอบการใช้ระดับการแสดงออกของยีน PLAU, CTSL, และ SERPINB2 ในการคำนวณค่า risk score ซึ่งสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีค่า risk score สูงซึ่งมีพยากรณ์โรคไม่ดี และกลุ่มที่มีค่า risk score ต่ำซึ่งมีพยากรณ์โรคที่ดีกว่า นอกจากนี้ค่า risk score ยังเป็นตัวพยากรณ์โรคที่เป็นอิสระต่อปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบบแผนการแสดงออกของเม็ดเลือดขาวในเลือด สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนแบบแผนการแสดงออกของเนื้อเยื่อที่เกิดพยาธิสภาพได้ และใช้ในการทำนายหรือพยากรณ์ภาวะของโรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้

เพื่อศึกษาการส่งเสริมการพัฒนามะเร็งของเม็ดเลือดขาวในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ได้ทำการตรวจหา monocyte/macrophage ที่เพิ่งเคลื่อนย้ายจากเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อมะเร็งโดยใช้ MAC387 แอนติบอดี พบว่ามากกว่า 60% ของเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีปริมาณ TAMs ที่ย้อมติดด้วย MAC387 จำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างมะเร็งกับเนื้อเยื่อตับ และพบว่าปริมาณ TAMs จำนวนมากในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีแบบ non-papillary และ mass forming type CCA และการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่มี MAC387 มีการแสดงออกของ protease enzyme ได้แก่ PLAU และ MMP9 ด้วย แสดงให้เห็นว่า TAMs ในมะเร็งท่อน้ำดีมีบทบาทส่งเสริมการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยการผลิตและหลั่งสารดังกล่าวเพื่อทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง

จากข้อมูลทั้งหมดในการศึกษานี้ สรุปได้ว่า $CD14^+CD16^+$ monocyte ในเลือดสัมพันธ์กับ TAMs ในเนื้อเยื่อมะเร็งโดยมีบทบาทส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นการขัดขวางการสื่อสารระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณเนื้อเยื่อมะเร็ง อาจเป็นเป้าหมายและทางเลือกใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต นอกจากนี้ลักษณะการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาว สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สะท้อนพยาธิสภาพของมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้

Chutima Subimerb. 2009. **Characterization of Cholangiocarcinoma Associated Peripheral Blood Leukocytes and its Application.** Doctor of Philosophy Thesis in Medical Biochemistry, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham,
Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat,
Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor

ABSTRACT

E42149

It is well accepted that chronic inflammation which driven in part by inflammatory cells, may be one of the driving forces of transformation that together with other determinants, including the intrinsic properties of pre-malignant cells, support initiation of cancer. The pro-tumor actions of inflammatory cells especially monocyte/macrophages by releasing growth and survival factors, to promoting angiogenesis and cancer progression have been documented in many cancers.

The present study demonstrated the pro-tumor progression activity of monocyte/macrophages in cholangiocarcinoma (CCA), a known chronic inflammation related cancer. The expansion of minor monocyte subpopulation ($CD14^+CD16^+$) in peripheral blood and the relationship between these monocytes and tumor associated macrophages (TAMs) in CCA tissues of the patients were evaluated. The level of $CD14^+CD16^+$ monocytes of patients with CCA were significantly increased comparing to those of benign biliary diseases or healthy subjects and the elevated levels reduced to near normal baseline after tumor resection. Low level of $CD14^+CD16^+$ monocytes was significantly associated with papillary type CCA, a tumor type having good prognosis. Phenotype with a macrophage like cells was shown in these monocytes with high expression of adhesion molecules (CD11c, CD49d, and CD54) and scavenger receptor (CD163). In addition, elevated $CD14^+CD16^+$ monocyte was also associated with TAM density (MAC387 +ve cells) in CCA tissues. These evidences indicate the $CD14^+CD16^+$ monocytes in blood may be a subpopulation of TAMs in CCA tissues.

Circulating leukocytes serve as a vigilant and comprehensive surveillance system that patrols the body for signs of infection, inflammation, and other threats, including cancer. Recently, a disease-specific gene expression signature in peripheral blood cells could constitute potential disease markers as well as genes involved in pathogenesis of the disease. The current study showed for the first time that an informative gene expression profile of peripheral blood leukocytes (PBLs) could reliably distinguish CCA patients from healthy subjects. Of the 177 differentially expressed genes, 117 were up regulated and 60 were down regulated in the PBLs from CCA patients. The expression profile of CCA-PBLs was postulated to involve in the host immune response-cellular growth, angiogenesis, and proteolysis. Growth and angiogenic factors (*EREG*, *TGF β 1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *IL-8*, and *VEGFA*), and protease enzyme (*PLAU*, *MMP9*, *CTSL* and *SERPINB2*) were found prominent in CCA-PBLs. Three candidate genes (*PLAU*, *CTSL* and *SERPINB2*) computed as “risk score” was innovated to discriminate between good and poor prognosis patients and had power to be independent predictors of survival for CCA. Therefore, PBLs may serve as a clinically accessible surrogate tissue for identifying gene expression pattern which reflect the disease and could be used as predictor for eventual outcome of the patient with CCA.

To assess the pro-tumor activity of tissue macrophages in CCA, the recent infiltrating monocyte/macrophage was monitored using MAC387 as a marker. More than 60% of CCA tissues had high densities of MAC387 positive cells which were found mostly at the lead-edge tumor. High density of MAC387 positivity was significantly associated with poor prognosis parameters (non-papillary and mass forming type CCA) and the worse overall survival of patients. This association may in part due to the pro-tumor activity of these macrophages evidenced by the finding that MAC387 positive cells co-expressed *PLAU* and *MMP9*, the critical proteins for degrading extracellular matrix and facilitating tumor metastasis.

Gather all evidences obtained from the present study, the pivotal role in pro-malignancy function of the inflammatory cells - namely $CD14^+CD16^+$ monocytes in blood and MAC387 positive cells in tissue were implicated in CCA. Blocking tumor microenvironment interaction especially between tumor and inflammatory cells that boost CCA progression may serve as an alternative target for specific adjuvant

E42149

treatment of CCA in the future. Moreover, determination of blood transcriptome with a set of potential candidate genes can be used as surrogate tissue marker which reflects the condition of tumor in CCA patients.

**Goodness portion to the present dissertation is dedicated
to my parents and entire teaching staff**

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Sopit Wongkham, who were patient in instruction, guidance and strengthen me both knowledge and the management of my life as well as taking care me throughout my study. My deepest gratitude gives to her for providing me an RGJ-Ph.D. scholarship to study in Medical Biochemistry field and for providing me a chance to do research abroad and explore life. I wish to express my sincere gratitude to Associate Professor Dr. Chanvit leelayuwat, Associate Professor Somchai Pinlaor, Associate Professor Dr. Veelaphong Lulitranond who gave valuable suggestion and guidance in my thesis. I am very appreciate to Associate Prof. Chawalit Pairojkul and Assistant Prof. Narong Khuntikeo, and Associate Prof. Vatjarabhongs Bhudisawasdi who supported thr clinical information for my study.

My sincere thankfulness is expressed to Professor Michael S McGrath for precious advice, supervision, comments and financial support during my study at University of California, San Francisco (UCSF) and Pathologica LLC Company. The thankfulness is also extended to the laboratory members for their kindness and helpfulness my study at both places in USA. I also would like to express my sincere gratitude to Professor Seiji Okada who intended to instruct me for improving my specialty in flow cytometry analysis and provided financial support through Japan Student Services Organization (JASSO), as well as his care during my study at Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

I would like to express my gratitude to Thailand Research Fund for research grant and the RGJ-Ph.D. scholarship and to Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, for providing the specimens in this study. Grateful is expressed to all staffs of Department of Biochemistry and graduate students, especially members of Wongkham's laboratory, for their friendship and kindness throughout my study.

Finally, I wish to express my sincere gratitude to my family, who appreciate and understand my study career and their spiritual support with love throughout my life. Additionally, I also would like to express my gratitude to my dear brother who encouraged and powered me throughout my study.

Chutima Subimerb

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	vi
ACKNOWLEDGEMENTS	vii
TABLE OF CONTENTS	viii
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Background and rationale of the study	1
1.2 Research questions	3
1.3 Scope of the study	3
1.4 Conceptual framework	5
1.5 Objectives of the study	5
1.6 Location of research conducting	6
1.7 Anticipated outcomes	6
CHAPTER II EXPANSION AND CHARACTERIZATION OF CIRCULATING CD16 ⁺ MONOCYTES IN CHOLANGIOCARCINOMA PATIENTS	7
2.1 Introduction	7
2.2 Materials and Methods	10
2.2.1 Blood samples	10
2.2.2 Flow cytometry for monocyte subpopulations	11
2.2.3 Monocyte separation	12
2.2.4 Measurement of mRNA expression by real-time RT-PCR	13
2.2.5 Statistical analysis	14

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
2.3 Results	15
2.3.1 CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocytes in blood from CCA patients and clinical significance	15
2.3.2 Expression of surface antigens on monocyte subpopulations	19
2.3.3 Expression of growth factors and chemokines in monocytes from CCA patients	20
2.4 Discussion	22
CHAPTER III DIFFERENTIAL EXPRESSION PROFILES OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES ASSOCIATED TO CHOLANGIOCARCINOMA AND POSSIBILITY FOR USING AS PROGNOSTIC MARKER	26
3.1 Introduction	26
3.2 Materials and Methods	27
3.2.1 Subjects	27
3.2.2 RNA extraction	28
3.2.3 Affymetrix one cycle eukaryotic expression sample processing	29
3.2.4 Staining and Washing Affymetrix gene chip by Fluidic station	30
3.2.5 Microarray analysis	31
3.2.6 Real-time RT-PCR (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)	31
3.2.7 Isolation of neutrophils, lymphocytes and monocytes	32
3.2.8 Statistical analysis	34
3.3 Results	36
3.3.1 Identification of differentially expressed genes in peripheral leukocytes from CCA patients through cDNA microarray	36
3.3.2 Verification of candidate genes by RT-PCR	40

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3.3.3 Construction and validation of classification models for predicting the outcome of CCA patients	42
3.3.4 Comparison of differentially expressed genes in peripheral blood cells of CCA and BBD patients	45
3.4 Discussion	47
CHAPTER IV TISSUE INVASIVE MACROPHAGE DENSITY CORRELATES WITH PROGNOSIS IN CHOLANGIOCARCINOMA	51
4.1 Introduction	51
4.2 Materials and Methods	52
4.2.1 Subjects and Tissues	52
4.2.2 Immunohistochemistry studies	53
4.2.3 Double immunofluorescence-labeling method	55
4.2.4 Statistical analysis	55
4.3 Results	56
4.3.1 MAC387 positive cells in CCA tissues and clinical significance	56
4.3.2 uPA and MMP-9 expressing cells in CCA tissues	58
4.3.3 Co-expression of uPA and MMP-9 with MAC387 positive cells in CCA tissues	58
4.3.4 MAC387, uPA and MMP-9 expressing cells and correlation with overall survival of CCA patients	62
4.3.5 Univariate and Multivariate Cox proportional hazard analysis	64
4.4 Discussion	67
CHAPTER V CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS	71
REFERENCES	74

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
APPENDICES	88
APPENDICE A Reagents for laboratory experiments	89
APPENDICE B Supplementary Data	96
APPENDICE C Certificate of Poster Presentation Award	101
RESEARCH PUBLICATIONS AND PRESENTATIONS	103
CURRICULUM VITAE	106

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1	lists of monoclonal antibodies for studying flow cytometry 12
Table 2.2	The correlation of CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocyte levels and clinical parameters 18
Table 2.3	Phenotypes of monocyte subpopulations in CCA 19
Table 3.1	Characteristics of CCA, BBD and healthy subjects used in cDNA microarray analysis 28
Table 3.2	Oligonucleotide sequences used 35
Table 3.3	Lists of up-regulated genes in peripheral leukocytes of CCA patients 38
Table 3.4	Lists of down-regulated genes in peripheral leukocytes of CCA patients. 39
Table 3.5	Univariate and Multivariate analysis of factorss associated with survival 44
Table 4.1	Density of MAC387 positive cells in CCA tissues in relation to clinicopathological features of patients 57
Table 4.2	Density of uPA positive cells in CCA tissues in relation to clinicopathological features of patients 59
Table 4.3	Density of MMP9 positive cells in CCA tissues in relation to clinicopathological features of patients 60
Table 4.4	Factors influencing overall survival of CCA patients 65
Table 4.5	Multivariate analysis by a Cox proportional hazard regression mode in CCA patient 66
Table B1	Characteristics of the CCA and BBD patients 98
Table B2	Unique set of differentially expressed genes in CCA patients. 100

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Two-color flow-cytometric analysis of monocyte subpopulation in whole blood	15
Figure 2.2 Expansions of CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocytes in peripheral blood of CCA patients, BBD and healthy subjects	16
Figure 2.3 Expansions of CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocytes in peripheral blood of CCA patients between pre and post operations	16
Figure 2.4 Receiver operating characteristic analysis	17
Figure 2.5 Expressions of CD11a, CD11c, CD18, CD29, CD49d, CD54, CD163 and CD204 on monocyte subpopulations	20
Figure 2.6 Expressions of <i>EREG</i> , <i>VEGFA</i> , <i>CXCL3</i> and <i>CXCL10</i> on monocyte populations from CCA patients and healthy subjects	21
Figure 3.1 Immunofluorescent staining and Wright-Giemsa staining in fractions of polymorphonuclear cells, monocytes and lymphocytes	33
Figure 3.2 Principle component analysis for expression trend between CCA patients and healthy subjects	36
Figure 3.3 Hierarchical clustering analysis of up or down regulated genes in expression profiles of CCA peripheral blood leukocytes	37
Figure 3.4 Comparison of the expression levels of 9 up - and 2 down - regulated genes in PBLs from CCA patients obtained from cDNA array chip and real time RT-PCR	40
Figure 3.5 Representative expressions of the 9 candidate genes (PLAU, CTSL, PTGES, MMP9, SERPINB2, CXCL3, EREG, VEGFA, and IL8) in fractions of monocytes, leukocytes, and neutrophils from CCA patients	41

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 3.6 Kaplan-Meier survival curves of CCA patients with high or low Risk score	43
Figure 3.7 Principle component analysis for expression trend within between CCA, BBD patients and healthy subjects	45
Figure 3.8 Venn diagram analysis for identifying the common and unique set of differentially expressed genes in between CCA and BBD patients	46
Figure 4.1 Examples of MAC387 positive cells at leading edge of invasive CCA tumor tissues, representing the different grades of macrophage infiltration	54
Figure 4.2 Distribution and density of tissue MAC387 positive cells	56
Figure 4.3 Immunofluorescent staining of co-expression of MAC387 positive cells with uPA and MMP-9 in CCA tissues	61
Figure 4.4 Immunostaining of MAC387, MMP-9, and uPA positive cells in the serial sections of CCA tissues	61
Figure 4.5 Survival curves using Kaplan-Meier analysis for CCA patients with low vs high densities of cells with positive immunoreactivity of MAC387 or uPA or MMP-9 and different combinations of MAC387, uPA and MMP-9 positive cells	63
Figure 5 Overall role and interaction of monocyte/macrophage in CCA	73
Figure B1 Kaplan-Meier survival curves of CCA patients with high or low level of CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocytes	97
Figure B2 Gene Ontology of differentially expressed genes in CCA peripheral blood leukocytes	99

LIST OF ABBREVIATIONS

%	Percent
°C	Degree Celsius
BBD	Benign Billiary tract disease
CBC	complete blood count
CCA	Cholangiocarcinoma
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
C _T	Cycle threshold
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
e.g.	exempli gratia (Latin), for example
<i>et al.</i>	et alii/alia (Latin), and other people or things
etc.	et cetera (Latin), and the rest
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gram
hr	Hour(s)
ICC	Intrahepatic cholangiocarcinoma
IPA	Ingenuity pathway analysis
kg	Kilogram
LFT	Liver Function Test
M	Molar
MFI	Mean fluorecent intensity
mg	Milligram
min	Minute(s)
ml	Microliter

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

mM	Micromolar
mRNA	Messenger ribonucleotic acid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OV	<i>Opisthorchis viverrini</i>
PB	Pacific Blue
PBL	Peripheral blood leukocytes
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Principal component analysis
RBC	Red blood cells
R-PE	R-Phycoerythrin
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
SAPE	Streptavidin Phycoerythrin
WBC	White blood cells
β	beta