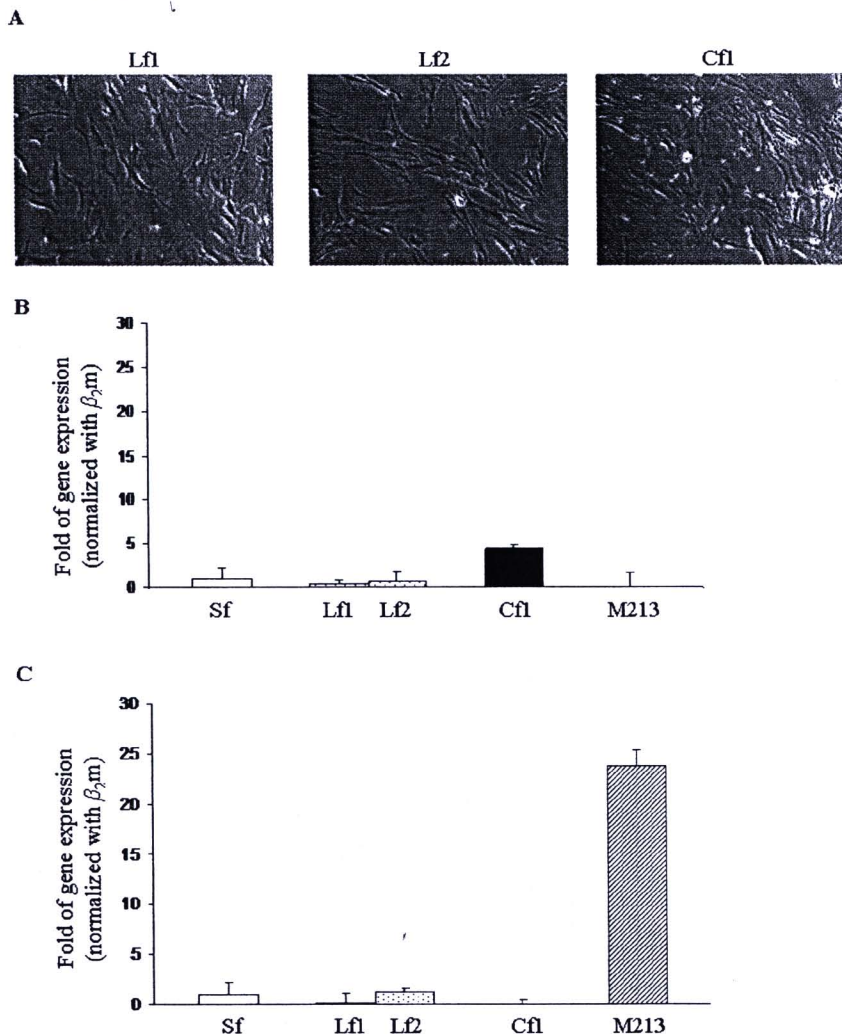


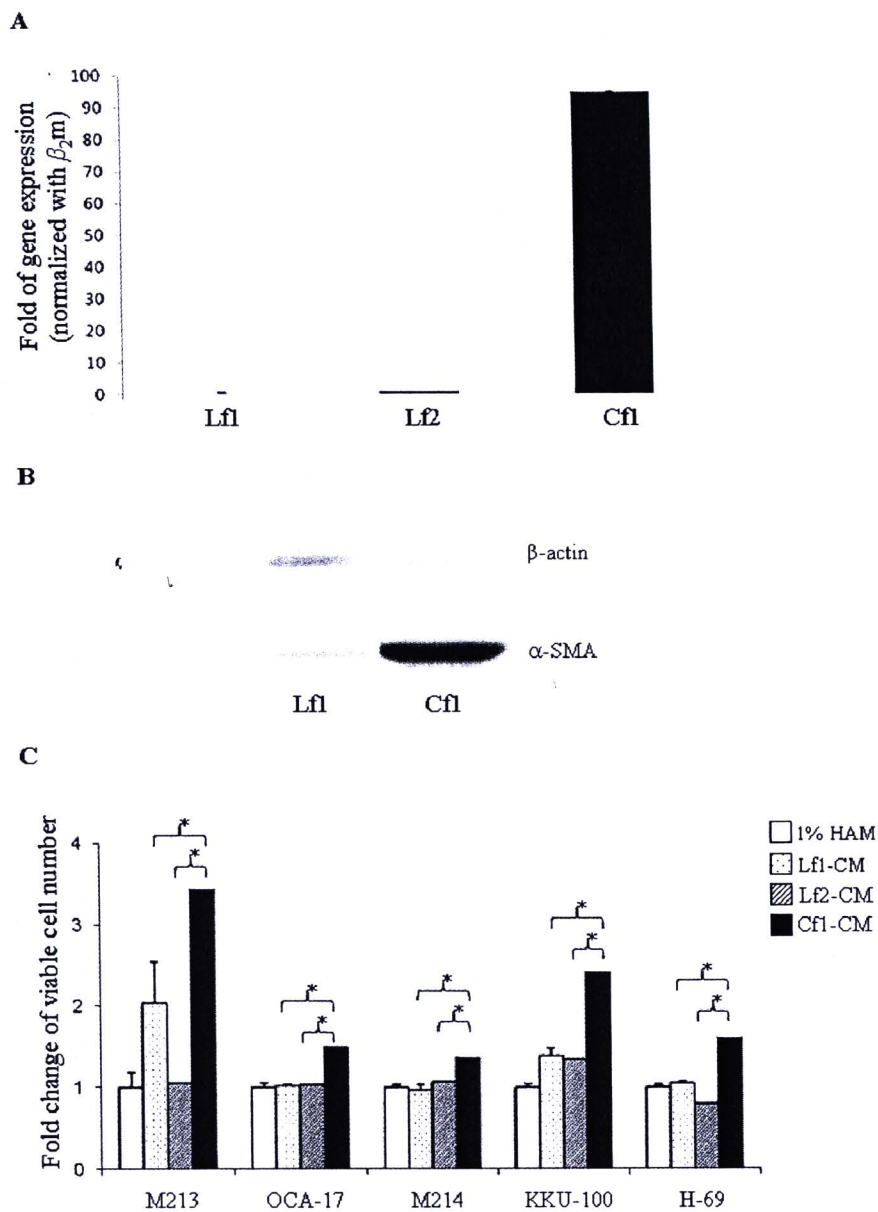
4. ผลการทดลอง (RESULTS)

4.1 ผลการคัดแยกและวิเคราะห์คุณสมบัติของ *primary culture* Cf และ Lf

เซลล์ Cf จำนวน 1 ราย (Cf1) และเซลล์ Lf จำนวน 2 ราย (Lf1 และ Lf2) ได้ถูกคัดแยกจากเนื้อเยื่อผู้ป่วย และเพาะเลี้ยงแบบ *primary culture* โดย Cf1 และ Lf1 คัดแยกจากผู้ป่วยรายเดียวกัน ในขณะที่ Lf2 คัดแยกจากผู้ป่วยอีกรายหนึ่ง ผู้ป่วยทั้ง 2 รายได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ชนิด *papillary adenocarcinoma* เซลล์ Cf1, Lf1 และ Lf2 ได้ถูกนำมาทดสอบความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองพบว่าเซลล์ทั้ง 3 ชนิด เป็นเซลล์ *fibroblast* โดยดูจากรูปร่างที่เป็น *spindle shape* (รูปที่ 1A) และการแสดงออกของ *fibroblast marker* ได้แก่ *vimentin* (รูปที่ 1B) และไม่มีการปนเปื้อนของเซลล์เยื่อบุจากการไม่พบการแสดงออกของ *cytokeratin 7* ในเซลล์เพาะเลี้ยง (รูปที่ 1C) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ Cf1 มีการแสดงออกของ α -SMA สูงกว่าเซลล์ Lf1 ทั้งในระดับของ mRNA (รูปที่ 2A) และโปรตีน (รูปที่ 2B) ซึ่งคุณสมบัตินี้บ่งชี้ความเป็น *activated fibroblast* นอกจากนี้พบว่า CM ของเซลล์ Cf1 มีคุณสมบัติเหนียวทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2C)



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ Cf1, Lf1 และ Lf2; รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope (A); ระดับการแสดงออกของยีน *vimentin* (B); ระดับการแสดงออกของยีน *cytokeratin 7* (C) กำหนดให้ระดับการการแสดงออกของยีนในเซลล์ Sf เท่ากับ 1

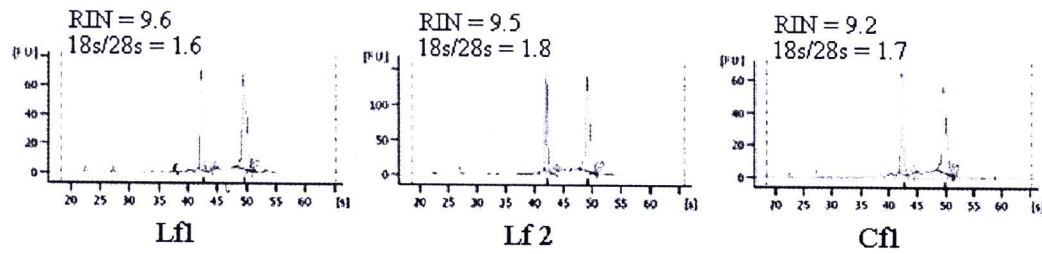


รูปที่ 2 คุณสมบัติการเป็น activated fibroblast และผลของ Cf-CM ต่อเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีชนิดต่างๆ: ระดับการแสดงออกของ α -SMA ศึกษาโดยเทคนิค real time RT-PCR (A); ระดับการแสดงออกของ α -SMA ศึกษาโดยเทคนิค western blot analysis (B); ผลของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิดต่างๆ ต่อการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีชนิดต่างๆ (C) * $P \leq 0.05$

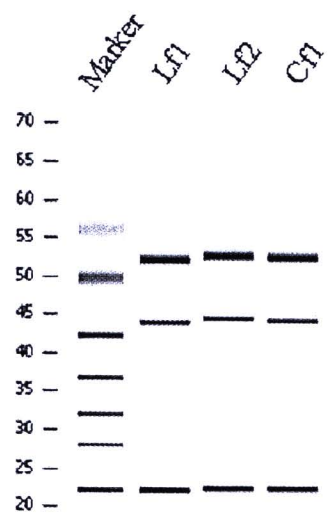
4.2 ผลการสกัด total RNA จากเซลล์ Cf และ Lfs และทดสอบคุณภาพของ RNA เพื่อทำ microarray

นำ total RNA ที่สกัดจาก เซลล์ Cf และ Lfs โดย RNeasy Micro Kit มาทดสอบคุณภาพโดย Agilent RNA 6000 Nano Kit ผลการวิเคราะห์คุณภาพพบว่า RNA ของทั้ง 3 ตัวอย่างมีคุณภาพเหมาะสมในการทำ microarray โดยดูจากค่า RNA integrity number (RIN) ของทั้ง 3 ตัวอย่างมีค่าใกล้เคียง 10 ส่วนค่า Ratio 18S/28S มากกว่า 1.8 (รูปที่ 3A) และ RNA มีแถบของ RNA ชนิด 28S และ 18S สมบูรณ์ แสดงว่าไม่มีการแตกหักของสาย RNA (รูปที่ 3B)

A



B



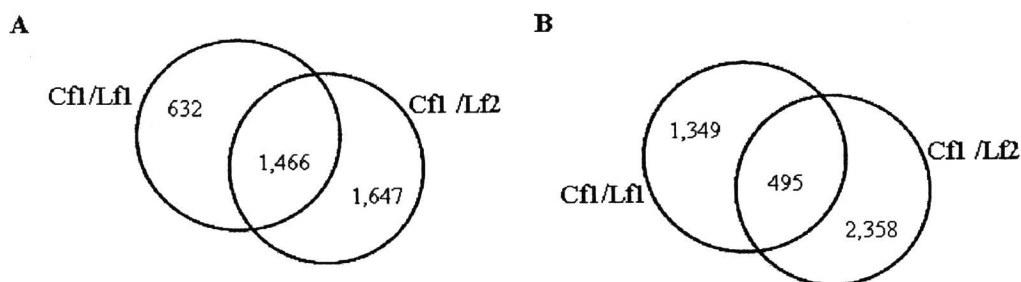
รูปที่ 3 การวิเคราะห์คุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากเซลล์ primary culture fibroblasts ชนิดต่าง ๆ: ค่า RIN และ 18S:28S (A); แถบ RNA ชนิด 18S และ 28S (B)



4.3 ผลศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์ Cf ด้วยเทคนิค microarray

การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์ Cf1 และ Lf1 ซึ่งคัดแยกจากผู้ป่วยรายเดียวกัน และ Lf จากผู้ป่วยอีก 1 ราย กำหนดให้ยีนใน Cf ที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างจากเซลล์ Lf ทั้ง 2 ตัวอย่าง เป็นยีนที่น่าจะมีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ fibroblast ของมะเร็งท่อน้ำดีต่างจากเซลล์ fibroblast ปกติ เรียกยีนที่มีลักษณะดังกล่าวว่า common gene ผลการจัดแบ่งกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในเซลล์ Cf ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ common up-regulated gene หมายถึงยีนที่มีการแสดงออกในเซลล์ Cf มากกว่าเซลล์ Lfs ตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป และ common down-regulated gene หมายถึงยีนที่มีการแสดงออกในเซลล์ Cf น้อยกว่าเซลล์ Lfs ตั้งแต่ 0.5 เท่า เป็นต้นไป พบว่ายีนในทั้งสองกลุ่มนี้มีจำนวน 1,466 และ 495 ตามลำดับ (รูปที่ 4) และเมื่อนำยีนไปวิเคราะห์แบ่งกลุ่มตาม biological function โดยเฉพาะหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็ง ในกลุ่ม common up-regulated gene ได้แก่ Cellular metabolism, Protein binding, Extracellular region, Signal transduction, Transcription factor, Protein modification, Receptor proteins, Cell differentiation, Cell adhesion, Cell cycle, Cell motility, Proteolysis, Cell proliferation, Apoptosis และ Extracellular matrix organization and biosynthesis (ตารางที่ 3) ส่วน common down-regulated gene แบ่งออกได้เป็นกลุ่ม ได้แก่ Cell metabolism, Signal transduction, Transcription factor, Protein modification, Cell differentiation, Cell adhesion, Cell cycle, Cell motility, Cell proliferation และ Apoptosis (ตารางที่ 4)

จากรายงานที่มีในปัจจุบันพบว่าเซลล์ fibroblast สามารถเหนี่ยวนำกระบวนการเกิดและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้โดยการสร้างสารกลุ่มที่ทำงานแบบ paracrine fashion ครอบคลุมกลุ่มของ growth factor กลุ่ม protease หรือ ECM proteins ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ การลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นยีนที่กำหนดโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวจึงจะได้รับการพิจารณาเป็นลำดับแรก ในการศึกษากระบวนการแสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และบทบาทของโปรตีนผลิตภัณฑ์ของยีนดังกล่าวในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 4 จำนวน common up-regulated (A) และ down-regulated (B) genes ในเซลล์ Cf

หมายเหตุ Cf/Lf หมายถึงระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf

ตารางที่ 3 ตัวอย่าง common up-regulated genes แบ่งตาม biological function

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
1	Cellular metabolism	23.7	- neuropeptide Y receptor Y1 - double cortin-like kinase 1 - S100 calcium binding protein A4 - early B-cell factor 1 - ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 - flavin containing monooxygenase 3 - sine oculis homeobox homolog 2 (Drosophila) - CD36 molecule (thrombospondin receptor) - parathyroid hormone-like hormone
2	Protein binding	20.8	- neuropeptide Y receptor Y1 - collagen, type XIV, alpha 1 (undulin) - growth associated protein 43 - collagen, type IV, alpha 6 - cadherin 10, type 2 (T2-cadherin) - interleukin 18 receptor 1 - cyclin A1 - actin-binding Rho activating protein
3	Signal transduction	10.9	- neuropeptide Y receptor Y1 - integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) - neuropeptide Y receptor Y1 - growth associated protein 43 - integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) - parathyroid hormone-like hormone - angiopoietin 2 - jagged 1 (Alagille syndrome)
4	Extracellular region	7.8	- collagen, type XIV, alpha 1 (undulin) - collagen, type IV, alpha 6 - interleukin 18 receptor 1 - angiopoietin 2 - jagged 1 (Alagille syndrome) - neuropilin 2 - reelin - integrin, alpha 7 - CCN3/NOV - tenascin XB - epiregulin - platelet-derived growth factor

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
5	Transcription factor	7.5	- receptor-interacting serine-threonine kinase 4 - paternally expressed 3 - mesenchyme homeobox 2 - fatty acid binding protein 4, adipocyte - actin-binding Rho activating protein - growth differentiation factor 8 - ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) - Kruppel-like factor 4 (gut) - stonin 1
6	Protein modification	5.5	- ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 - titin - receptor-interacting serine-threonine kinase 4 - hemicentin 1 - protein tyrosine phosphatase, receptor type, O - ring finger protein 128 - tousled-like kinase 2 - carboxypeptidase E
7	Receptor	7.8	- neuropeptide Y receptor Y1 - growth associated protein 43 - integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) - integrin, alpha 7 - G protein-coupled receptor 116 - ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 - parathyroid hormone-like hormone - angiopoietin 2 - regulator of G-protein signalling 5
8	Cell differentiation	4.3	- growth associated protein 43 - regulator of G-protein signalling 5 - angiopoietin 2 - jagged 1 (Alagille syndrome) - neuropilin 2 - nerve growth factor, beta polypeptide
9	Cell adhesion	3.5	- cadherin 10, type 2 (T2-cadherin) - CD36 molecule (thrombospondin receptor) - endothelial cell adhesion molecule - protocadherin 17 - protocadherin beta 13 - neuropilin 2

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
10	Cell cycle	2.4	- regulator of G-protein signalling 5 - G0/G1switch 2 - cyclin D2 - coagulation factor II (thrombin) receptor - tousled-like kinase 2 - cell growth regulator with EF-hand domain 1 - mitogen-activated protein kinase 13
11	Cell motility	2.2	- formyl peptide receptor-like 2 - ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 - jagged 1 (Alagille syndrome) - neuropilin 2 - coagulation factor II (thrombin) receptor - secretogranin II (chromogranin C) - protein kinase, cGMP-dependent, type I - transforming growth factor, beta receptor I (activin A)
12	Proteolysis	2.0	- protease, serine, 35 - carboxypeptidase E - ADAM metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha) - matrix metallopeptidase 28 - ADAM metallopeptidase domain 23 - ADAM metallopeptidase domain 32 - carboxypeptidase A4 - angiotensin I converting enzyme - transmembrane protease, serine 11B
13	Cell proliferation	2.0	- jagged 1 (Alagille syndrome) - laminin, alpha 5 - cell growth regulator with EF-hand domain 1 - amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) - secretogranin II (chromogranin C) - phosphatidic acid phosphatase type 2A
14	Apoptosis	1.6	- serpin peptidase inhibitor - Kruppel-type zinc finger protein - growth differentiation factor 5 - tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 - interferon, alpha-inducible protein 6 isoform c - sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 - Fas (TNF receptor superfamily, member 6) - DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
15	ECM organization and biosynthesis	0.9	- collagen, type XIV, alpha 1 (undulin) - protocadherin beta 13 - protocadherin beta 5 - collagen, type IV, alpha 6 - matrilin 2 - periostin, osteoblast specific factor - transforming growth factor, beta receptor I - myosin, heavy chain 11, smooth muscle - protocadherin beta 14 - tenascin XB

ตารางที่ 4 ตัวอย่าง common down-regulated genes แบ่งตาม biological function (10 ลำดับแรก ตาม fold change ที่ลดลงของระดับการแสดงออกของจีนในเซลล์ Cf เทียบกับเซลล์ Lf และเป็นจีนที่มี known function)

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
1	Cellular metabolism	31.6	- fibroblast growth factor receptor 2 - ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5 - plasminogen activator, urokinase - bone morphogenetic protein 2 - matrix-remodelling associated 5 - membrane metallo-endopeptidase - Meis homeobox 1 - cathepsin K - small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1 - <i>H. sapiens</i> mRNA for EHK-1 receptor tyrosine kinase
2	Signal transduction	17.8	- bone morphogenetic protein 2 - bradykinin receptor B1 - <i>H. sapiens</i> mRNA for EHK-1 receptor tyrosine kinase - fibroblast growth factor 13 - bradykinin receptor B2 - v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) - endothelin receptor type B - interleukin 7 receptor - proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 - activin A receptor, type IB
3	Transcription factor	11.5	- bone morphogenetic protein 2 - forkhead box F2 - activin A receptor, type IB - nuclear receptor subfamily 4 - twist homolog 1 - similar to doublesex and mab-3 related transcription factor 8.1 isoform a - retinoblastoma 1 (including osteosarcoma) - aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 - spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 - Meis homeobox 1

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
4	Protein modification	7.9	- ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5 - fibroblast growth factor receptor 2 - matrix-remodelling associated 5 - <i>H. sapiens</i> mRNA for EHK-1 receptor tyrosine kinase - v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) - proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 - activin A receptor, type IB - OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1 - low density lipoprotein-related protein 2 - epidermal growth factor (beta-urogastrone)
5	Cell differentiation	6.2	- bone morphogenetic protein 2 - interleukin 11 - growth arrest-specific 7 - midkine (neurite growth-promoting factor 2) - endothelin receptor type B - activin A receptor, type IB - growth arrest-specific 7 - twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (<i>Drosophila</i>) - retinoblastoma 1 (including osteosarcoma) - Homo sapiens EWS protein/E1A enhancer binding protein chimera mRNA
6	Cell adhesion	5.9	- fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly) - neuroligin 4, Y-linked - embryonal Fyn-associated substrate - collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive) - trophinin - chemokine (C-C motif) ligand 11 - ninjurin 1 - TYRO3 protein tyrosine kinase - solute carrier family 26, member 6 - neuropilin 2

No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
7	Cell cycle	5.9	- bone morphogenetic protein 2 - chromosome 13 open reading frame 15 - growth arrest-specific 7 - midkine (neurite growth-promoting factor 2) - activin A receptor, type IB - growth arrest-specific 7 - retinoblastoma 1 (including osteosarcoma) - fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor) - Vpr (HIV-1) binding protein - DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>)
8	Cell motility	4.7	- pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9 - endothelin receptor type B - twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (<i>Drosophila</i>) - Homo sapiens EWS protein/E1A enhancer binding protein chimera mRNA - spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 - laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy) - neuregulin 1 - neuropilin 2 - spermatid perinuclear RNA binding protein
9	Cell proliferation	4.5	- bone morphogenetic protein 2 - interleukin 11 - midkine (neurite growth-promoting factor 2) - NADPH oxidase 4 - retinoblastoma 1 (including osteosarcoma) - fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor) - glypican 4 - DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>) - low density lipoprotein-related protein 2 - epidermal growth factor (beta-urogastrone)

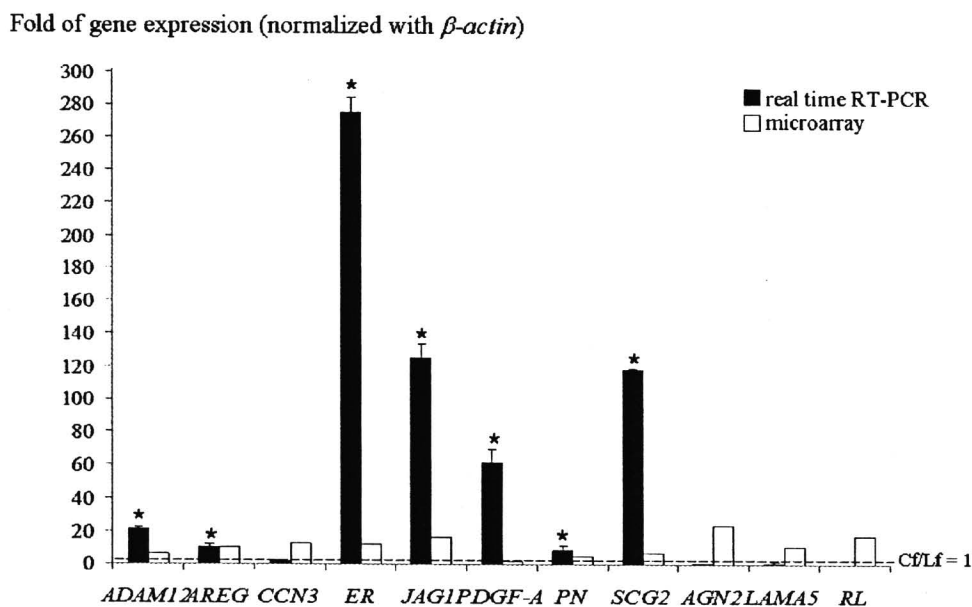
No	Biological function	No. of genes (%)	List of genes
10	Apoptosis	4.0	- interleukin 24 - activin A receptor, type IB - nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 - tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy - glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 - peroxiredoxin 2 - BCL2 binding component 3 - NUAK family, SNF1-like kinase, 2 - Homo sapiens p58/GTA protein kinase mRNA - dynamin 2



ในกลุ่ม common up-regulated gene พบว่าจีนที่มีผลิตผลเป็น secreted protein หมายถึงสามารถสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ fibroblasts เพื่อไปออกฤทธิ์ที่เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีปกติหรือที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี และมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของจีนนั้นในการเหนี่ยวนำคุณสมบัติของมะเร็ง (tumorigenic function) ที่สำคัญมีจำนวน 11 จีน ได้แก่ epiregulin (ER), amphiregulin (AREG), platelet-derived growth factor-alpha (PDGF-A), jagged 1 (JAG1), laminin alpha 5 (LAMA5), periostin (PN), ADAM metalloproteinase domain 12 (ADAM12), nephroblastoma overexpressed gene (CCN3/NOV), secretogranin (SCG2), angiopoietin 2 (ANG2), reelin (RL)

4.4 ผลการยืนยันการแสดงออกของจีนระดับ mRNA ในเซลล์ Cf ด้วยเทคนิค real time RT- PCR

ผลการยืนยันการแสดงออกของจีนในเซลล์ Cf ทั้ง 11 ชนิด พบว่ามีจำนวน 7 จีนที่ให้ผลยืนยันการเพิ่มระดับของ mRNA ในเซลล์ Cf อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเซลล์ Lf ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยเทคนิค microarray จีนดังกล่าวได้แก่ ADAM12, AREG, ER, JAG1, PDGF-A, PN และ SCG2 ส่วนจีน CCN3 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหากไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่จีน AGN2, LAMA5 และ RL มีระดับการแสดงออกที่ลดลง (รูปที่ 5) และพิจารณาเกี่ยวกับ tumorigenic function ของจีนทั้ง 7 นี้ (ตารางที่ 5) พบว่า periostin (PN) เป็นจีนที่กำหนดเป็น extracellular matrix protein ที่มี tumoigenic function ได้หลายแบบในมะเร็งหลายชนิด



รูปที่ 5 ผลการยืนยันการแสดงออกของจีนต่างๆ ในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf (* P value ≤ 0.05) ด้วยเทคนิค real time RT- PCR และ microarray ในที่นี้ใช้ β -actin เป็น internal control, เส้นประ หมายถึงระดับที่การแสดงออกของจีนในเซลล์ Cf เท่ากับ Lf (Cf/Lf =1)

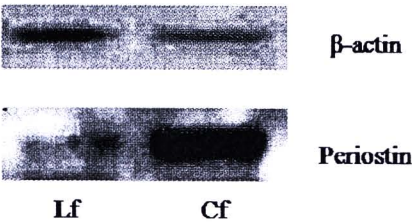
ตารางที่ 5 แสดง tumorigenic function ของจีน 7 ชนิด ที่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในเซลล์ Cf

Gene	Biological function			
	Proliferation	Metastasis	Invasion	Angiogenesis
ADAM12	✓	-	✓	-
amphiregulin (AREG)	✓	-	-	-
angiopoietin (AGN2)	-	-	-	✓
epiregulin (ER)	✓	-	-	-
JAG1	✓	-	-	-
PDGF-A	✓	-	-	✓
periostin (PN)	✓	✓	✓	✓

- ✓ มีรายงานบทบาทในมะเร็ง
- ยังไม่มีรายงานการศึกษา

4.5 ผลการยืนยันการแสดงออกโปรตีน PN ในเซลล์ Cf ด้วยเทคนิค western blot analysis

ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PN ในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf ด้วยเทคนิค western blot analysis ผลการศึกษาพบว่า โปรตีน PN ในเซลล์ Cf มีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ Lf (รูปที่ 6) สอดคล้องกับการศึกษาที่ระดับ mRNA (รูปที่ 5)

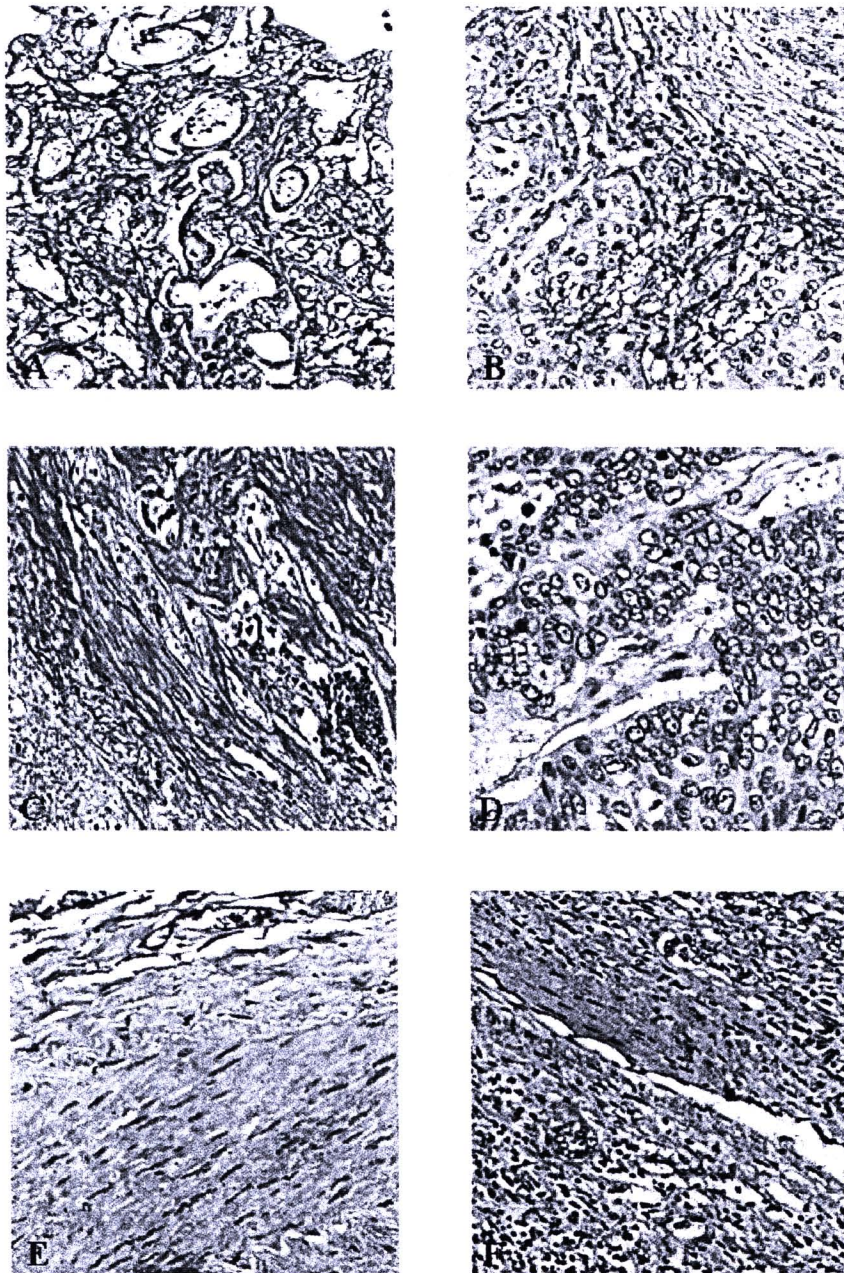


รูปที่ 6 ผลการวัดระดับโปรตีน periostin ในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf ด้วยเทคนิค western blot

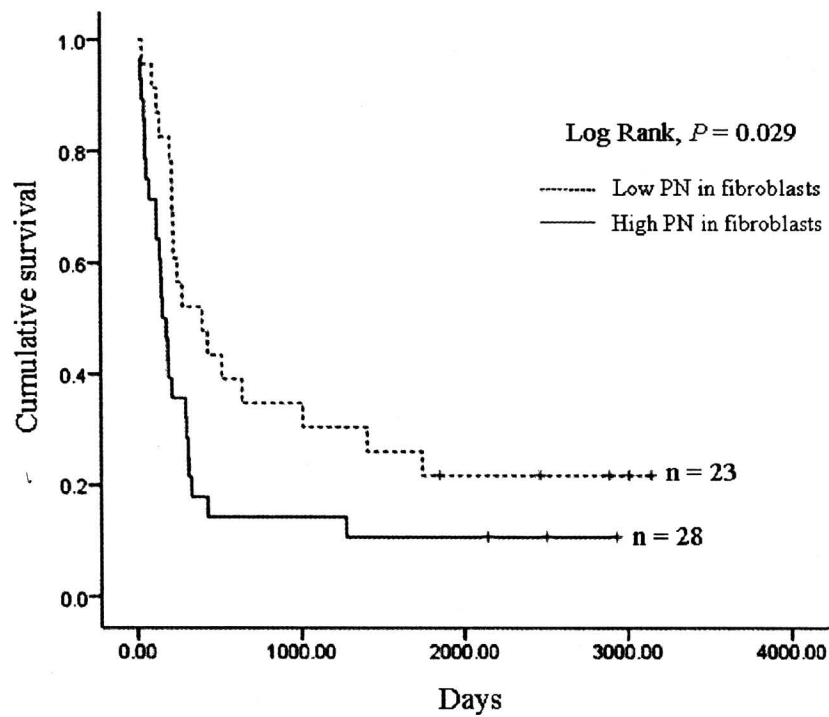
4.6 ผลการศึกษายืนยันระดับการแสดงออกของโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาในระดับโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 54 ราย ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry ด้วย rabbit anti-human PN antibody (Biovendor) ที่ความเข้มข้น 1:10,000 และตรวจติดตามการตรวจพบโปรตีน PN โดย Envision HRP-Rabbit (Envision) ในการอ่านผลการย้อมติดสี คิดความเข้มของการย้อมติด PN (intensity) เป็นเกรด 0, 1, 2 และ 3 ซึ่งหมายถึงไม่มีการติดสี, ติดสีเข้มเล็กน้อย, ติดสีเข้มปานกลาง, และติดสีเข้มมาก ตามลำดับ และนับปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่ติดสี (PN-positive cells) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยแบ่งเป็นเกรด 0, 1, 2 และ 3 ซึ่งหมายถึง จำนวนเซลล์ที่ติดสีน้อยกว่า 10% ของเซลล์ fibroblast ทั้งหมด, จำนวนเซลล์ที่ติดสีคิดเป็น 10-25%, 26-50% และ มากกว่า 50% (รูปที่ 3) ตามลำดับ จากนั้นคิดค่าการติดสีรวม (total score) โดยนำค่าเกรดของ intensity มาคูณด้วยค่าเกรดของ positive cells ซึ่งจะได้ค่า total score น้อยสุดคือ 0 และมากที่สุดคือ 9 ในที่นี้ให้ total score 0-4 เป็น low expression ในขณะที่ total score 5-9 เป็น high expression ผลการศึกษาพบการแสดงออกของโปรตีน PN ในเซลล์ fibroblast ในเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นมะเร็ง (intratumoral fibroblasts) ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในเซลล์มะเร็ง และในเซลล์ fibroblast ที่อยู่ในส่วนเนื้อเยื่อปกติ ทั้งนี้ตรวจพบโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีคิดเป็น 83% (45/54) โดยจัดอยู่ในกลุ่ม high expression จำนวน 25 ราย คิดเป็น 46% และกลุ่ม low expression จำนวน 29 ราย คิดเป็น 54%

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ PN กับระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ (survival time) โดย Kaplan-Meier Log Rank test พบว่าผู้ป่วยที่มีระดับโปรตีน PN สูงจะมีระยะเวลาการมีชีวิตสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีระดับโปรตีน PN ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8) และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ PN ในมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma และ benign liver tissues พบว่า PN มีระดับที่สูงกว่าใน CCA tissues (ตารางที่ 6) ระดับของ PN ที่สูงเป็น risk factor ของโรคที่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับ tumor staging (ตารางที่ 7) ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการใช้ระดับการแสดงออกของ PN เป็นตัวพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognostic marker) ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ยังบ่งชี้ว่าโปรตีน PN ที่สร้างจากเซลล์ fibroblast ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีน่าจะมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายได้มากขึ้น ซึ่ง การแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งนั้นเกิดได้จากการกระตุ้น tumorigenesis properties หลายอย่างรวมกัน ที่สำคัญได้แก่กระบวนการ cell proliferation, cell invasion, และ angiogenesis ซึ่งจะได้ศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับบทบาทของโปรตีน PN ต่อกระบวนการดังกล่าวต่อไป



รูปที่ 7 การย้อมติดโปรตีน p53 โดยเทคนิค immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มี histopathology ต่างๆ (A: well-differentiated; B: moderately-differentiated; C: poorly-differentiated) เทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน p53 (D) เนื้อเยื่อ benign liver (E) และมะเร็งตับ (F) (Original magnification 100X)



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ทางสถิติของระดับโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และระยะเวลาการมีชีวิตรอดอยู่ (survival time) ของผู้ป่วย โดย Kaplan-Meier Log Rank test

ตารางที่ 6 การแสดงออกของ PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็งและมะเร็งตับ

Tissue	Total cases (n)	PN expression in fibroblasts		
		Negative	Positive	
			Low	High
CCA	52	9 (17%)	13 (25%)	30 (58%)
Benign liver	8	2 (25%)	6 (75%)	0 (0%)
Hepatocellular carcinoma	4	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)

ตารางที่ 7 แสดงปัจจัยพยากรณ์โรค (prognostic factor) ร่วมกับระดับของ PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ด้วย Multivariate analysis โดย Cox proportional hazard

Variable	HR	95% confidence interval	P
	(hazard ratio)	(CI)	
Age			
≤57	1		
>57	2.60	1.07-6.34	0.198
PN expression			
Low	1		
High	1.93	1.03-3.61	0.039
Staging			
I-III	1		
IV	2.60	1.07-6.34	0.036
Histological grading			
Non-papillary	1		
Papillary	0.52	0.25-1.09	0.082
Tumor size (cm)			
≤5	1		
>5	1.28	0.65-2.48	0.475



ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและข้อมูลทางคลินิก

Variable	n	PN expression (%)		Univariate analysis	Multivariate analysis	
		Low	High	P	HR	P
Age in years				0.575		
≤57	26	10 (38.5)	16 (61.5)		1	
>57	26	12 (46.2)	14 (53.8)		0.899	0.870
Sex				0.375		
Female	20	10 (50.0)	10 (50.0)		1	
Male	32	12 (37.5)	20 (62.5)		1.638	0.452
Histological type				0.083		
Well-differentiated	21	8 (38.1)	13 (61.9)		1	
Moderately-differentiated	8	1 (12.5)	7 (87.5)		3.720	0.271
Poorly-differentiated	8	6 (75.0)	2 (25.0)		0.184	0.86
Papillary	15	7 (46.7)	8 (53.3)		0.611	0.505
Tumor size (cm)				0.123		
≤5	29	15 (51.7)	14 (48.3)		1	
>5	23	7 (30.4)	16 (69.6)		2.493	0.161
Lymph node metastasis				0.830		
Absence	37	16 (43.2)	21 (56.8)		1	
Presence	15	6 (40.0)	9 (60.0)		1.459	0.590

4.7 ผลการศึกษาการแสดงออกของจีน *pn* ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ยืนยันว่าเซลล์ fibroblast เท่านั้นที่สร้างโปรตีนชนิดนี้ ในขณะที่เซลล์มะเร็งยังไม่ติดโปรตีน PN ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาดังกล่าว ผู้วิจัยได้นำเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-055, KKU-OCA17, KKU-M213, KKO-M139, และ KKU-M156 มาศึกษาระดับการแสดงออกของจีน *PN* โดยเทคนิค real time RT-PCR ค่า *Cp* ที่ได้ของแต่ละเซลล์ถูกนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับค่า *Cp* ของจีน *β-actin* เพื่อคำนวณค่า relative expression ของจีน *PN* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยสูตร $2^{-\Delta\Delta C_p}$ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบให้ระดับการแสดงออกในเซลล์ Lf เท่ากับ 1 ระดับการแสดงออกของจีน *PN* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมดมีปริมาณน้อยมาก ในขณะที่เซลล์ Cf มีปริมาณ *PN* สูงกว่า ประมาณ 2.5 เท่า (รูปที่ 9)

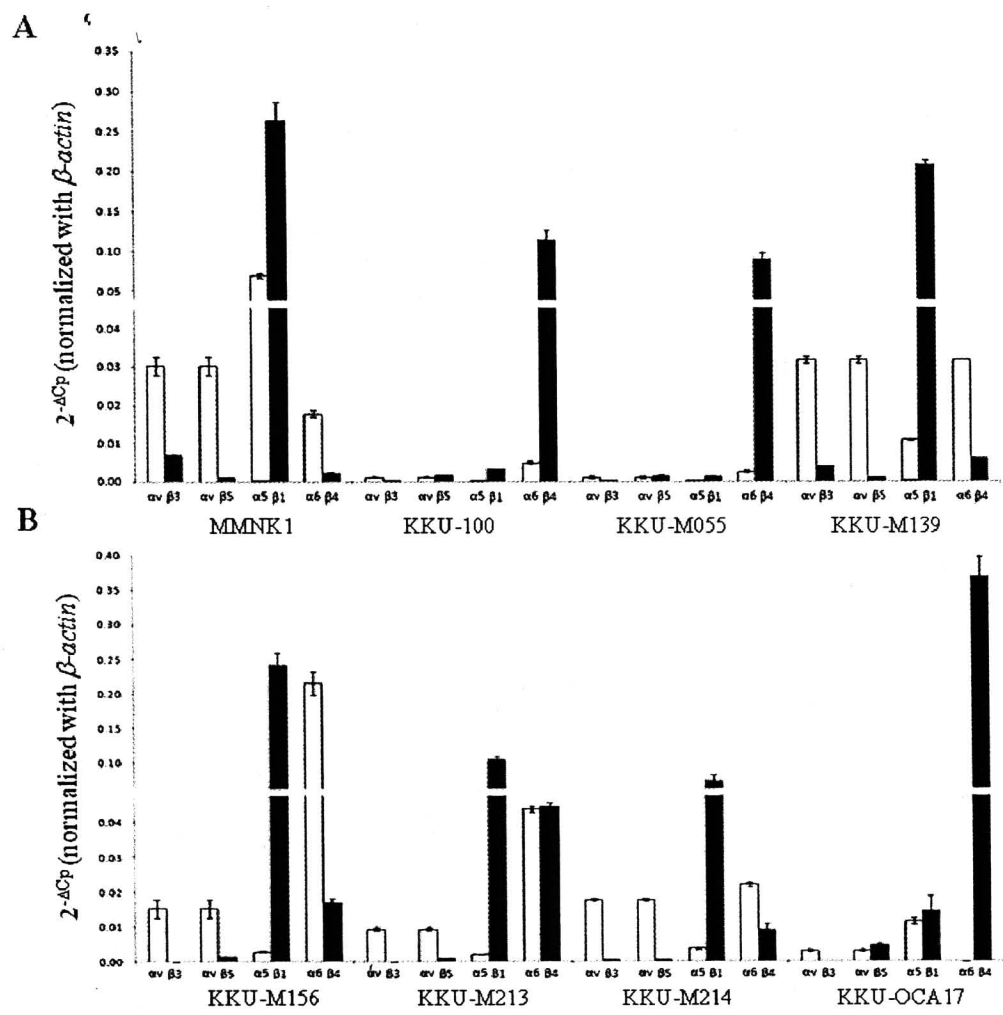
Sample	Expression of PN/ β -actin ($2^{-\Delta\Delta C_p}$)	SD
KKU-100	1.4×10^{-10}	8.3×10^{-11}
KKU-M055	1.2×10^{-7}	1.8×10^{-8}
KKU-M213	1.5×10^{-7}	5.8×10^{-8}
KKU-M156	1.6×10^{-16}	1.1×10^{-17}
KKU-M139	1.8×10^{-16}	1.2×10^{-17}
KKU-OCA17	3.5×10^{-10}	4.6×10^{-11}
Lf	1.0	0
Cf	2.6	0.12



รูปที่ 9 การแสดงออกของจีน *PN* ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ และเซลล์ fibroblast โดยกำหนดให้ระดับการแสดงออกของจีน *PN* ใน Lf เท่ากับ 1

4.8 ผลการศึกษาการแสดงออกของตัวรับ ITG ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดย real time RT-PCR

ผลการศึกษาการระดับการสร้าง ITG ชนิด α -subunit ได้แก่ α_v , α_5 , และ α_6 ; และ β -subunits ได้แก่ β_1 , β_3 , β_4 , และ β_5 พบว่าในกลุ่ม α -subunit ITG เซลล์ CCA มีการสร้าง α_6 สูงที่สุดในเซลล์ CCA เกือบทุกชนิด ยกเว้น KKU-OCA17 (รูปที่ 10A-B) ในขณะที่ α_5 -subunit พบมากสุดในเซลล์ immortalized non-tumorigenic bile duct epithelial cell, MMNK1 และมีการแสดงออกในระดับปานกลางในเซลล์ KKU-M139, KKU-M213, และ KKU-M214 ในส่วน β -subunit พบว่า β_1 มีการสร้างในระดับสูงในเซลล์ KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213, KKU-M214, และ MMNK1 ในขณะที่เซลล์ KKU-K100, KKU-M055, และ KKU-OCA17 มีการสร้าง ITG β_4 ในระดับที่สูงมากกว่า (รูปที่ 10A-B) และเมื่อคาดการณ์จากความรู้พื้นฐานที่ว่า α - และ β -subunit มีการจับคู่กันเป็น heterodimer แบบจำเพาะ ในที่นี้คือ ITGs $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, และ $\alpha_6\beta_4$ มาประกอบผลการศึกษาการระดับของ ITG subunit แต่ละชนิดมีความเป็นไปได้สูงที่ว่า ITG $\alpha_5\beta_1$ และ ITG $\alpha_6\beta_4$ เป็น ITG receptor ที่พบมากใน CCA cell โดย $\alpha_5\beta_1$ มีระดับสูงในเซลล์ KKU-M139 ส่วน KKU-M156, KKU-M213, และ KKU-M214 มีการสร้าง $\alpha_6\beta_4$ ในระดับสูง ในขณะที่ KKU-100 และ KKU-M055 มีการสร้าง ITGs ทั้ง 2 ชนิดนี้ในระดับที่ต่ำกว่า



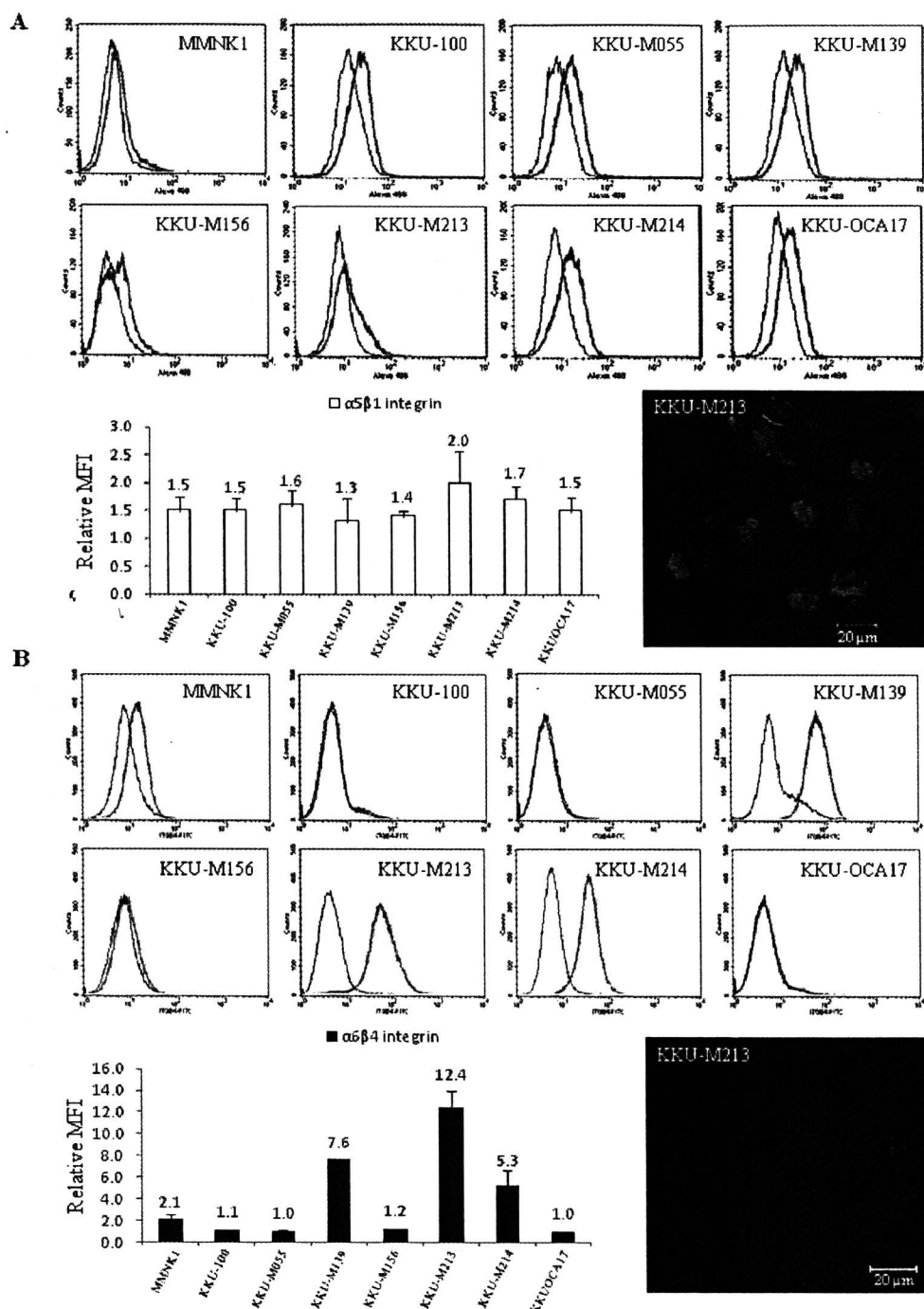
รูปที่ 10 การแสดงออกของจีน ITG ชนิด α -subunits และ β -subunit ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ ได้แก่ MMNK1, KKU-K100, KKU-M055 และ KKU-M139 (A); KKU-M156, KKU-M213, KKU-M214 และ KKU-OCA17 (B) แท่งกราฟแสดง mean $\pm$ SD ของ triplicate experiments

4. 9 การแสดงออกของ membrane ITGs $\alpha 5\beta 1$ และ $\alpha 6\beta 4$ ใน CCA cell lines

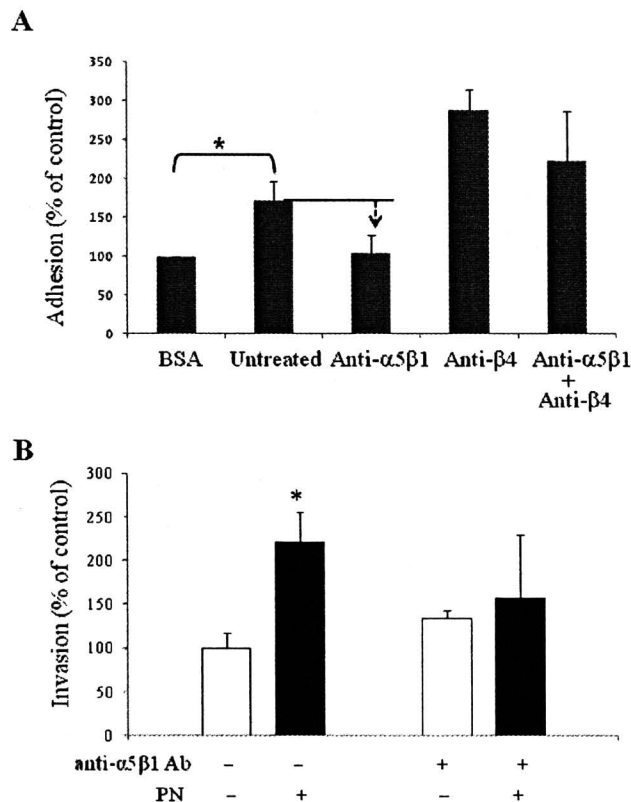
ผลการยืนยันศึกษาระดับของ ITGs $\alpha 5\beta 1$ และ $\alpha 6\beta 4$ บน membrane ของ CCA cells โดย FACS analysis พบว่า ITG $\alpha 5\beta 1$ มีการแสดงออกในระดับใกล้เคียงกันในทุกเซลล์ โดยมีระดับที่สูงที่สุดในเซลล์ KKU-M213 (MFI ประมาณ 2) (รูปที่ 11A) ในขณะที่ CCA cell lines ที่มีที่มาจากเนื้อเยื่อมะเร็งชนิด well differentiation จะมีระดับ ITG $\alpha 6\beta 4$ สูง ได้แก่ เซลล์ KKU-M213 และ KKU-M214 (รูปที่ 11B) เซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อชนิด moderately และ poorly differentiations ได้แก่ เซลล์ KKU-M055, KKU-M156, และ KKU-100 ตามลำดับ พบว่ามีการสร้าง ITG $\alpha 6\beta 4$ ที่ต่ำกว่า เมื่อดูที่ระดับการสร้างของทั้ง ITGs $\alpha 5\beta 1$ และ $\alpha 6\beta 4$ พบว่า เซลล์ KKU-M213 มีระดับการสร้าง ITGs ทั้ง 2 ชนิดนี้สูงกว่า CCA cells ชนิดอื่นๆ และเมื่อยืนยันผลด้วย immunocytochemical staining พบว่ามี ITGs $\alpha 5\beta 1$ และ $\alpha 6\beta 4$ บน membrane ของเซลล์ KKU-M213 จริง (รูปที่ 11A-B: immunofluorescence staining)

4.10 Adhesion และ invasion ของ CCA cell lines จากการเหนี่ยวนำของ PN ผ่าน ITGs $\alpha 5\beta 1$

เพื่อพิสูจน์ว่าเซลล์ KKU-M213 ใช้ ITG ใดในการจับกับ PN ผลการทดสอบโดย adhesion assay บนพื้นผิวที่มี rPN เกาะอยู่พบว่า เซลล์จับกับพื้นผิวดังกล่าวได้มากกว่า negative control (รูปที่ 12A) บ่งชี้ว่าเซลล์สามารถจับกับ PN ได้ และเมื่อ block ITG $\alpha 5\beta 1$ ด้วย neutralizing antibody ต่อ ITG ดังกล่าว พบว่าเซลล์สามารถจับกับ PN ได้ลดลง บ่งชี้ว่าเซลล์จับกับ PN โดยใช้ ITG $\alpha 5\beta 1$ โดยการทดสอบแบบเดียวกันกับ ITG $\alpha 6\beta 4$ ให้ผลไม่ชัดเจนเท่า และเมื่อทดสอบการทำงานของ PN ผ่าน ITG $\alpha 5\beta 1$ ในการเหนี่ยวนำ cell invasion ในสภาวะที่นำเซลล์ไปบ่มกับ neutralizing antibody ต่อ ITG $\alpha 5\beta 1$ ผลพบว่าความสามารถของเซลล์ในการถูกเหนี่ยวนำให้มี invasion โดย PN นั้นลดลง ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่า PN-induced invasion ของ CCA cells ผ่านทาง ITG $\alpha 5\beta 1$ receptor (รูปที่ 12B)



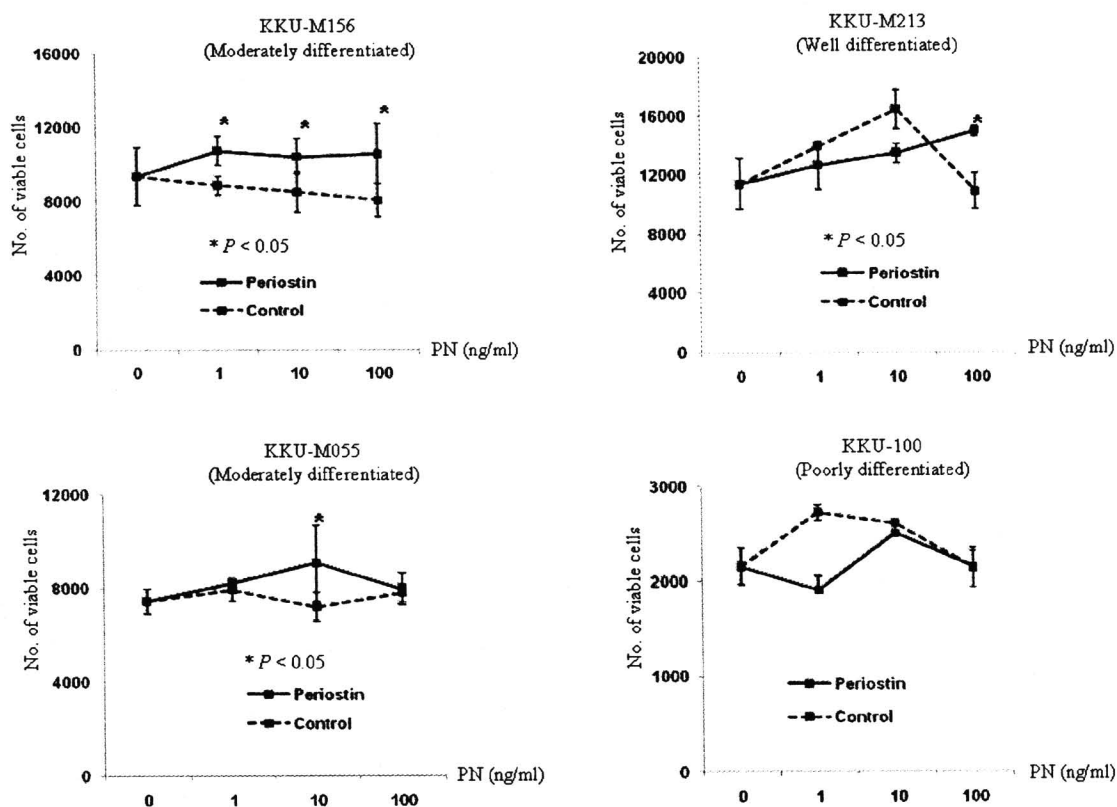
รูปที่ 11 Flow cytometry analysis ของ membrane ITGs $\alpha 5 \beta 1$ (A) และ $\alpha 6 \beta 4$ (B) ใน CCA cell lines แต่ละชนิด และ immunofluorescence staining ของ ITGs ทั้ง 2 ชนิด ในเซลล์ KKU-M213



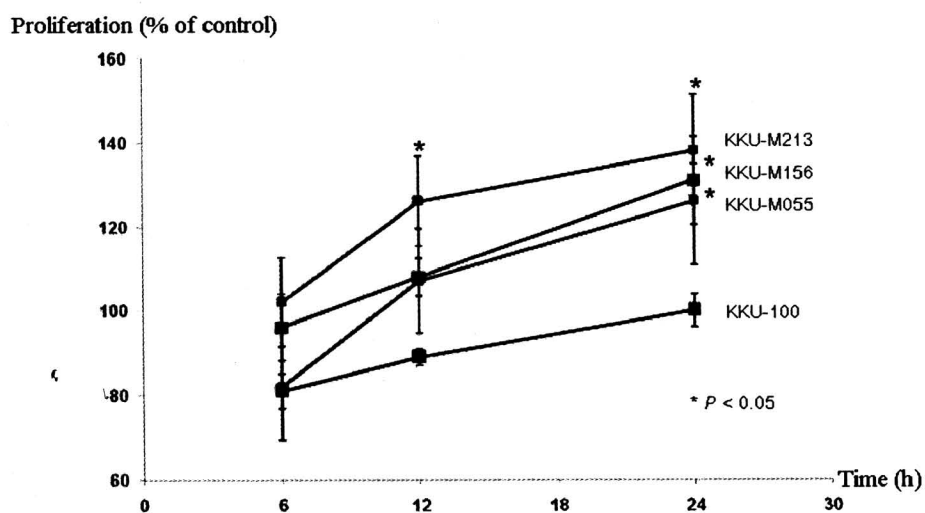
รูปที่ 12 ผลของ ITG $\alpha 5\beta 1$ หรือ $\alpha 6\beta 4$ ต่อ PN-binding และ PN-induced invasion: Adhesion assay ของ untreated KKU-M213 cells เปรียบเทียบ neutralizing anti-ITG $\alpha 5\beta 1$ หรือ anti-ITG $\alpha 6\beta 4$ antibodies-treated cells (A) Invasion assay ของ untreated KKU-M213 cells เปรียบเทียบกับ neutralizing anti-ITGs $\alpha 5\beta 1$ หรือ $\alpha 6\beta 4$ antibodies-treated cells (B) แท่งกราฟแสดง mean $\pm$ SD ของข้อมูลจากการทำการทดลอง 3 ครั้ง เครื่องหมาย (*) หมายถึงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.11 ผลการศึกษาผลของโปรตีน PN ต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวและการเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

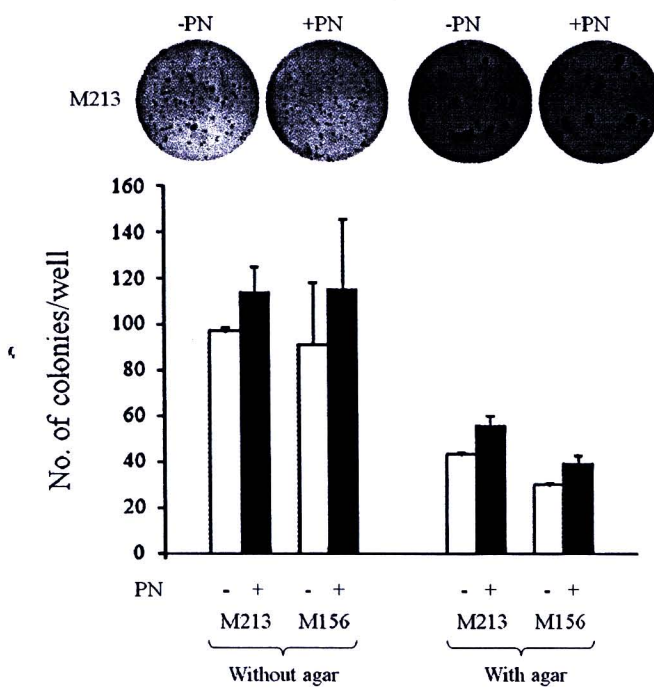
เพื่อศึกษาบทบาทของ PN ในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผู้วิจัยได้ใช้โปรตีนสายผสม PN (recombinant PN) ในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยวัดจำนวนเซลล์มีชีวิต (viable cell) ในสภาวะที่เลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี rPN เปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มี rPN เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ ได้แก่ KKU-M156, KKU-M213, KKU-M055 และ KKU-100 ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ PN 1-100 ng/ml เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง จากนั้นวัดการแบ่งตัวของเซลล์ โดยใช้ MTS tetrazolium compound solution kit (Promega®) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแต่ละชนิดสามารถถูกกระตุ้นให้แบ่งตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยความเข้มข้นของ PN ที่แตกต่างกันไป คือที่ความเข้มข้น 1-100, 100 และ 10 ng/ml สำหรับเซลล์ KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-100 ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ KKU-100 ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PN (รูปที่ 13) เมื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์แต่ละชนิด คือ 100 ng/ml สำหรับเซลล์ KKU-M156 และ KKU-M213 และ 10 ng/ml สำหรับเซลล์ KKU-M055 พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 3 ชนิด มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ถูกกระตุ้นด้วย PN (time dependent manner) ในขณะที่เซลล์ KKU-100 ไม่ตอบสนองต่อ PN (รูปที่ 14) นอกจากนี้พบว่า PN สามารถเหนี่ยวนำ colony formation ของ CCA cell ซึ่งแสดงถึง cell growth ได้ด้วย (รูปที่ 15)



รูปที่ 13 ผลการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วย recombinant PN: * $P < 0.05$ เทียบกับจำนวนเซลล์ของ negative control ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย PN



รูปที่ 14 การแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M156, KKKU-M213 และ KKKU-M055 เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant PN แบบ time dependent, * $P < 0.05$ เทียบกับจำนวนเซลล์ของ negative control ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย PN

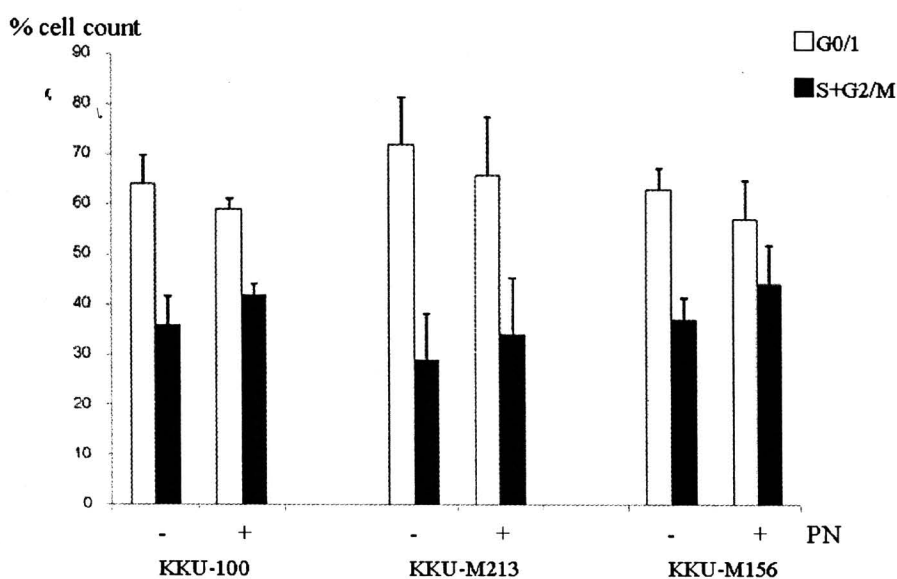


รูปที่ 15 ผลของ PN ต่อ cell growth ของ CCA cells วัดโดย Colony formation assay



4.12 ผลการศึกษาผลของโปรตีน PN ต่อการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle analysis)

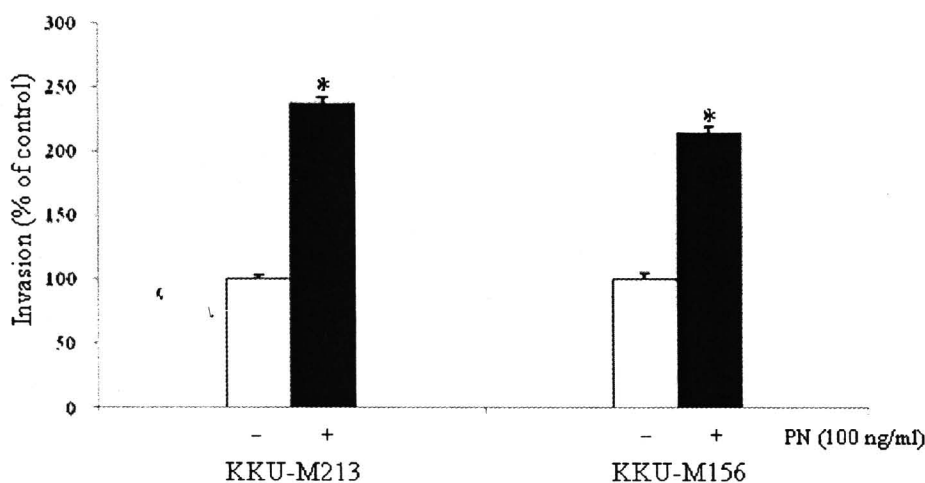
ผู้วิจัยได้ใช้ rPN ในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และศึกษาการกระจายตัวของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) โดยทำการ arrest เซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในความเข้มข้นของ PN ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์แต่ละชนิด ดังกล่าวในข้อ 3.3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวิเคราะห์การกระจายตัวของเซลล์ใน cell cycle โดย flow cytometry ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ KKU-M213 และ KKU-M156 ถูกเหนี่ยวนำโดย PN ให้เข้าสู่ระยะ S และ G2+M คิดเป็น 34% และ 44% ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นโดย PN ที่มีเซลล์ในระยะดังกล่าวเท่ากับ 29% และ 37% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ KKU-100 พบว่ามีเซลล์ในระยะ active น้อยกว่าเล็กน้อย (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 Cell cycle analysis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อถูกกระตุ้นด้วย recombinant PN

4.13 ผลของโปรตีน PN ต่อการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

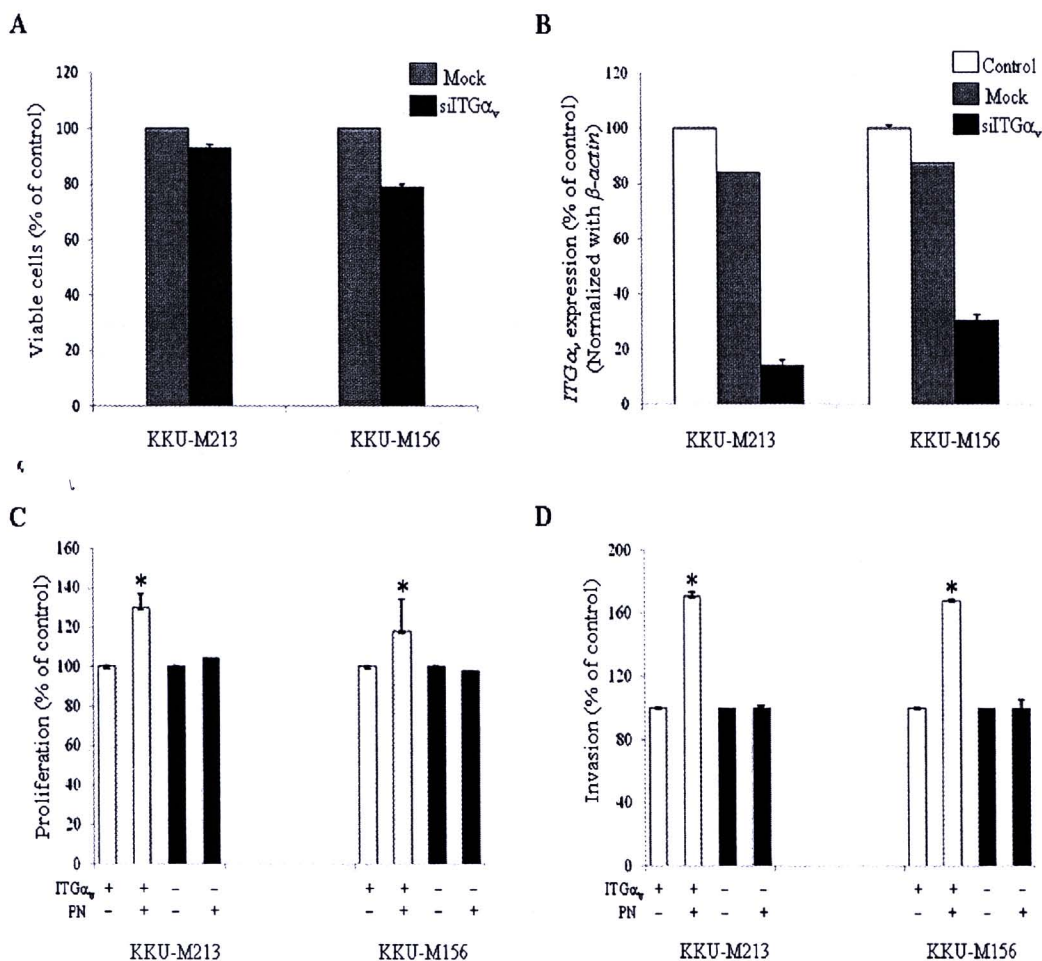
ผู้วิจัยได้ใช้ recombinant PN 100 ng/ml กระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 และ KKU-M156 ซึ่งมีการแสดงออกของ ITGs ในระดับสูง และศึกษาการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้ Modified Boyden Chamber (Double chamber assay) พบว่า recombinant PN สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีคุณสมบัติในการรุกรานมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย KKU-M213 ให้ผลการถูกเหนี่ยวนำมากกว่า KKU-M156 (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 การเพิ่มขึ้นของการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 และ KKU-M156 จากการเหนี่ยวนำโดย recombinant PN

4.14 ผลการศึกษายับยั้งการสร้าง $ITG\alpha_v$ ต่อการตอบสนองต่อ PN ในการเหนี่ยวนำการแบ่งตัว (proliferation) และการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

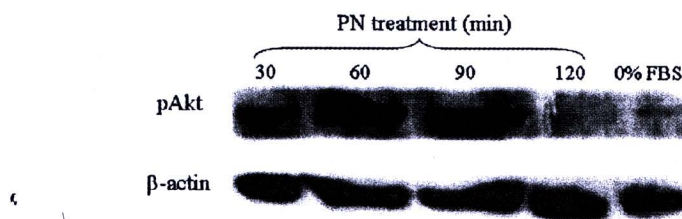
เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ $ITG\alpha_v$ ด้วยเทคนิค RNAi โดยใช้ si $ITG\alpha_v$ (Santa Cruz, Sc-29372) ซึ่งประกอบด้วยสาย siRNA ต่อ $ITG\alpha_v$ จำนวน 3 สาย ได้แก่ 5'-gucagaauuucgagacaaa-3', 5'-caccaacaagagagccaaa-3' และ 5'-ccacugaccagaacuagaa-3' ทำการ transfect สาย siRNA โดย Lipofectamine (Invitrogen) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่าเซลล์ในสภาวะที่มีและไม่มี Lipofectamine มีความแข็งแรงใกล้เคียงกัน (รูปที่ 18A) siRNA สามารถลดระดับการแสดงออก (knockdown) ของ $ITG\alpha_v$ ได้ประมาณ 70-80% ของปริมาณทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ (รูปที่ 18B) เซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ $ITG\alpha_v$ ลดลงนี้ มีความสามารถในการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำโดย PN ให้เกิดการแบ่งตัว (proliferation) และการรุกราน (invasion) น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 18C-D)



รูปที่ 18 การยับยั้งการแสดงออกของจีน *ITG α_v* ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M213 และ KKKU-M156 โดยใช้ *siITG α_v* และการตอบสนองต่อ recombinant PN: Viability ของเซลล์ที่สัมผัสและไม่สัมผัส (mock) กับ *siITG α_v* (A) *siITG α_v* สามารถยับยั้งการสร้าง *ITG α_v* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (B) เซลล์ KKKU-M213 และ KKKU-M156 ที่มีการสร้าง *ITG α_v* ลดลงภายหลังสัมผัสกับ *siITG α_v* มีความสามารถในการเกิด cell proliferation (C) และ invasion (D) น้อยกว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการสร้าง *ITG α_v* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * $P < 0.05$

4.15 PN เหนี่ยวนำการสร้าง phosphorylated AKT

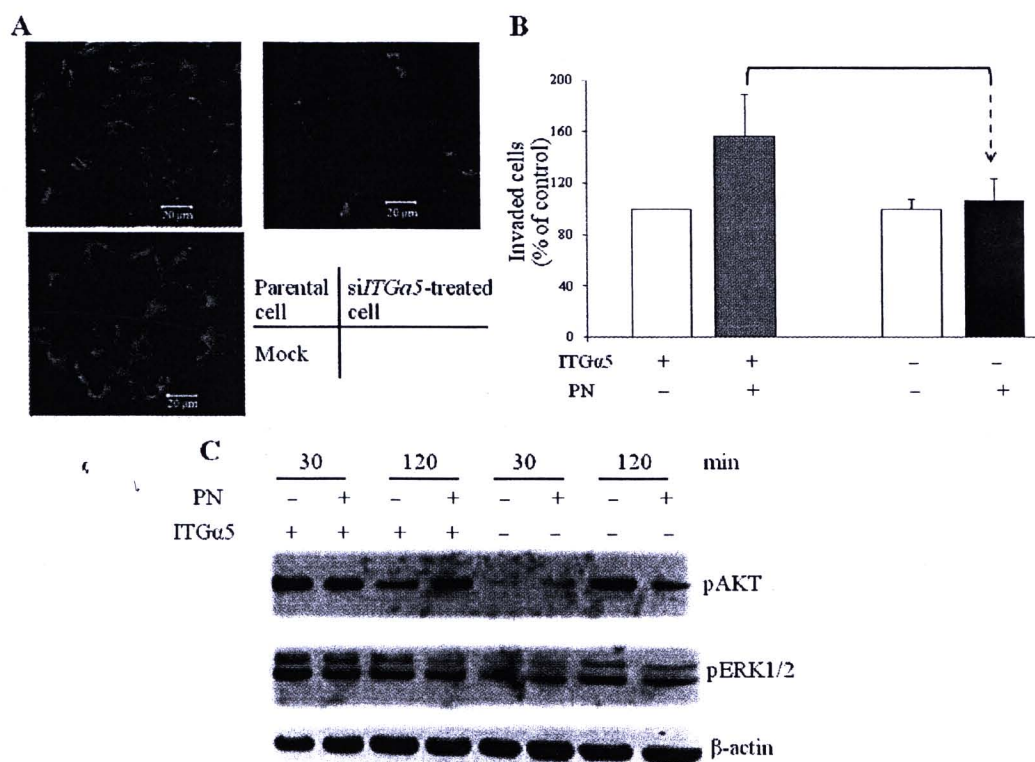
การที่ PN จะสามารถกระตุ้น cell function ได้โดยผ่าน ITG receptor นั้น เท่าที่มีรายงานมาพบว่ามักจะผ่านการกระตุ้น PI3K/AKT signal pathway โดยทำให้เกิด phosphorylated AKT (pAKT) เพิ่มขึ้นพบว่าเมื่อนำ recombinant PN มากระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเป็นเวลา 30-90 นาที เซลล์มะเร็งมีปริมาณ pAKT เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ control condition ที่ไม่ได้ treat ด้วย PN (เลี้ยงเซลล์ใน 0% fetal bovine serum) (รูปที่ 19) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการกระตุ้น pAKT จะลดลงเมื่อเวลาผ่านไปถึง 120 นาที ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า PN สามารถกระตุ้นเซลล์ผ่าน AKT pathway ซึ่งสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า PN กระตุ้นเซลล์ผ่าน ITG receptor และน่าจะเป็นแบบ AKT dependent pathway



รูปที่ 19 Western blot analysis แสดงปริมาณ pAKT ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M213 จากการกระตุ้นโดย recombinant PN ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ negative control ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ไม่มี serum

4.16 PN-mediated CCA invasion ผ่าน ITGa5b1 mediated AKT-dependent signaling pathway

เซลล์ KKKU-M213 ที่ผ่านการทดสอบยืนยันว่ามีระดับ ITGα5β1 ลดลง หลังจากได้รับการ treat ด้วย siITGα5β1 (รูปที่ 20A) และสอดคล้องกับผลที่ลดลงของ invasion function จากการเหนี่ยวนำโดย PN (รูปที่ 20B) พบว่าเมื่อนำเซลล์ในสภาวะดังกล่าวเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการสร้าง ITGα5β1 ปกติ มาตรวจระดับ pAKT และ pERK ภายหลังจากนำเซลล์ไปกระตุ้นโดย rPN พบว่าเซลล์ที่มี ITGα5β1 ลดลงจะมีระดับของ pAKT ลดลงสัมพันธ์กับ PN-induced invasion ที่ลดลง ในขณะที่ pERK ไม่มีความแตกต่างในเซลล์ที่มี ITGα5β1 ต่างกัน (รูปที่ 20C) ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าเซลล์ถูกเหนี่ยวนำโดย PN ให้มา invasion capacity เพิ่มขึ้นผ่าน ITGα5β1 receptor และ AKT-dependent signaling pathway



รูปที่ 20 PN เหนี่ยวนำ invasion ผ่าน ITGA5β1 receptor และ AKT dependent pathway: เทคนิค Immunocytochemistry staining แสดงเซลล์ที่สัมผัสกับ siITGA5 มีการสร้าง ITGA5β1 ลดลง (A) เซลล์ที่มี ITGA5β1 ลดลงจะถูกเหนี่ยวนำโดย rPN ให้มี invasion น้อยกว่า negative control (mock) (B) Western blot analysis แสดงระดับ pAKT และ pERK ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย PN ที่เวลาต่างๆ กัน (C) กราฟแสดง mean ± SD ของการทดลอง 2 ครั้ง ระดับ β-actin แสดงปริมาณ loading protein

4.17 ผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ Cf ด้วยเทคนิค Protein array

นอกเหนือจากการศึกษา gene expression profile ของเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf แล้วนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาโปรตีนที่เซลล์ Cf สร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (secreted proteins) โดยเทคนิค Protein array ทั้งนี้มีสมมติฐานว่า จากการที่ conditioned-medium (CM) ของเซลล์ Cf สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงน่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่เซลล์ Cf จะสร้าง secreted proteins ที่มีฤทธิ์เร่งการเติบโตของเซลล์ (growth factors) และรวมถึงโปรตีนที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำ tumorigenesis อีกหลายชนิด เพื่อเป็นการพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาชนิดของโปรตีนที่สร้างและหลั่งจากเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf โดยใช้ Biotin Label-based Human Antibody Array I kit (RayBio[®]) ซึ่งสามารถตรวจหาโปรตีนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ดี โดยสามารถตรวจหาโปรตีนได้จำนวน 507 ชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม cytokine และ growth factor เป็นส่วนใหญ่ ผลการศึกษาพบว่า มี up-regulated proteins จำนวน 123 ชนิด คิดเป็น 24% ของโปรตีนทั้งหมดที่ศึกษา (ตารางที่ 9) ในขณะที่ down-regulated proteins จำนวน 70 ชนิดคิดเป็น 14% (ตารางที่ 10) โดยโปรตีนที่การสร้างเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ Cf มากที่สุดได้แก่ Endoglin/CD105 โดยมีปริมาณ 8.4 เท่าเทียบกับในเซลล์ Lf (ตารางที่ 11) นอกจากนี้พบว่าโปรตีนที่มีการสร้างเพิ่มขึ้นในเซลล์ Cf ใน 10 อันดับแรกได้แก่ Lymphotactin, NMP-1, NRG1 Isoform GGF2, CXCL14/BRAK, VEGF, Cripto-1, NRG3, Pentraxin3/TSG-14, และ GDF5 ที่ 6.2, 5.2, 4.1, 3.8, 3.7, 3.6, 3.3, 3.3, และ 3.2 เท่า ตามลำดับ

เมื่อจัดกลุ่มโปรตีนตาม functional group แบ่งได้เป็นกลุ่ม Cytokine, Receptors, Growth factors, Phosphorylated proteins และ Matrix metalloproteinases โดยโปรตีนที่มีระดับการสร้างมากที่สุดในแต่ละกลุ่มและมีปริมาณมากกว่า 3 เท่าของที่สร้างในเซลล์ Lf ได้แก่โปรตีน Endoglin/CD105, VEGF R2 (KDR), NRG1 Isoform GGF2 และ MMP-1 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) จะสังเกตได้ว่าโปรตีนที่กล่าวมาดังกล่าวมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งในขั้นตอนที่แตกต่างกัน เช่น Endoglin, VEGF และ GREMLIN มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ angiogenesis โปรตีน CXCL14, Cripto-1 และ MMP-1 เกี่ยวข้องกับ invasion ในขณะที่โปรตีน CXCL14, Orexin A และ GREMLIN เหนี่ยวนำให้เกิด tumor growth เป็นต้น ซึ่งบทบาทดังกล่าว จะได้รับการพิสูจน์ในมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป



ตารางที่ 9 Up-regulated proteins ในเซลล์ Cf เรียงตามลำดับที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากมากไปน้อย

Name	Expression (Cf/Lf)	Name	Expression (Cf/Lf)
Endoglin / CD105	8.4	P-selectin	2.6
Lymphotactin/ XCL1	6.2	SMDF / NRG1Isoform	2.6
MMP-1	5.2	HRG-beta1	2.6
NRG1 Isoform GGF2	4.1	TGF-alpha	2.6
CXCL14 / BRAK	3.8	TGF-beta RI / ALK-5	2.5
VEGF	3.7	NOV / CCN3	2.5
Cripto-1	3.6	Activin RIB / ALK-4	2.5
NRG3	3.3	FGF R3	2.5
Pentraxin3 / TSG-14	3.3	Osteoactivin / GPNMB	2.5
GDF5	3.2	FAM3B	2.4
HRG-alpha	3.2	Thymopoietin	2.4
VEGF R2(KDR)	3.1	TMEFF2	2.4
WIF-1	3.1	Thrombospondin-4	2.4
GDF9	3.0	GDF11	2.4
TRAIL R4 / TNFRSF10D	3.0	RANK / TNFRSF11A	2.4
Orexin A	3.0	TLR3	2.4
DcR3 / TNFRSF6B	2.9	IL-31	2.4
GREMLIN	2.9	ALCAM	2.4
MIF	2.9	EDG-1	2.4
GDF3	2.9	Smad 8	2.4
IL-13 R alpha 2	2.9	MCP-2	2.4
SIGIRR	2.9	MIP-3 beta	2.3
NeuroD1	2.8	IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	2.3
Tarc	2.8	Frizzled-3	2.3
Siglec-5 (CD170)	2.8	Dkk-4	2.3
CCR6	2.8	GRO-a	2.3
ENA-78	2.8	NRG1-alpha / HRG1-alpha	2.3
TRAIL/ TNFSF10	2.7	IL-2 R beta(CD122)	2.3
Activin A (receptor)	2.7	IL-16	2.3
GDF8	2.7	Galectin-3	2.3
GDF1	2.6	VCAM-1 (CD106)	2.3
IL-22 R	2.6	WISP-1 / CCN4	2.3
FGF-2 (b FGF)	2.6	LECT2	2.3
ICAM-1	2.6	MIG	2.2
6Ckine	2.6	TACI / TNFRSF13B	2.2
uPAR	2.6	Frizzled-7	2.2

ตารางที่ 9 Up-regulated proteins ในเซลล์ Cf เรียงตามลำดับที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากมากไปน้อย (ต่อเนื่อง)

Name	Expression (Cf/Lf)	Name	Expression (Cf/Lf)
Prolactin	2.2	Endostatin	2.1
FGF R4	2.2	IL-22 BP	2.1
Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)	2.2	MMP-12	2.1
PECAM-1 (CD31)	2.2	L-Selectin (CD62L)	2.1
IL-1 ra	2.2	TCCR / WSX-1	2.1
MDC	2.2	PDGF-C	2.1
IL-1 R8	2.2	Kremen-1	2.1
GFR alpha-4	2.2	ICAM-2	2.1
Inhibin A	2.2	IFN-alpha / beta R2	2.1
EGF R / ErbB1	2.2	FGF R5	2.1
IL-17R	2.2	TMEFF1 / Tomoregulin-1	2.0
MPIF-1 / CCL23	2.1	NT-3	2.0
TSLP	2.1	IL-6	2.0
Cerberus 1	2.1	sFRP-3	2.0
Spinesin	2.1	IL-1 R9	2.0
IL-1 sRI	2.1	FGF-21	2.0
IGFBP-1	2.1	Soggy-1	2.0
BCMA / TNFRSF17	2.1	TRAIL R3 / TNFRSF10C	2.0
VEGF-B	2.1	Latent TGF-beta bp1	2.0
FGF-13 1B	2.1	TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A	2.0
Dkk-3	2.1	M-CSF	2.0
sgp130	2.1	CTLA-4 (CD152)	2.0
Insulin	2.1	LFA-1 alpha	2.0
SDF-1 / CXCL12	2.1	TGF-beta 5	2.0
IL-31 RA	2.1	CRIM 1	2.0
TGF-beta 1	2.1		

ตารางที่ 10 Down-regulated proteins ในเซลล์ Cf เรียงตามลำดับที่มีการแสดงออกลดลงจากมากไปน้อย

Name	Expression (Cf/Lf)	Name	Expression (Cf/Lf)
Smad 4	0.9	IL-3 R alpha	0.7
Frizzled-6	0.9	IL-4 R	0.7
FGF-16	0.9	MMP-8	0.7
FGF-10 / KGF-2	0.9	MMP-10	0.7
Activin RIA / ALK-2	0.9	Thrombospondin (TSP)	0.7
CNTF R alpha	0.9	IL-19	0.7
Axl	0.9	TIMP-2	0.7
OSM	0.9	Progranulin	0.7
Hepassocin	0.9	Dtk	0.7
Thrombospondin-1	0.9	Luciferase	0.7
Dkk-1	0.9	Artemin	0.6
MMP-24 / MT5-MMP	0.9	Neurturin	0.6
IL-24	0.8	sFRP-4	0.6
Glypican 3	0.8	BTC	0.6
Angiopoietin-like Factor	0.8	Angiopoietin-1	0.6
CCL14 / HCC-1 / HCC-3	0.8	IGFBP-6	0.6
IGFBP-rp1 / IGFBP-7	0.8	E-Selectin	0.6
Pref-1	0.8	CV-2 / Crossveinless-2	0.6
CXCR6	0.8	BMP-3b / GDF-10	0.6
Smad 7	0.8	FGF-18	0.6
NCAM-1 / CD56	0.8	BD-1	0.6
CCR2	0.8	CCR9	0.6
CD40 / TNFRSF5	0.8	Osteoprotegerin / TNFRSF11B	0.5
NRG1-beta1 / HRG1- beta1	0.8	Siglec-9	0.5
IL-1 F6 / FIL1 epsilon	0.8	Angiostatin	0.5
RELT / TNFRSF19L	0.8	MMP-7	0.4
CLC	0.8	SCF	0.4
BMP-7	0.8	APRIL	0.4
LIF R alpha	0.8	BMP-15	0.4
B7-1 (CD8)	0.8	Angiopoietin-like 1	0.4
TRANCE	0.8	Angiopoietin-like 2	0.3
Heregulin	0.7	GDF-15	0.3
MSPbeta-chain	0.7	ErbB3	0.3
BMP-5	0.7	HGF	0.1
CCR3	0.7	uPA	0.1

ตารางที่ 11 Up-regulated proteins ที่มีระดับเพิ่มขึ้นในเซลล์ Cf มากกว่า 3 เท่า เทียบกับเซลล์ Lf จัดแบ่งกลุ่มตาม biological function

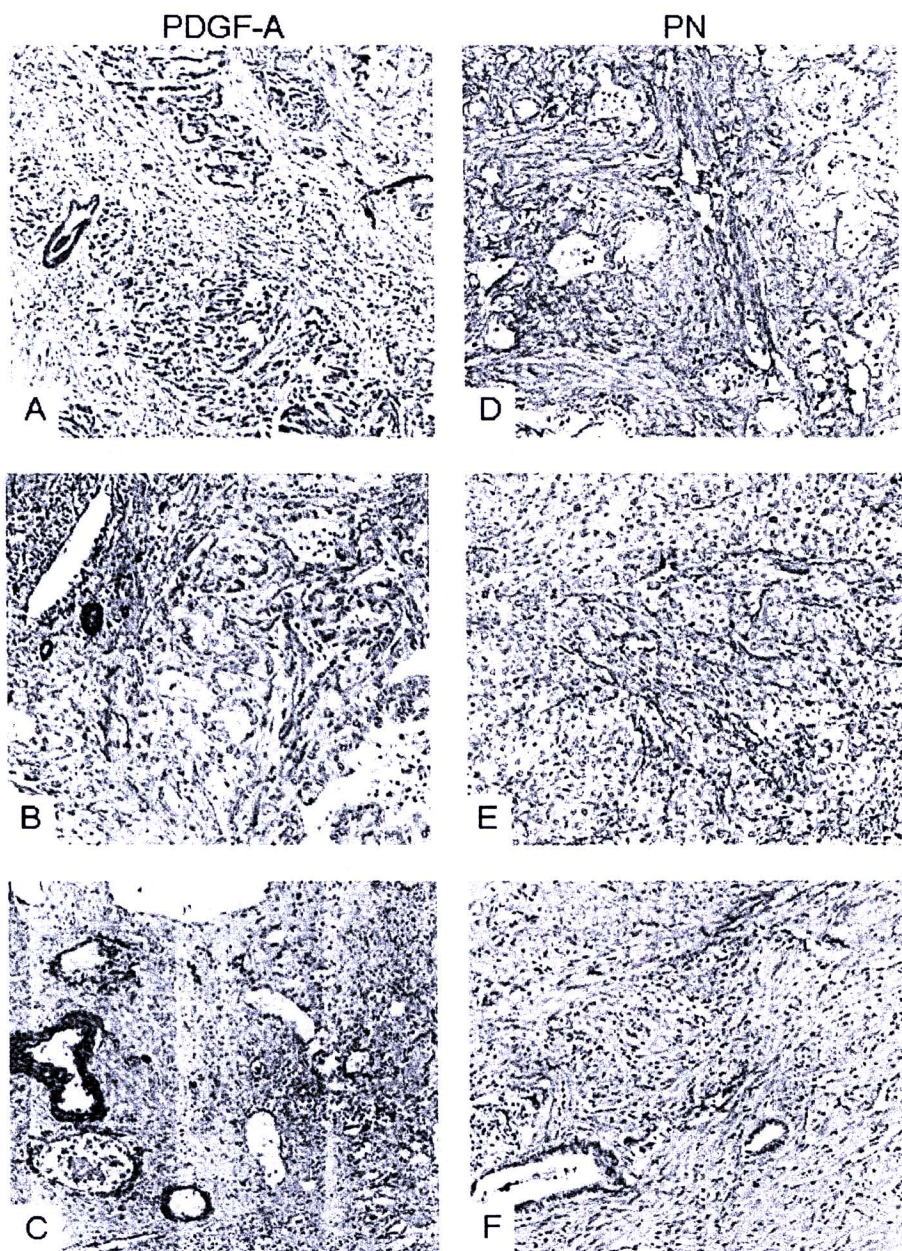
Biological function	% of total	Name	Expression (Cf/Lf)
Cytokines	63.4	Endoglin / CD105	8.4
		Lymphotactin/ XCL1	6.2
		CXCL14 / BRAK	3.8
		VEGF	3.7
		Cripto-1	3.6
		Pentraxin3 / TSG-14	3.3
		WIF-1	3.1
		Orexin A	3.0
		TRAIL R4 / TNFRSF10D	3.0
		GREMLIN	2.9
Receptors	17.1	VEGF R2(KDR)	3.1
		SIGIRR	2.9
		IL-13 R alpha 2	2.9
Growth factors	16.3	NRG1 Isoform GGF2	4.1
		NRG3	3.3
		GDF5	3.2
		HRG-alpha	3.2
		GDF9	3.2
		GDF3	2.9
Matrix metalloproteinases	1.6	MMP-1	5.2



4.18 ผลการย้อม *angiogenic markers* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยเทคนิค *Immunohistochemistry*

จากผล real time RT-PCR บ่งชี้ว่า *PDGF-A* เป็นยีนหนึ่งที่มีระดับการสร้างสูงขึ้นในเซลล์ Cf เทียบกับ fibroblast ปกติ และผลการทดลองเบื้องต้นจากกลุ่มผู้วิจัยเมื่อย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งมาสกัด RNA ซึ่งจะเป็น RNA ที่มาจากทั้ง cancer cell และ fibroblast พบว่า ยีน *AREG*, *PDGF-A* และ *PN* เป็นยีนที่มีความแตกต่างในระดับการสร้างในเนื้อเยื่อมะเร็งเทียบกับ benign liver tissues (data not shown) เนื่องจาก *PDGF-A* เป็น *angiogenic marker* ที่สำคัญในมะเร็งหลายชนิด ประกอบกับข้อมูลการศึกษาโปรตีนที่ fibroblast ในเนื้อเยื่อมะเร็งสร้างได้ จากการศึกษาโดย protein chip ตามที่เคยรายงานไปก่อนหน้านี้แล้วนั้น พบว่า *CD105* (*endoglin*) เป็นโปรตีนที่มี up-regulation มากที่สุดใน CM ของเซลล์ Cf ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์บทบาทของ *PDGF-A* และ *CD105* ในการเป็น *angiogenic factor* ในมะเร็งท่อน้ำดี ผู้วิจัยได้ย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งด้วย anti-*PDGF-A* และ anti-*CD105* antibody โดยใช้ anti-*CD31* เป็น positive control ของ vessel โดยเฉพาะ pre-existing vessels ทั้งนี้มีสมมติฐานว่าการตรวจหา *PDGF-A* และ/หรือ *CD105* จะเป็น marker ที่เหมาะสมมากกว่าในการพยากรณ์โรค เนื่องจาก *CD105* มีรายงานว่ามีความจำเพาะกับ neovessel (new vessels) มากกว่า *CD31* ดังนั้นในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีกระบวนการ angiogenesis เพิ่มมากขึ้นเพื่อมาเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะตรวจพบ neovessels เพิ่มขึ้น และน่าจะสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

ผลการย้อม *PDGF-A* และ *CD31* ในเนื้อเยื่อมะเร็งแล้วจำนวน 70 ราย เนื้อเยื่อตับปกติ 5 ราย และมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma อีกจำนวน 5 ราย อยู่ในช่วงการอ่านผล และแสดงเป็นค่า microvessel density (MVD) โดยวัดจำนวน vessel ใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อพื้นที่ (area) ส่วนการย้อม *CD105* ของเนื้อเยื่อทั้งหมดอยู่ในระหว่างดำเนินการ จากนั้นวางแผนที่จะนำข้อมูล MVD ที่ได้จากการย้อมด้วย antibody ต่อ *PDGF-A*, *CD105* และ *CD31* ไปหาความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ทั้งนี้เพื่อบ่งชี้ว่า *angiogenic marker* ตัวใดมีความสัมพันธ์กับ prognosis หรือภาวะ invasion/metastasis ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และจะได้สรุปผลและจัดทำเป็น manuscript ต่อไป



รูปที่ 21 Immunohistochemical staining ต่อ PDGF-A (A-C) และ PN (D-F) ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีพยาธิสภาพต่างกัน ได้แก่ well-differentiated: A, D; moderately-differentiated: B, E; และ poorly-differentiated: C, F (กำลังขยาย 100X)