

## บทคัดย่อ

โปรตีนแอลฟา 1-แอนติทริปซิน (Alpha 1-antitrypsin, A1AT) เป็นไกลโคโปรตีนที่ส่วนใหญ่สร้างจากตับ และในสภาวะปกติจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม serine proteases เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อไม่ให้ถูกทำลายจากเอนไซม์เหล่านี้ โดยเฉพาะ matrix metalloproteinases (MMPs) ที่ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นและเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ การทำงานของ A1AT จะอาศัยโครงสร้างที่เหมาะสมเพื่อจับกับ protease ที่เป็นเป้าหมายของมัน แต่เนื่องจาก A1AT มีโครงสร้างบางส่วนที่ง่ายต่อการถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระที่หลังจากเซลล์อักเสบ ดังนั้นจึงส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งโครงสร้างและหน้าที่ สาเหตุสำคัญที่ทำให้ A1AT สูญเสียหน้าที่คือการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของกรดอะมิโน methionine ที่ตำแหน่ง 351 และ 358 ซึ่งเป็น active site ซึ่งทำให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูป methionine sulfoxide (oxidized A1AT; ox-A1AT) และจะเกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคหลายชนิด ได้มีการศึกษาวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิค proteomics และ immunoprecipitation/ western blot พบการเกิดปฏิกิริยา carbonylation ของ A1AT สูงอย่างมีนัยสำคัญในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ เนื่องจากความเสียหายที่เกิดจากภาวะ oxidative/nitrative stress เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน A1AT และ ox-A1AT ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี immunohistochemistry และตรวจวัดระดับ ox-A1AT ในซีรัมด้วยเทคนิค ELISA ผลการศึกษาการแสดงออกของ A1AT และ ox-A1AT ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีพบว่าทั้งสองโปรตีนมีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ ox-A1AT สูงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ( $P = 0.031$ ) เมื่อศึกษาตำแหน่งที่แสดงออกร่วมกันของ A1AT และ ox-A1AT ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค double-immunofluorescence แสดงให้เห็นว่ามี A1AT บางตัวที่ถูกออกซิไดซ์แล้วอยู่ในรูป ox-A1AT อีกทั้งยังพบว่าระดับการแสดงออกของ ox-A1AT ขึ้นอยู่กับระดับของ A1AT ด้วยอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) นอกจากนี้ได้มีการตรวจวัดระดับ ox-A1AT ในซีรัมซึ่งพบว่ามีระดับสูงในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับรุนแรง, ผู้ป่วยที่มีภาวะ fibrosis รอบท่อน้ำดีรุนแรง (APF) และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อเทียบกับคนปกติ ( $P < 0.001$ ) เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์หา odd ratio (OR) พบว่าผู้ที่มีระดับ ox-A1AT สูงมีอาจความเสี่ยงในการมีภาวะ fibrosis รอบท่อน้ำดีรุนแรง (advanced periductal fibrosis) และมะเร็งท่อน้ำดี ( $p < 0.001$ ; OR = 140.52 and 22.03, ตามลำดับ) ในคนที่มีภาวะ fibrosis รอบท่อน้ำดีรุนแรง อาจนำไปสู่โรคตับและเพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ox-A1AT เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการทำนายความเสี่ยงของโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และ ox-A1AT ยังควบคุมการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 โดยการยับยั้ง proteolytic activity ของเอนไซม์เหล่านี้ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการก้าวหน้าของมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย

## Abstract

Alpha-1 antitrypsin (A1AT) is a secretory glycoprotein produced mainly in the liver, and a typical serine proteinase inhibitor, which prevents tissue damage by inactivating proteinases. Since A1AT has a wide spectrum of anti-protease activity inhibiting several serine proteases. This is produced by various cancer cells for digestion of the extracellular matrix together with matrix metalloproteinases (MMPs) for the induction of tumor invasion and angiogenesis. A1AT functions depend on its conformation, which fits the targeted protease. Since A1AT has some moieties that are easily to be oxidized by free radicals released from inflammatory cells, resulting in protein conformational change and dysfunction. The major cause of oxidation and subsequent activity loss is the oxidization of methionine 351 and 358 residues, which are located at its active center, to methionine sulfoxide (oxidized A1AT; ox-A1AT) leading to many diseases. Our previous study, using proteomic analysis followed by immunoprecipitation and western blot analyses of individual samples confirmed significantly greater carbonylation of A1AT in tumor tissues of cholangiocarcinoma (CCA) than in normal tissues. The oxidative modification of this protein was significantly associated with poor prognosis. The production of ox-A1AT is present in human serum for indicating oxidative stress in many diseases. Oxidative/nitrative damage is one of the major contributors in opisthorchiasis-driven cholangiocarcinogenesis, therefore we aimed to determine A1AT and ox-A1AT expression in cholangiocarcinoma (CCA) tissue using immunohistochemical staining and to investigate serum ox-A1AT level by ELISA. Results revealed that A1AT and ox-A1AT were highly expressed in tumor cells of CCA patients and higher ox-A1AT expression group has a significantly correlated with poor prognosis ( $P = 0.031$ ). However, the co-localization of A1AT and ox-A1AT was observed in human CCA tissues by double-immunofluorescence. It can be seen that some A1AT was oxidized and appeared as ox-A1AT form and we also found that ox-A1AT level depends on amount of A1AT with statistical significance ( $P < 0.001$ ). Moreover the serum levels of ox-A1AT were significantly higher in heavy *O. viverrini* infection, advanced periductal fibrosis (APF) and CCA groups when compared with healthy controls ( $P < 0.001$ ). Interestingly, odd ratio (OR) analysis demonstrated that high ox-A1AT level in healthy was predictable for APF and CCA risks ( $p < 0.001$ ; OR = 140.52 and 22.03, respectively). In humans, APF may lead to hepatobiliary diseases and an increased risk of CCA development. The present results indicate that oxidized A1AT is a potential biomarker to predict the risk of opisthorchiasis associated CCA and regulates MMP-2 and MMP-9 by inhibiting the proteolytic activity of these enzymes, which could be involved in the progression of CCA.

**Keywords:** *Opisthorchis viverrini*, oxidized alpha-1 antitrypsin, risk marker, cholangiocarcinoma, periductal fibrosis

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “บทบาทของออกซิไดส์แอลฟา-1 แอนติทริปซินในการเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพในโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี” เป็นโครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการกลไกการก่อมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุลเพื่อการป้องกันด้วยเคมีอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งได้รับทุนวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นประจำปีงบประมาณ 2555 (โครงการวิจัยเลขที่ 550404) คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ที่ให้การสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อาทิเช่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะแพทยศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น และโครงการนี้จะไม่สามารถประสบความสำเร็จลงได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนด้านทุนการศึกษาจากโครงการทุนการศึกษามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มอบทุนการศึกษาให้ น.ส.วาสนา จำนงการ นักศึกษาปริญญาระดับปริญญาโท สาขาชีวเคมีทางการแพทย์และชีววิทยาระดับโมเลกุล จนสามารถสำเร็จการศึกษาได้ในปีการศึกษา 2555 และยังสามารถตีพิมพ์ผลงานจากวิทยานิพนธ์นี้ในวารสาร Tumor Biology, Impact factor 2011= 2.143 (Jamnongkan W, Techasen A, Thanan R, Duengai K, Sithithaworn P, Mairiang E, Loilome W, Namwat N, Pairojkul C, Yongvanit P. Oxidized alpha-1 antitrypsin as a predictive risk marker of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Tum Biol. 2012;34:695-704.) องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้สามารถพิสูจน์ว่าระดับ oxidized alpha-1 antitrypsin ซึ่เป็นตัวชี้วัดที่มีศักยภาพตัวหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในชุมชนที่มีความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

พวงรัตน์ ยวงณิษฐ์

มิถุนายน 2556

## TABLE OF CONTENT

|                                                                                                     | Page |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>CHAPTER I</b>                                                                                    |      |
| INTRODUCTION & LITERATURE REVIEW                                                                    | 1    |
| 1.1 Background and rationale of this study                                                          | 1    |
| 1.2 Objectives                                                                                      | 2    |
| 1.3 Hypothesis                                                                                      | 2    |
| <b>CHAPTER II</b>                                                                                   |      |
| MATERIALS AND METHODS                                                                               | 4    |
| 2.1 Human CCA tissue and serum specimens                                                            | 4    |
| 2.2 Immunohistochemical detection of A1AT and ox-A1AT in CCA tissue samples                         | 5    |
| 2.3 Double-immunofluorescence assay for A1AT and ox-A1AT                                            | 5    |
| 2.4 ELISA methods for ox-A1AT detection                                                             | 6    |
| 2.5 Statistical analysis                                                                            | 6    |
| <b>CHAPTER III</b>                                                                                  |      |
| RESULTS                                                                                             | 7    |
| 3.1 Immunohistochemical analysis of A1AT and ox-A1AT in human CCA tissues                           | 7    |
| 3.2 Co-localization of ox-A1AT and A1AT in CCA tissues                                              | 8    |
| 3.3 Detection of ox-A1AT by sandwich ELISA in serum                                                 | 8    |
| 3.4 Detection of serum ox-A1AT by indirect ELISA                                                    | 9    |
| 3.5 Predictive values of serum ox-A1AT level measured by indirect ELISA for<br>diagnosis of CCA     | 12   |
| 3.6 Predictive risk values (OR) of ox-A1AT levels for advanced periductal fibrosis<br>(APF) and CCA | 12   |
| 3.7 Correlation between A1AT and ox-A1AT in serum of CCA patients                                   | 13   |
| <b>CHAPTER IV</b>                                                                                   |      |
| DISCUSSION & CONCLUSION                                                                             |      |
| 4.1 Discussion                                                                                      | 14   |
| 4.2 Conclusion                                                                                      | 16   |
| <b>CHAPTER V</b>                                                                                    |      |
| REFERENCES                                                                                          | 17   |
| Publication                                                                                         | 20   |
| ภาคผนวก                                                                                             | 21   |