



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ชนิดและคุณลักษณะของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้
**Identification/characterization of cholangiocarcinoma associated macrophages
and its applications**

โดย รศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ และคณะ

ตุลาคม พ.ศ. 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ชนิดและคุณลักษณะของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1. รศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ | ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. รศ.นพ.วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์ | ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. รศ.ดร.ชาญวิทย์ สีสายวัฒน์ | ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 4. รศ.ดร.วีรพงศ์ ลุติตานนท์ | ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 5. รศ.ดร.ชัยศิริ วงศ์คำ | ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ ปีงบประมาณ 2549 ทำให้โครงการนี้สามารถสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ที่สนับสนุนทุนผู้ช่วยวิจัยให้แก่ รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ และนางสาวชุตินา ทรัพย์อิมเอิบ และ Prof. Michael S McGrath, Pathology and Medicine UCSF, San Francisco, USA ที่ร่วมเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของนางสาวชุตินา ทรัพย์อิมเอิบ ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยด้านสถานที่ ครุภัณฑ์และอุปกรณ์การวิจัย และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีที่สนับสนุนตัวอย่างชีวภาพของอาสาสมัครในโครงการ

รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ และคณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG4980015

ชื่อโครงการ: ชนิดและคุณลักษณะของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ และคณะ

สถาบัน: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail address: sopit@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2550-2552 (3 ปี)

การศึกษานี้เป็น prospective study เพื่อศึกษาบทบาทของเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ในการสนับสนุนภาวะมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผลการวิเคราะห์ปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือด พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี มีปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ที่พบสูงในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตัดก้อนมะเร็งออก ($P < 0.05$) แสดงว่าปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเป็น activated monocytes และสัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีชนิด non-papillary

การศึกษานี้ยังพิสูจน์ให้เห็นว่า monocytes ในเลือดผู้ป่วยสัมพันธ์กับ tissue macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็ง โดยมีบทบาทสำคัญในการก่อหนูนการดำรงชีวิตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การติดตาม activated tissue macrophage โดยใช้ Mac387 เป็นตัวติดตาม พบกลุ่มเซลล์ดังกล่าวหนาแน่นบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อปกติและบริเวณรอบเส้นเลือดในเนื้อเยื่อตับ และมีการแสดงออกของ MMP9 ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในก้อนมะเร็ง นอกจากนี้ผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์กลุ่ม Mac387 ที่มีการแสดงออกของ MMP9 จำนวนมากมีระยะรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีกลุ่มเซลล์ดังกล่าวในปริมาณต่ำอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษากการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวโดยใช้ microarray พบว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีและของกลุ่มคนปกติ โดยกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็งและภาวะอักเสบ ในขณะที่กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของกลุ่มคนปกติเกี่ยวข้องกับภาวะภูมิคุ้มกัน การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกสูงในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่ามีแบบแผนการแสดงออกทั้งที่เป็นปัจเจกบุคคลและที่สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ ได้ทำการเลือกกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ proteolytic activity 3 ยีน และคำนวณเป็นค่า risk score พบว่าสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตาม risk score ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ risk score สูงมีระยะรอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ risk score ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลเบื้องต้นนี้ให้ข้อมูลใหม่ที่น่าสนใจและบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการใช้แบบแผนการแสดงออกของเม็ดเลือดขาวไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยหรือพัฒนาแนวทางการรักษาต่อไป

คำหลัก: monocyte, tissue associated macrophage, blood transcriptome

Abstract

Project code: BRG4980015

Project title: Identification/characterization of cholangiocarcinoma associated macrophages and its applications

Investigators: Associate Professor Sopit Wongkham, et al

Affiliation: Faculty of Medicine, Khon Kaen University

E-mail address: sopit@kku.ac.th

Project period: 2007-2009 (3 years)

This prospective study was aimed to investigate the supportive role of monocytes on cancer pathogenesis in cholangiocarcinoma patients. The level of CD14⁺/CD16⁺ monocytes was higher in Cholangiocarcinoma than benign biliary disease patients and healthy persons ($P < 0.05$). The level of elevated CD14⁺/CD16⁺ monocytes found in cholangiocarcinoma patients was decreased after tumor removal, indicating the association of these monocytes with tumor tissues. In addition, these typical monocytes exhibited activated-monocyte phenotypes and were associated to non-papillary type Cholangiocarcinoma.

Peripheral blood monocytes were related with tissue macrophages in tumor tissues. It has been documented that these tissue macrophages supported the viability and invasiveness of tumor. The immunochemistry indicated that macrophages with Mac387 positive cells were found densely at the tumor edge and perivascular area. Moreover, these Mac387 positive cells expressed MMP9 which is necessary for extra-cellular matrix resolving. Patients with high Mac387 and high MMP9 positive cells have significantly shorter survival than those who has low Mac387 positive cells.

The microarray-expression profile of peripheral blood cells indicated the different expression patterns between blood cells from patients with Cholangiocarcinoma and benign biliary diseased as well as healthy persons. The expression profile of blood cells from Cholangiocarcinoma patients exhibited cancer and inflammation functions whereas those of healthy persons were associated with immuno-reactivity. The expression profile of blood cells from Cholangiocarcinoma patients can be categorized into different groups or as individual. Three genes with proteolytic activity were validated and calculated as "risk score". Cholangiocarcinoma patients were divided according to the "risk score" into 2 groups: high and low risk score. Survival analysis indicated that patients with high "risk score" had significantly shorter survival than those with low "risk score". This preliminary result suggested the potential of using blood transcriptome as surrogate marker for Cholangiocarcinoma.

Key words: monocyte, tissue associated macrophage, blood transcriptome

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญ	iv
สารบัญรูป	v
สารบัญตาราง	vi
Executive Summary	1
1. ความสำคัญและแนวทางวิจัย	2
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
3. แผนการทดลอง	3
4. ผลการวิจัย	
4.1 ศึกษา CD14/16 monocyte ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	4
4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนใน peripheral blood cells ด้วย cDNA microarray	12
4.3 การแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวใช้พยากรณ์ในระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	19
4.4 เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งสัมพันธ์กับระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	24
5. วิเคราะห์และสรุป	28
6. ผลการตีพิมพ์เผยแพร่ (รายละเอียดในภาคผนวก)	
6.1 การวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่อยู่ในฐาน ISI จำนวน 2 เรื่อง และอยู่ระหว่างส่งตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง	29
6.2 Poster presentation	29
6.3 Oral presentation	30
6.4 จำนวนและรายละเอียดที่ได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร	30
ภาคผนวก	38

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ CD14/16 และ HLA-DR monocytes โดย FACS	4
2 เปรียบเทียบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ในการย้อมเซลล์	5
3 ความสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์ monocytes และ CD14 ⁺ /16 ⁺ monocyte เมื่อวิเคราะห์ผลในวันเดียวกันเทียบกับการวิเคราะห์ผลในวันรุ่งขึ้น	6
4 ผลการวิเคราะห์ monocytes CD14/16/HLA-DR เมื่อใช้ isotype control-PE และ PE-Cy5 โดยใช้การ monocytes gate จากค่า SSC/FSC (Coulter Epic XL-MCL, Backman Coulter)	7
5 ผลการวิเคราะห์ monocytes CD14/16/HLA-DR เมื่อใช้ isotype control-FITC และ -PE(FC500, Backman)	7
6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ monocytes CD14/16/HLA-DR ที่วิเคราะห์จากเครื่อง coulter Epic XL-MCL, Backman coulter กับผลที่ได้จากเครื่อง FC500, Backman	7
7 เปรียบเทียบปริมาณ CD14/16 monocyte ในเลือดของอาสาสมัครแต่ละรายในกลุ่มต่าง ๆ	8
8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ CD14 ⁺ /16 ⁺ monocytes และ CD14 ⁺ /16 ⁺⁺ monocytes ในอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม	9
9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ HLADR ใน CD14 ⁺ /16 ⁺ monocytes ของอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม	9
10 เปรียบเทียบปริมาณ CD14 ⁺ /16 ⁺ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ก่อนและหลังผ่าตัดในผู้ป่วยรายเดียวกัน	9
11 เปรียบเทียบระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี CD14 ⁺ /16 ⁺ monocyte ในเลือดสูง และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี CD14 ⁺ /16 ⁺ monocyte ในเลือดต่ำ	10
12 Principal Component Analysis (PCA) แสดงว่า transcriptome ของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากกลุ่มอื่นในเม็ดเลือดขาวของคนปกติ	13
13 Hierarchical clustering analysis แสดงระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเม็ดเลือดขาวของคนปกติ	13
14 ความสัมพันธ์ของยีนในเม็ดเลือดขาวของมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis	18
15 เปรียบเทียบระดับ mRNA ในตัวอย่างเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี realtime PCR กับข้อมูลที่ได้จาก microarray	19
16 แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	21
17 ก แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic สูงแต่ inflammation ต่ำในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	22
17 ข แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic ต่ำแต่ inflammation สูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	23
18 แผนภาพเปรียบเทียบระยะรอดชีพผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม Proteolytic และ inflammation ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	24
19 Immunohistochemistry ของ Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	25
20 Double immune-fluorescent staining ของ Mac387 และ MMP9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี	25
21 กราฟเปรียบเทียบระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามปริมาณการพบเซลล์ Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็ง	26

สารบัญตาราง

<u>ตารางที่</u>	<u>หน้า</u>
1	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ CD14/16 เมื่อย้อมเซลล์และวิเคราะห์ภายในวันเดียว (within day) กับการวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้น (overnight)
2	เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครแต่ละกลุ่มในการศึกษา
3	ค่าเฉลี่ยปริมาณ % CD14 ⁺ /16 ⁺ monocytes ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม
4	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ CD14 ⁺ /16 ⁺ monocytes ในเลือดกับคุณลักษณะของมะเร็งท่อน้ำดี
5	กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ
6	กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกต่ำในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ
7	การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าคนปกติตามบทบาทหน้าที่
8	ผลการวิเคราะห์บทบาทของเม็ดเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis
9	ความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ Mac387 กับพยาธิวิทยาคลินิกของผู้ป่วย

Executive Summary

Tissue macrophage เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ โดยเฉพาะภาวะมะเร็ง การศึกษาในมะเร็งหลายชนิดแสดงว่า tissue macrophage ทำหน้าที่สนับสนุนการเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็ง โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาบทบาทของ tissue macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ในเลือดซึ่งมีหลักฐานแสดงว่าเป็นเซลล์ตัวอ่อนของ tissue macrophage นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยในผู้ป่วยโรคต่าง ๆ แสดงว่าในเลือดผู้ป่วยมี monocyte กลุ่มใหม่ ($CD14^+/CD16^+$ monocytes) ที่มีการแสดงออกทั้ง CD14 (marker ของ monocyte) และ CD16 (marker ของ tissue macrophage) และแบบแผนการแสดงออกของเซลล์กลุ่มนี้มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวตามชนิดของโรค การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจวัดปริมาณและศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยมีสมมุติฐานว่า เซลล์ $CD14^+/CD16^+$ monocytes และเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีแบบแผนการแสดงออกเฉพาะตัวที่สัมพันธ์กับภาวะโรคของผู้ป่วย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัย-พยากรณ์โรคหรือพัฒนาแนวทางการรักษาต่อไป

การศึกษานี้เป็น prospective study ผลการวิเคราะห์ปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 31 ราย กลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี 23 ราย และกลุ่มคนปกติ 47 ราย พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี มีปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ที่พบสูงในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตัดก้อนมะเร็งออก ($P < 0.05$) แสดงว่าปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็ง นอกจากนี้ปริมาณ HLA-DR ซึ่งแสดงถึงภาวะ activated monocytes ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เช่นกัน การศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงว่า $CD14^+/CD16^+$ monocytes ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและมีความสัมพันธ์กับภาวะการเป็นมะเร็ง โดยพบว่าปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิด non-papillary กับ papillary อย่างมีนัยสำคัญ

เพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่าง monocytes ในเลือดผู้ป่วยกับ tissue macrophage ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการก่อหนูนการดำรงชีวิตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้ทำการติดตาม activated tissue macrophage ที่แปลงสภาพจากเม็ดเลือดกลุ่ม monocytes โดยใช้ Mac387 เป็นตัวติดตาม พบกลุ่มเซลล์ดังกล่าวหนาแน่นบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อปกติและบริเวณรอบเส้นเลือดในเนื้อเยื่อตับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีการแสดงออกของ MMP9 ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์กลุ่ม Mac387 ที่มีการแสดงออกของ MMP9 จำนวนมากมีระยะรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีกลุ่มเซลล์ดังกล่าวในปริมาณต่ำ ผลการวิจัยเหล่านี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า activated tissue macrophage ที่แปลงสภาพจาก monocytes แสดงบทบาทเป็นเซลล์ที่ก่อหนูนการดำรงชีวิตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

การศึกษากการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี และกลุ่มคนปกติ โดยใช้ microarray พบว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี และของกลุ่มคนปกติ โดยกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็งและภาวะ inflammation ในขณะที่กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของกลุ่มคนปกติเกี่ยวข้องกับ immune response การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เลือกมาศึกษาจำนวน 11 ยีนโดยวิธี real time PCR ให้ผลสอดคล้องกับผลของ microarray การศึกษาทั้ง 11 ชนิดในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 35 ราย และคนปกติ 21 ราย และวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนทั้ง 11 ชนิดในเม็ดเลือดขาวเป็นรายบุคคล พบว่ามีแบบแผนการแสดงออกทั้งที่เป็นปัจเจกบุคคลและที่สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ และเมื่อเลือกกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ proteolytic activity มาจัดกลุ่มและสร้างสมการตามความเชื่อมโยงตามหน้าที่ของยีนเหล่านี้เป็น risk score แล้ว พบว่าสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตาม risk

score ได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ risk score สูงและกลุ่มที่มีการแสดงออกของ risk score ต่ำ โดยผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ risk score สูงมีระยะรอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ risk score ต่ำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลเบื้องต้นนี้ให้ข้อมูลใหม่ที่น่าสนใจและบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการใช้แบบแผนการแสดงออกของเม็ดเลือดขาวไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยหรือพัฒนาแนวทางการรักษาต่อไป

ผลการวิจัยนี้ได้เสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติ 7 เรื่อง ระดับชาติ 1 เรื่อง และตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว 3 เรื่อง ตีพิมพ์แล้ว 2 เรื่อง อยู่ในระหว่างส่งตีพิมพ์อีกหนึ่งเรื่อง นอกจากนี้โครงการนี้ยังได้สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ คือ นางสาว ชุติมา ทรัพย์อ้อมเอิบ ซึ่งสำเร็จการศึกษาแล้วในปีการศึกษา 2552

โครงการ ชนิดและคุณลักษณะของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้
Identification/characterization of cholangiocarcinoma associated macrophages
and its applications

1. ความสำคัญและแนวทางวิจัย

ก้อนมะเร็งประกอบด้วยเซลล์มะเร็งและเซลล์อื่น ๆ ที่ประกอบกันเป็นภาวะแวดล้อมที่สนับสนุนการเกิด การเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เซลล์เหล่านี้ได้แก่ เซลล์ไขมัน ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในมะเร็งหลาย ๆ ชนิดเป็นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้มีพฤติกรรมและการแสดงออกในระดับโมเลกุลตาม cytokines ที่หลั่งจากเซลล์มะเร็งและองค์ประกอบของเซลล์ในก้อนมะเร็งนั้น การศึกษาทั้งในระดับปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองแสดงว่า เซลล์มะเร็งสามารถกำกับและเหนี่ยวนำให้แมคโครฟาจสร้างและหลั่งสารต่าง ๆ ที่สนับสนุนการอยู่รอด การพัฒนาและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ด้วยเหตุนี้จึงพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแมคโครฟาจในเนื้อเยื่อมะเร็ง (tumor associated macrophages, TAMs) กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งแทบทุกชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี

แม้ว่านักวิทยาศาสตร์จะทราบมานานแล้วว่า เซลล์แมคโครฟาจที่พบในก้อนมะเร็งมีความหลากหลาย หลาย แต่ นักวิทยาศาสตร์เพิ่งตระหนักว่าเซลล์ monocyte ในเลือดซึ่งเป็นต้นกำเนิดของเซลล์แมคโครฟาจที่พบในก้อนมะเร็งก็มีความหลากหลายเช่นกัน การวิเคราะห์โมเลกุลบนผิวเซลล์โดยใช้ monoclonal antibody และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry ทำให้นักวิทยาศาสตร์พบเซลล์ monocyte อีกกลุ่มหนึ่งที่มีการแสดงออกของ CD14⁺/CD16⁺ และมีข้อบ่งชี้ว่า เซลล์เหล่านี้เป็นกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นแมคโครฟาจที่พบในเนื้อเยื่อ (circulating/activated/tissue macrophages) มีรายงานการตรวจพบเซลล์กลุ่ม CD14⁺/CD16⁺ monocytes สูงขึ้นมากกว่าปกติในเลือดของผู้ป่วยโรคต่าง ๆ รวมทั้งผู้ป่วยโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ของระดับ CD14⁺/CD16⁺ monocytes ในเลือดกับภาวะความรุนแรงของโรคนั้น ๆ เช่น HIV-associated dementia และ sporadic amyotrophic lateral sclerosis

รายงานวิจัยจัดทำขึ้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานที่เชื่อว่า เซลล์กลุ่ม circulating/activated/tissue macrophages หรือ CD14⁺/CD16⁺ monocytes ที่พบในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกที่จำเพาะต่อมะเร็งและมีความแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่พบในคนปกติและ/หรือผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี ความรู้ที่ได้จะทำให้เกิดความเข้าใจในบทบาทของเซลล์กลุ่มนี้ในกระบวนการก่อและแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้การแสดงออกที่จำเพาะที่พบในเซลล์กลุ่มดังกล่าวอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะและพยาธิสภาพของมะเร็งในผู้ป่วยได้

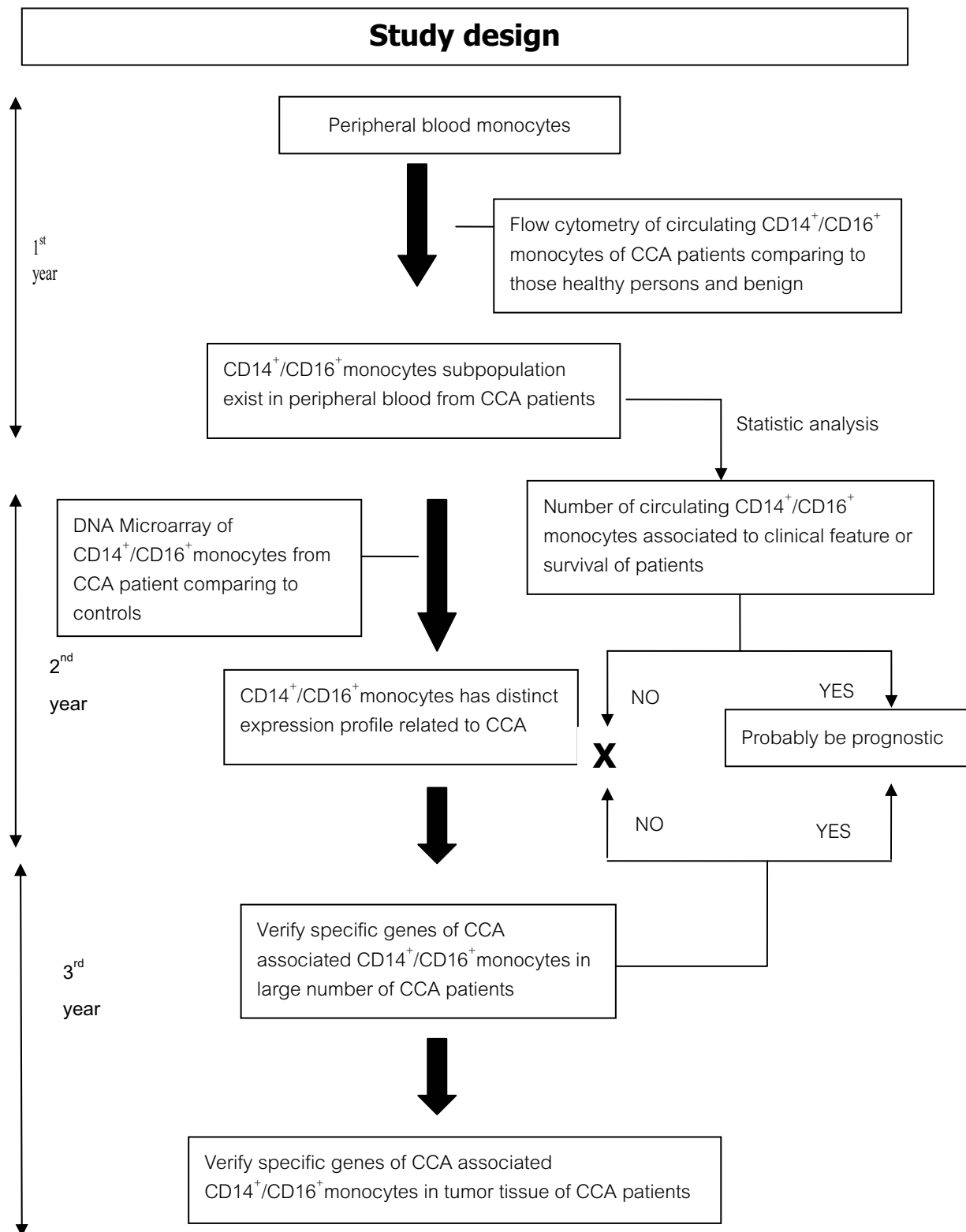
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อพิสูจน์ว่า

- 2.1 มีเซลล์กลุ่ม CD14⁺/CD16⁺ monocytes ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์กลุ่มนี้สัมพันธ์กับภาวะโรคและพยาธิสภาพของผู้ป่วย
- 2.2 circulating/activated/tissue macrophages ที่พบในเนื้อเยื่อผู้ป่วยเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของมะเร็ง
- 2.3 การแสดงออกของเซลล์กลุ่ม CD14⁺/CD16⁺ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างจากคนปกติและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพในการวินิจฉัยหรือพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

3. แผนการทดลอง

ได้แบ่งการศึกษานี้เป็น 3 ขั้นตอนตามแผนภูมิ



โครงการนี้ได้รับการรับรองการดำเนินการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 เลขที่ HE471214

4. ผลการวิจัย

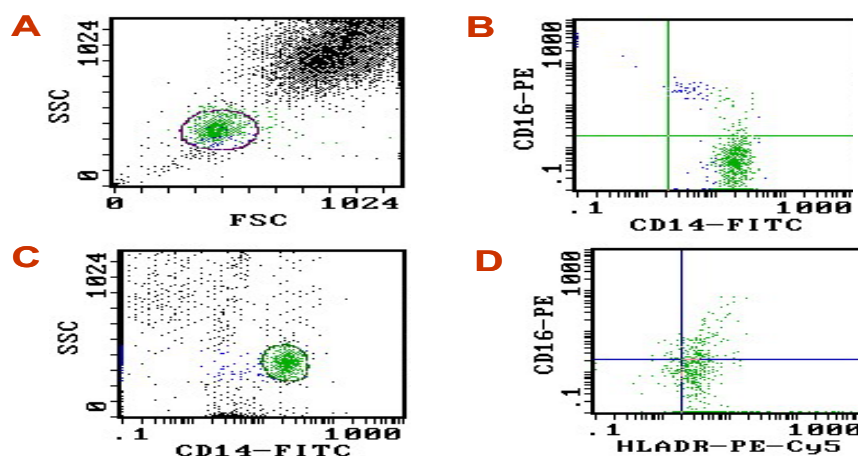
4.1 ศึกษา CD14/16 monocyte ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

4.1.1 การเตรียมตัวอย่างและปรับมาตรฐานการทดสอบ

การเตรียมเม็ดเลือดเพื่อศึกษา CD14⁺/CD16⁺ monocytes เนื่องจากการเตรียมเลือดเพื่อศึกษา CD14/16 monocyte สามารถทำได้ 2 วิธี คือการแยก monocytes จากเลือดก่อนวิเคราะห์ หรือใช้ whole blood จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมเซลล์ทั้ง 2 วิธี พบว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ whole blood ง่าย สะดวกกว่าและไม่มีปัญหาเรื่องเซลล์สูญเสียระหว่างการเตรียม การวิจัยนี้จึงใช้ whole blood เป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไป

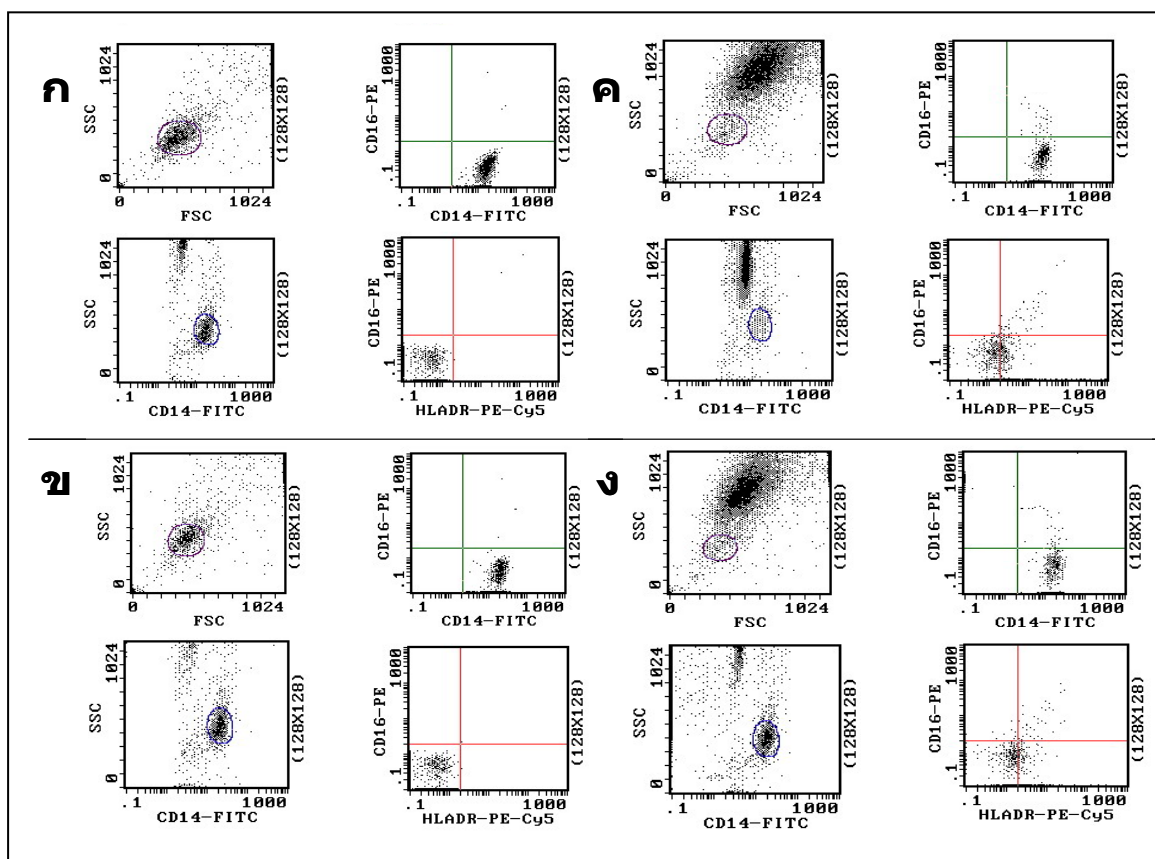
เนื่องจากความสมบูรณ์ในการทำลายเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดมีผลต่อการวิเคราะห์ CD14⁺/CD16⁺ monocytes โดยวิธี Flow cytometry จากการเปรียบเทียบการทำลายเม็ดเลือดแดงด้วย lysis solution พบว่าวิธีที่ให้ผลดีที่สุด คือ การใช้ lysis solution 2 ml ต่อ heparinized blood 0.1 ml ในเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C และล้างด้วย lysis solution ซ้ำอีกครั้ง จึงใช้ protocol นี้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา CD14⁺/16⁺ monocyte โดยวิธี Flow cytometry ต่อไป

การวิจัยนี้ใช้เครื่อง Flow cytometer: Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter) ในการวิเคราะห์ โดยการติดแอนติบอดีต่อแอนติเจน 3 ที่มีสี fluorescent ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดบนผิวเซลล์ monocytes คือ Anti-CD14-FITC, Anti-CD16-RPE และ Anti-HLA-DR-RPECy5 และใช้ isotype IgG1-RPE และ IgG2-RPECy5 เป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีและสีที่ใช้ติดตาม สามารถปรับตัวแปรให้อ่านค่าของแอนติบอดีแต่ละชนิดได้ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ CD14/16 และ HLA-DR monocytes โดย FACS

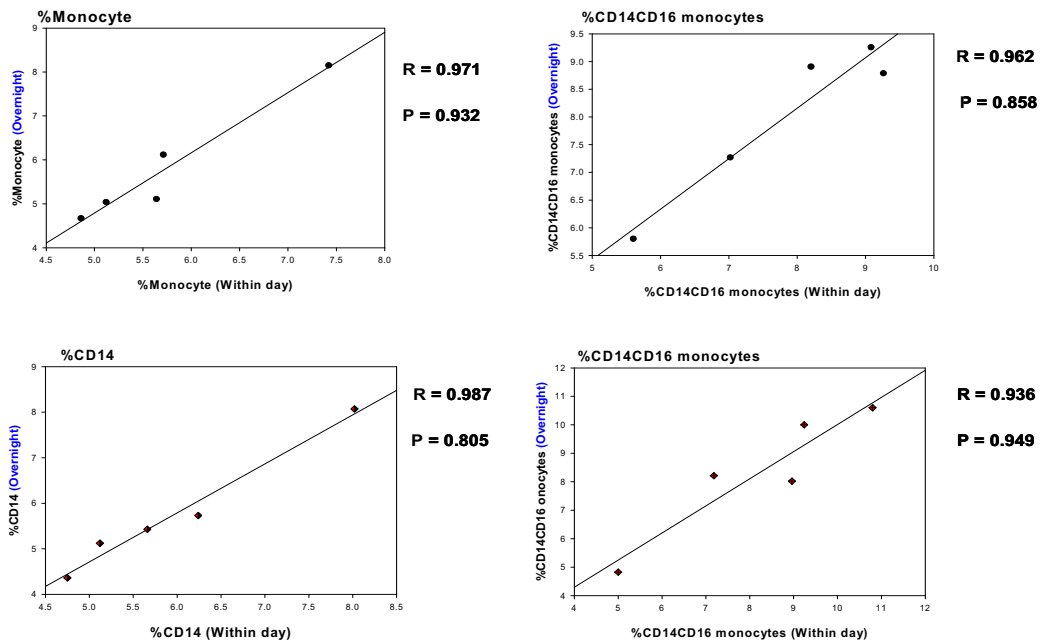
เปรียบเทียบการใช้ antibody ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การใช้ antibody ที่มีความเข้มข้นต่ำให้ผลดีกว่าสามารถลด false positive และ background ได้ (รูปที่ 2) จึงเลือกใช้ antibody ที่ความเข้มข้นต่ำในการย้อมเซลล์ลดความแปรปรวนของการทดสอบ และเนื่องจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้จากห้องผ่าตัดในแต่ละวันไม่แน่นอน แต่การย้อมเซลล์และวิเคราะห์ ต้องใช้เลือดสดและทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ซึ่งบางครั้งได้รับเลือดในเวลาเย็นทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ในวันนั้นได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบว่าการเตรียมตัวอย่าง-ย้อมเซลล์และวิเคราะห์โดย Flow cytometer ทันทีกับการเก็บเซลล์ที่ย้อมไว้แล้วและวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้นให้ผลแตกต่างกันหรือไม่จากการเปรียบเทียบตัวอย่างเลือด 5 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 3 ดังนั้นเลือดผู้ป่วยที่ทำการย้อมไว้สามารถนำมาวิเคราะห์ผล FACS ในวันรุ่งขึ้นได้



รูปที่ 2 เปรียบเทียบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ในการย้อมเซลล์
 ก และ ค เมื่อใช้ความเข้มข้นสูง, ข และ ง เมื่อใช้ความเข้มข้น 1:4 ของ ก และ ค;
 ก และข เมื่อใช้ isotype control, ค และ ง เมื่อใช้แอนติบอดีติดสี fluorescence

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ CD14/16 เมื่อย้อมเซลล์และวิเคราะห์ภายในวันเดียว (within day) กับ
 วิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้น (overnight)

	FSC/SSC				SSC/CD14			
	% M within D	% M overnight	CD14_16 within D	CD14_16 Overnight	%CD14 within D	%CD14 Overnight	CD14_16 Within D	CD14_16 Overnight
H36	5.64	5.11	9.26	8.79	5.66	5.43	9.24	10
H37	4.86	4.67	9.08	9.26	4.75	4.36	7.18	8.21
H38	5.12	5.04	5.6	5.8	5.12	5.12	5	4.82
H39	7.42	8.15	8.2	8.91	8.02	8.07	10.8	10.6
H40	5.71	6.12	7.02	7.27	6.24	5.73	8.96	8.02
Mean	5.75	5.818	7.832	8.006	5.958	5.742	8.236	8.33
SD	0.99	1.41	1.53	1.45	1.28	1.39	2.21	2.26



Linear regression & Student t-test (p < 0.05)

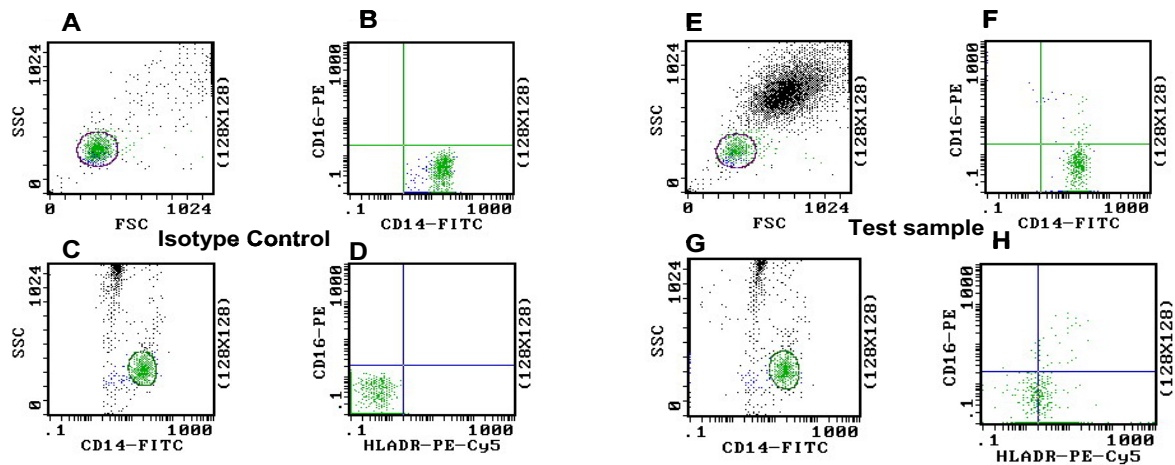
รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์ monocytes และ CD14⁺/16⁺ monocyte เมื่อวิเคราะห์ผลในวันเดียวกันเทียบกับการวิเคราะห์ผลในวันรุ่งขึ้น

เนื่องจากเครื่อง Flow cytometer: Coulter Epic XL-MCL (Beckman Coulter) ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์เมื่อใช้ isotype-FITC และ RPE พร้อมกัน ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้แก้ปัญหาโดยใช้ การ gate monocytes จากค่า SSC/FSC และติดตามค่า CD14-FITC ในการแสดงค่า false positive ของ CD16 แต่เพื่อให้มั่นใจว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้จากวิธีนี้เป็นกลุ่ม CD14⁺/16⁺ monocytes จริง จึงได้เปรียบเทียบค่าการวิเคราะห์ CD14/16 โดยวิธีนี้จากเครื่อง Coulter Epic XL-MCL (Beckman Coulter) กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์จากเครื่อง FC500 (Beckman) ซึ่งสามารถใช้ isotype-FITC ร่วมกับ isotype IgG1-RE ได้ ผลการเปรียบเทียบพบว่า ค่า CD14/16 ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองเครื่องสอดคล้องกัน (รูปที่ 4-6) ดังนั้นการวิเคราะห์ isotype-FITC และ RPE พร้อมกันไม่ได้ด้วยเครื่อง Coulter Epic XL-MCL (Beckman Coulter) และการแก้ปัญหาโดยวิธีดังกล่าวให้ค่าที่ถูกต้องเชื่อถือได้

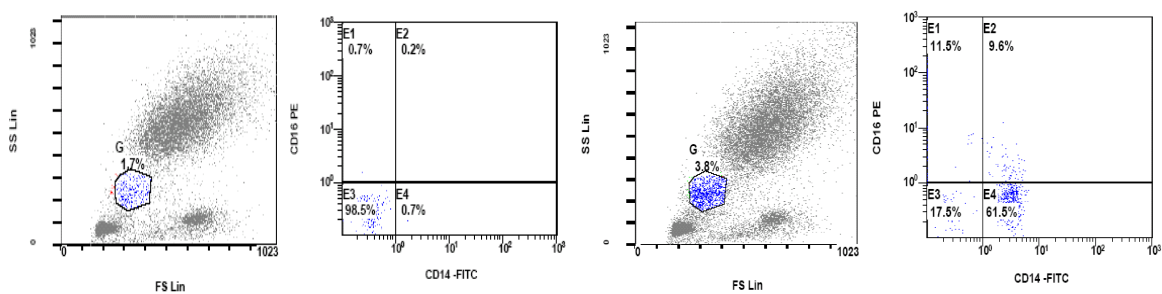
4.1.2 การรวบรวมอาสาสมัครในโครงการ

ในการศึกษานี้ต้องใช้เลือดจากอาสาสมัครที่เป็นคนปกติ ซึ่งได้จากกลุ่มคนปกติที่มารับการตรวจร่างกายที่คลินิกพิเศษ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จึงต้องทำการขอรับรองการศึกษาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เพิ่มเติม ซึ่งได้รับความเห็นชอบแล้วตามเลขที่ HE480312 และได้ศึกษาข้อมูลเพื่อวางแผนการคัดเลือกผู้ป่วยและคนปกติไว้เพื่อเลือกอาสาสมัคร

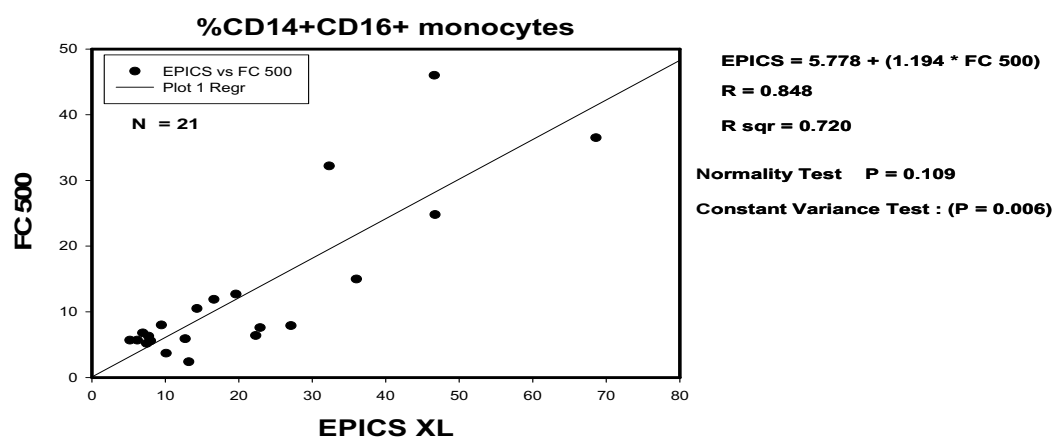
เนื่องจากการตรวจปริมาณ CD14/16/HLA-DR monocytes ในเลือดมีความจำเป็นต้องตรวจวัดภายใน 24 ชั่วโมง จึงต้องทำการเก็บเลือดตัวอย่างแบบ prospective study และกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมให้มีอายุเฉลี่ยและเพศในอัตราที่ไม่แตกต่างกัน และเกณฑ์เฉพาะกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ monocytes CD14/16/HLA-DR เมื่อใช้ isotype control-PE และ PE-Cy5 โดยใช้การ monocytes gate จากค่า SSC/FSC (Coulter Epic XL-MCL, Beckman Coulter)



รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ monocytes CD14/16/HLA-DR เมื่อใช้ isotype control-FITC และ -PE (FC500, Beckman)



รูปที่ 6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ monocytes CD14/16/HLA-DR ที่วิเคราะห์จากเครื่อง Coulter Epic XL-MCL, Beckman Coulter กับผลที่ได้จากเครื่อง FC500, Beckman

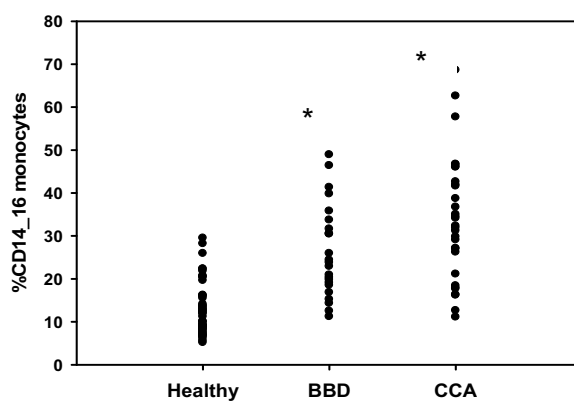
ตารางที่ 2 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครแต่ละกลุ่มในการศึกษา

กลุ่มอาสาสมัคร	จำนวน (ราย)	เกณฑ์คัดเข้า	เกณฑ์คัดออก
ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	31	ได้รับการผ่าตัดและผลชิ้นเนื้อแสดงว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี	ผู้ป่วยได้รับยาหรือการรักษาใดๆ ก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด
คนปกติ	47	ผลการตรวจร่างกายปกติ ผล complete blood count, blood sugar และ liver function test อยู่ในเกณฑ์ปกติ	
ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี	23	ได้รับการผ่าตัดและผลชิ้นเนื้อแสดงว่ามีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีและ <u>ไม่</u> เป็นมะเร็งท่อน้ำดี	ผู้ป่วยได้รับยาหรือการรักษาใดๆ ก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด

4.1.3 ผลการตรวจปริมาณ CD14/16 monocytes ในเลือด

คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การแสดงออกของ monocyte ที่ตรวจพบในเลือดมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคหรือภาวะของร่างกาย โดยการปรับเปลี่ยน monocyte ในเลือดให้ตอบสนองกับภาวะพยาธิสภาพ และสามารถติดตาม monocyte โดยติดตาม marker CD14 ซึ่งเป็น marker ของ monocyte และติดตาม marker CD16 ซึ่งเป็น marker ของ tissue macrophage คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าปริมาณของ monocyte กลุ่มนี้ (CD14⁺/16⁺ monocytes) จะมากขึ้นแตกต่างกันตามสภาพของร่างกาย

ผลตรวจปริมาณ CD14⁺/16⁺ monocytes ในเลือดโดยวิธี flow cytometer ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีมีปริมาณ monocytes ดังกล่าวสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 7 และตารางที่ 3



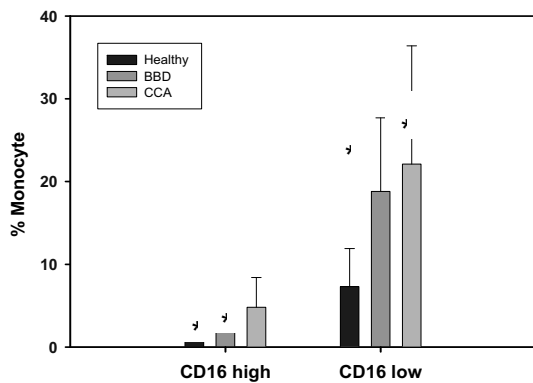
รูปที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณ CD14/16 monocyte ในเลือดของอาสาสมัครแต่ละรายในกลุ่มต่าง ๆ: Healthy = คนปกติ, BBD = ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี, CCA = ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณ % CD14⁺/16⁺ monocytes ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม

กลุ่มอาสาสมัคร	จำนวน (ราย)	% CD14/16 monocytes (mean \pm SD)
คนปกติ	47	13 \pm 6.2
ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี	23	26 \pm 10.7*
ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	31	33.7 \pm 6.2*

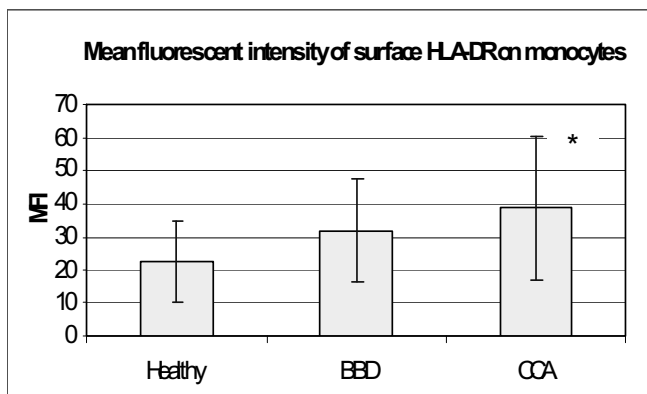
*แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ $P < 0.05$

เมื่อจำแนกชนิดของ CD14/16 monocytes ที่พบในอาสาสมัครแต่ละกลุ่มเป็นชนิดที่มี CD16 สูง ($CD14^+/16^{++}$) และชนิดที่มี CD16 ต่ำ ($CD14^+/16^+$) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีมีระดับ $CD14^+/16^{++}$ monocytes และ $CD14^+/16^+$ monocytes มากกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P < 0.05$)



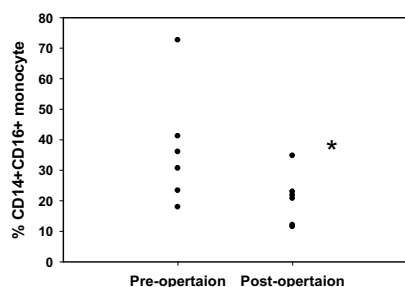
รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ $CD14^+/16^+$ monocytes และ $CD14^+/16^{++}$ monocytes ในอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม
*แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ $P < 0.05$

เพื่อให้ทราบว่า $CD14^+/16^+$ monocytes อยู่ในภาวะถูกกระตุ้น (activated monocytes) หรือไม่ จึงได้ติดตามปริมาณของ HLA-DR ซึ่งเป็น marker ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นใน $CD14^+/16^+$ monocytes ด้วย พบว่า $CD14^+/16^+$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีมีปริมาณ HLA-DR สูงกว่าเซลล์ในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 9) แสดงว่า $CD14^+/16^+$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีอยู่ในภาวะ activated มากกว่ากลุ่มควบคุม



รูปที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ HLA-DR ใน $CD14^+/16^+$ monocytes ของอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม Healthy = คนปกติ, BBD = ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี, CCA = ผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี
*แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ $P < 0.05$

เพื่อแสดงว่าปริมาณของ $CD14^+/16^+$ monocytes ที่ตรวจพบสูงในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับภาวะมะเร็ง จึงได้เปรียบเทียบปริมาณ $CD14^+/16^+$ monocytes ก่อนและหลังผ่าตัดในผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 6 ราย พบว่าปริมาณ $CD14^+/16^+$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยหลังผ่าตัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 10

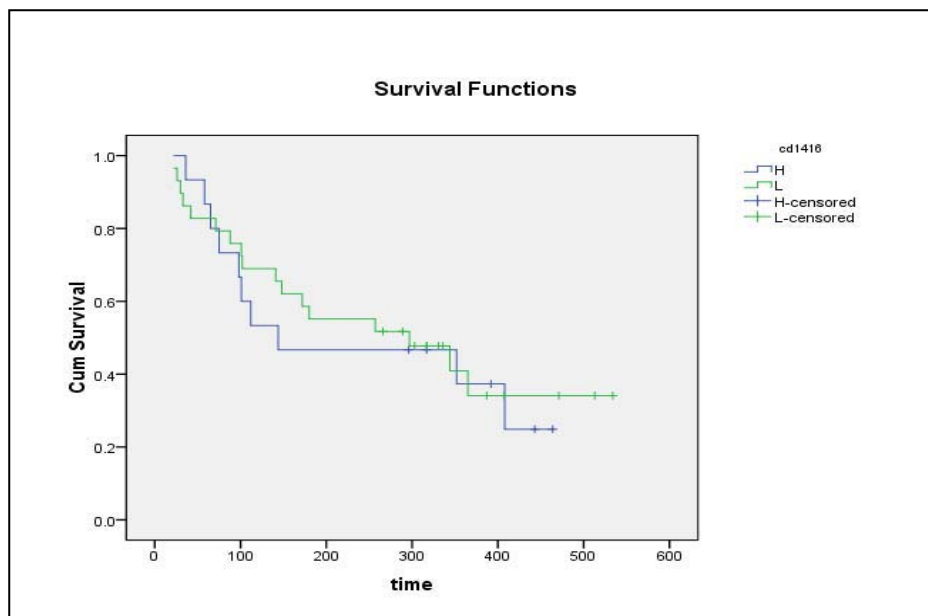


รูปที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณ $CD14^+/16^+$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี ก่อนและหลังผ่าตัดในผู้ป่วยรายเดียวกัน
*แตกต่างจากก่อนผ่าตัด $P < 0.05$

4.1.4 ระดับ CD14⁺/16⁺ monocytes กับ ในเลือดกับคุณลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ CD14/16 monocyte ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและรวบรวมผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อมะเร็งและคุณลักษณะทางคลินิกได้ 44 ราย ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ระดับ CD14⁺/16⁺ monocyte ตามคุณลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยและมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าผู้ป่วยที่มีเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีชนิด papillary adenocarcinoma มีระดับ CD14⁺/16⁺ monocyte ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีชนิด non papillary adenocarcinoma อย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบความแตกต่างของระดับ CD14⁺/16⁺ monocyte กับคุณลักษณะอื่น ได้แก่ เพศ อายุ ตำแหน่ง, ขนาด การแพร่ลุกลามและการพัฒนาการของเนื้อเยื่อมะเร็ง (ตารางที่ 4)

ได้ทำการติดตามระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจนถึง 7 ธันวาคม 2550 และวิเคราะห์ความแตกต่างของระยะรอดชีพของผู้ป่วยระหว่างผู้ที่มี CD14⁺/16⁺ monocyte ในเลือดสูงและที่มี CD14⁺/16⁺ monocyte ในเลือดต่ำ (รูปที่ 11) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน จึงไม่สามารถใช้ปริมาณ CD14⁺/16⁺ monocyte ในเลือดเป็น prognostic marker ได้



รูปที่ 11 เปรียบเทียบระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี CD14⁺/16⁺ monocyte ในเลือดสูง (----) และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี CD14⁺/16⁺ monocyte ในเลือดต่ำ (-----)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ CD14⁺CD16⁺ monocyte ในเลือดกับคุณลักษณะของมะเร็งท่อน้ำดี

parameter	n	Level of CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocyte (cells/ul)	P
Age: < 56	25	182 ± 136	0.499
> 56	19	157 ± 120	
Sex: Male	29	182 ± 146	0.176
Female	15	152 ± 89	
Type of CCA: Intrahepatic CCA	24	184 ± 137	0.124
Hilar CCA	9	121 ± 79	
Extrahepatic CCA	11	186 ± 143	
● Non – Papillary	29	203 ± 148	0.001
● Papillary	15	110 ± 30	
Differentiation			0.885
● Well differentiated	22	198 ± 146	
● Moderately–Poorly differentiated	7	218 ± 166	
Macroscopic appearance			0.0402
● Mass formind type	16	189 ± 154	
● Intradutal + Perductal type	11	162 ± 133	
Tumor size: < 7 cm	11	166 ± 140	0.740
> 7cm	16	195 ± 147	
Tumor staging: IVa	23	167 ± 113	0.320
IVb	21	176 ± 147	
Vascular invasion: No	38	179 ± 139	0.072
Yes	8	136 ± 54	
Lymphatic invasion: No	31	171 ± 130	0.794
Yes	13	172 ± 30	
Infiltrating macrophage in CCA tissue			0.047
● Low IHC index (<2)	12	122 ± 70	
● High IHC index (2-12)	25	206 ± 147	

(Mean ± SD)

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนใน peripheral blood cells ด้วย cDNA microarray

4.2.1 การเก็บตัวอย่าง ได้รวบรวมตัวอย่าง whole blood เก็บใน Trizol จากผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนจำนวน 9 ราย ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อทางเดินน้ำดี 5 ราย และคนปกติตาม inclusion และ exclusion criteria ที่กำหนดไว้จำนวน 8 ราย เพื่อสกัด RNA

4.2.2 การสกัด RNA และการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย cDNA microarray

สกัด RNA จากตัวอย่างเลือดโดยใช้ TRIzol[®] reagent และ Purelink[™] Micro-to-Midi system kit (Izolnvirogen) Purelink RNA purification kit ตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้ และสังเคราะห์ first strand cDNA และ second strand cDNA ตามลำดับ สังเคราะห์ Biotin-labeled cRNA จาก cDNA template และทำการตัด cRNA ให้เป็นชิ้นเล็กก่อนนำไป hybridize กับ array chip Affymetrix HG_U133 plus 2.0 chips (54,675 probe set) ตามวิธีที่บริษัทกำหนด อ่านผลโดยใช้ Affymetrix GSC3000 scanner และวิเคราะห์ผลโดยใช้ Gene Chip Operating Software; GCOS (Affymetrix, Santa Clara, CA) microarray chip และ Partek Genomics Suite โดยใช้ Human Genome U133 Plus 2.0 Array เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normalization Controls)

4.2.3 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาว

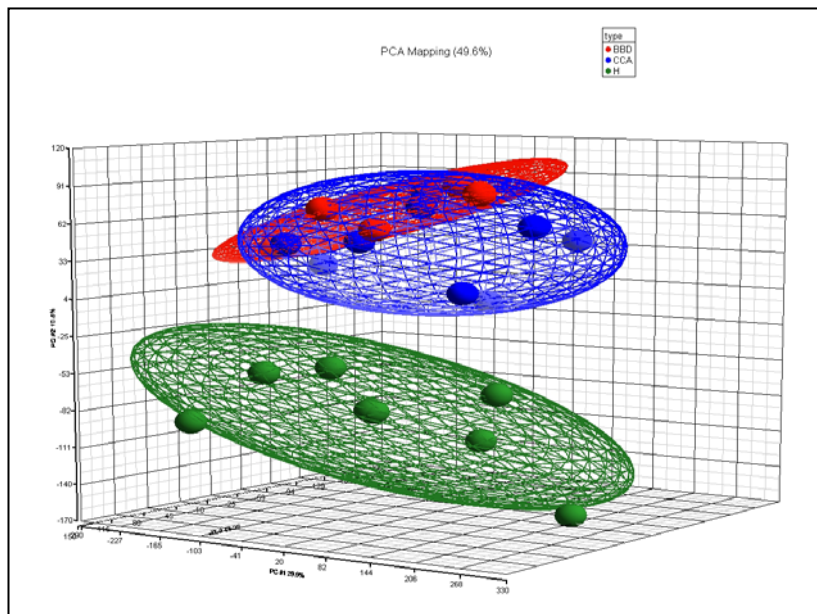
ได้วิเคราะห์ผลของ cDNA microarray และทดสอบนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA โดยกำหนดระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนและคนปกติที่มีค่าต่างกันมากกว่า 1.5 เท่า และมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ ในการคัดเลือกยีนมาศึกษาต่อ (ตารางที่ 5 และ 6)

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวระหว่างผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีน ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อทางเดินน้ำดี และคนปกติ โดยโปรแกรม Principal Component Analysis (PCA) แสดงว่ากลุ่มยีน (49.2%) ที่แสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนแตกต่างจากกลุ่มยีนในเม็ดเลือดขาวของคนปกติและมียีนที่แสดงออกเกี่ยวกับกลุ่มยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อทางเดินน้ำดี (รูปที่ 12)

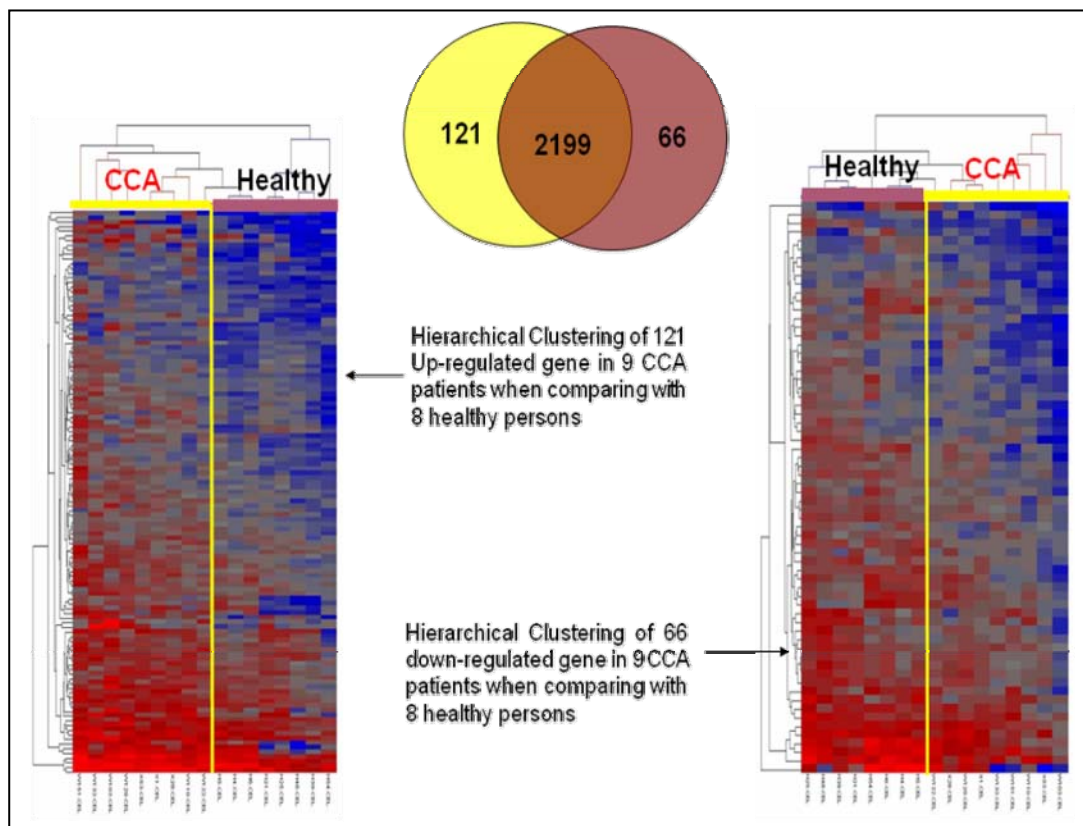
การวิเคราะห์และเปรียบเทียบยีนในเม็ดเลือดขาวระหว่างผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนและคนปกติที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกัน โดยโปรแกรม Hierarchical Clustering พบว่า เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมียีนที่แสดงออกในระดับที่เท่ากันจำนวน 2,199 ยีน ยีนที่แสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนสูงกว่าของคนปกติจำนวน 121 ยีน และยีนที่แสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนต่ำกว่าของคนปกติจำนวน 66 ยีน (รูปที่ 13)

การทำนายภาพรวมในการทำงานของเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีนเทียบกับคนปกติ จากข้อมูลยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่มียีน สามารถจัดกลุ่มยีนตามบทบาทหน้าที่ที่แสดงในตารางที่ 7 ดังนี้

1. Protein transport/Cytoskeletal, apoptosis related genes
2. Regulatory/ Protein modification related genes
3. Protease, Peptidase and Invasion related genes
4. Growth factor/Angiogenic/ Cell growth genes
5. Inflammation, Immune response, Cytokine, /Chemokine related genes
6. Metabolism related genes



รูปที่ 12 Principal Component Analysis (PCA) แสดงว่า transcriptome ของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากกลุ่มยีนในเม็ดเลือดขาวของคนปกติ



รูปที่ 13 Hierarchical clustering analysis แสดงระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเม็ดเลือดขาวของคนปกติ

ตารางที่ 5 กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับของคนปกติ

Gene Symbol	Gene Title
PLAU	plasminogen activator, urokinase
SERPINB2	serine peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
EREG	epiregulin
THBD	thrombomodulin
VEGF	vascular endothelial growth factor
LTF	lactotransferrin /// similar to lactotransferrin
PTGES	prostaglandin E synthase
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I
OLR1	oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
CTSL	cathepsin L
PPIF	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)
MMP9	matrix metalloproteinase 9
SDC2	syndecan 2
FOSL2	FOS-like antigen 2
ADFP	adipose differentiation-related protein
ATP13A3	ATPase type 13A3
RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
IL8	interleukin 8
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase
EXOSC4	exosome component 4
AMPD3	adenosine monophosphate deaminase (isoform E)
HSPA1A /1B	heat shock 70kDa protein 1A / 1B

ตารางที่ 6 กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกต่ำในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับของคนปกติ

Gene Symbol	Gene Title
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
LNPEP	leucyl/cystinyl aminopeptidase
TLR8	toll-like receptor 8
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1
NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III
C20orf118	Chromosome 20 open reading frame 118
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C
TFEC	transcription factor EC
SLFN5	schlafen family member 5
SP110	SP110 nuclear body protein
MPEG1	macrophage expressed gene 1
GIMAP2	GTPase, IMAP family member 2
RP1-93H18.5	hypothetical protein LOC441168
MLH3	mutL homolog 3 (E. coli)

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าของคนปกติตามบทบาทหน้าที่

Protein transport/Cytoskeletal, apoptosis related genes		Metabolism related genes		Regulatory/ Protein modification related genes	
Gene Symbol	Fold Change	Gene Symbol	Fold Change	Gene Symbol	Fold Change
LTF	3.22778	PTGES	3.04231	FOSL2	2.57995
SLC16A3	1.86919	ABCA1	2.93605	EXOSC4	2.21338
NDRG1	1.76206	RNASE2	2.50164	FOS	2.09213
GNA15	1.70535	AMPD3	2.19578	GPR97	1.99421
M F1	1.63618	IRS2	1.98094	GNG2	1.75065
RIT1	1.60813	UPP1	1.89277	PDE4A	1.73108
ATP6V1C1	1.55422	NP	1.84771	RALGDS	1.68044
RAC2	1.53564	GALNACT-2	1.7398	SLA2	1.6309
NPC1	1.51838	AGPAT6	1.71013	SRPK1	1.62347
TLOC1	1.50378	GPI	1.69501	SH3BP5	1.62004
SDC2	2.61611	DGAT2	1.69009	APLP2	1.58245
ETS2	1.85394	FAM108A1	1.68284	ARRB2	1.52865
CKAP4	1.6506	SLC2A3	1.6591	PPIF	2.62913
TUBB	1.52426	C20orf3	1.6462	HSPA1A /1B	2.12322
SQSTM1	1.65663	NTE	1.61328	DNAJB1	1.85094
TNFRSF1B	1.6219	PKM2	1.60132	TRIB1	1.82598
		RP5-1022P6.2	1.57548	HSPE1	1.7213
		ZUBR1	1.5551	DNAJC5	1.70657
		MAP1LC3B	1.52752	MAPK6	1.63669
				RANBP2	1.62085
				ST13	1.58644
				PTPRE	1.58431
				HSP90AB1	1.57809
				B3GNT5	1.57809
				MAP4K4	1.56112
				PRKCD	1.52045
				OXSRI	1.51416
Protease, Peptidase and Invasion related genes		Growth factor/Angiogenic/ Cell growth genes		Inflammation, Immune response, Cytokine, /Chemokine related genes	
Gene Symbol	Fold Change	Gene Symbol	Fold Change	Gene Symbol	Fold Change
PLAU	6.3388	EREG	4.01995	CXCL3	4.90128
SERPINB2	5.60283	VEGF	3.33421	CXCL2	2.88502
THBD	3.87076	IL8	2.46387	IL1R1	2.77718
OLR1	2.67693	ANPEP	2.26976	IL1R2	2.08442
CTSL	2.64564	FLNA	2.06052	FCAR	2.03052
MMP9	2.62559	TFDP1	1.7254	CD93	1.96563
ADAM9	1.96734	G0S2	1.70691	CORO1C	1.78989
TIMP1	1.87811	INPP5A	1.67145	CXCL16	1.56218
CPD	1.82203	PTDSR	1.6638	RABGEF1	1.54423
TPP1	1.52183	ITGAX	1.66255	CST7	1.51943
		TGFB1	1.57519		
		SIGLEC5	1.51549		

4.2.3 การวิเคราะห์หีบหยาของเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

เมื่อนำยีนและระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวิเคราะห์หีบหยาของเม็ดเลือดขาวในภาพรวมโดยใช้ Ingenuity pathway analysis พบว่าเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี มีการทำงานที่เกี่ยวข้องกับภาวะของโรคหรือความผิดปกติเรียงตามจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 4

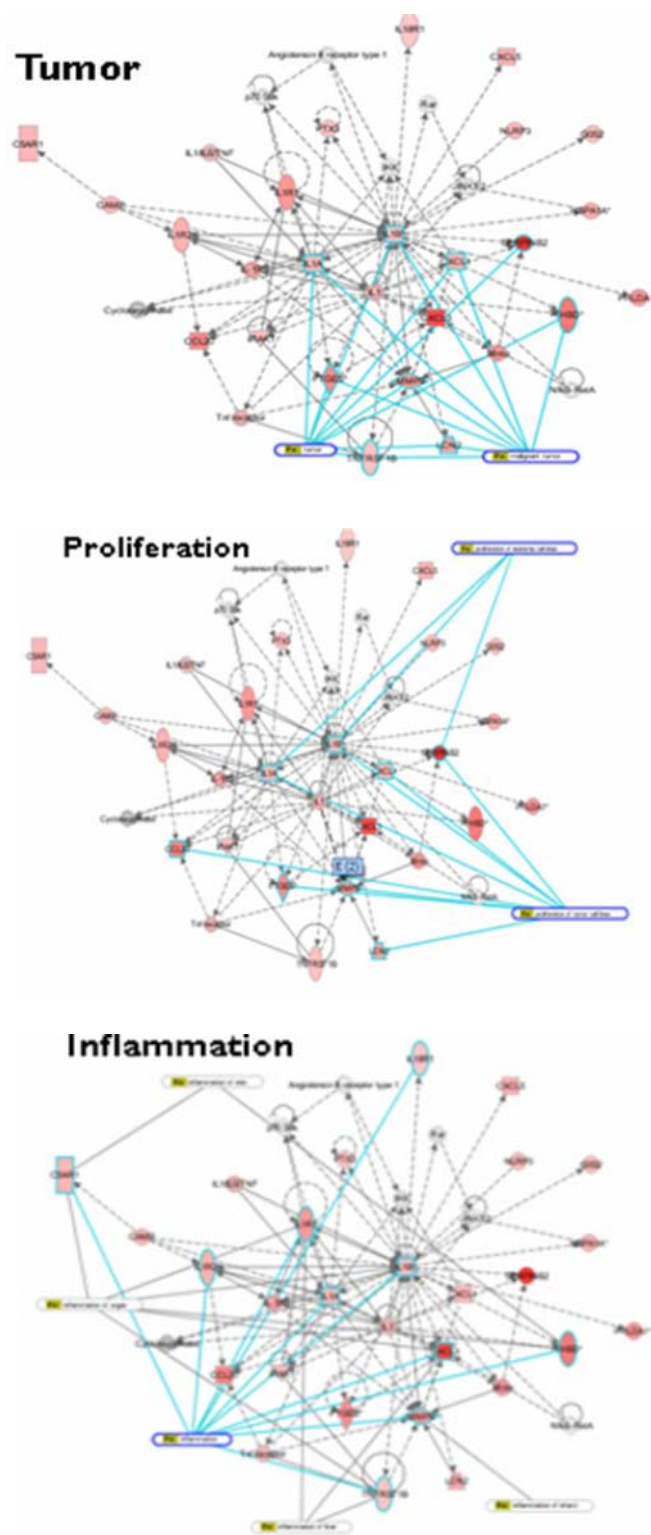
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์หีบหยาของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis

	ภาวะของโรคหรือความผิดปกติ	จำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง
1	cancer	58
2	Immunological disease	40
3	Inflammation disease	39
4	Skeletal and muscular disorder	31
5	Connective tissue disorder	29

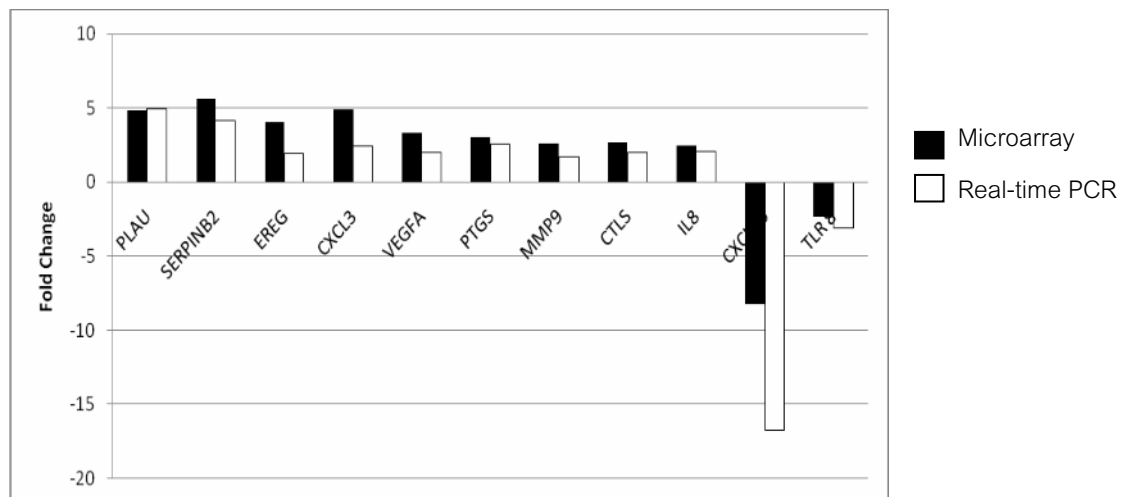
4.2.4 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกจากข้อมูล microarray โดยวิธี real time PCR

จากข้อมูล microarray คัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับคนปกติ โดยคัดเลือกยีนที่มีรายงานการแสดงออกใน monocyte/macrophage และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับมะเร็งและการแพร่ลุกลามของมะเร็ง จำนวน 11 ยีน เป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงจำนวน 9 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกต่ำจำนวน 2 ยีน

ทำการสกัด RNA จากตัวอย่างเม็ดเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 9 ราย และคนปกติจำนวน 8 ราย ที่ใช้ทำ microarray, แยก mRNA และ convert เป็น cDNA ทำการ design primer, optimize condition ของการทำ real time PCR ผลการวัดระดับ mRNA ในตัวอย่างโดยวิธี real time PCR สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จาก microarray ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis



รูปที่ 15 เปรียบเทียบระดับ mRNA ในตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี real time PCR กับข้อมูลที่ได้จาก microarray

4.3 การแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวใช้พยากรณ์ระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนจำนวน 11 ยีน ซึ่งได้คัดเลือกมาจากข้อมูลการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี microarray ดังกล่าวใน 4.2 ได้แก่ PLAU, MMP9, VEGFA, EREG, SERPINB2, PTGS, CXCL3, CTSL, IL8, CXCL10 และ TLR8 โดยวัดระดับ mRNA ในเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 39 รายและคนปกติจำนวน 21 ราย เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนแต่ละยีนต่อค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนนั้นในกลุ่มคนปกติ พบว่าการแสดงออกของยีนแต่ละยีนมีความแปรปรวนสูงในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเมื่อนำแผนภาพการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ศึกษามาจัดเรียงเป็นรายบุคคล พบว่าแผนภาพที่ได้มีทั้งแบบที่เป็นรายบุคคล (รูปที่ 16ก) และแบบกลุ่ม (รูปที่ 16ข) จากภาพรวมเบื้องต้นที่ได้นี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกเฉพาะกลุ่มยีนที่มีรูปแบบการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ ได้แก่กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ Proteolytic activity และกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ inflammation (IL8, PTGS) มาจัดกลุ่ม พบว่าสามารถจัดเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่มี Proteolytic activity สูง แต่ inflammation ต่ำ จำนวน 15 ราย ในรูปที่ 17ก และกลุ่มที่มี Proteolytic activity ต่ำ แต่ inflammation สูง จำนวน 12 ราย ในรูปที่ 17ข และไม่สามารถจัดกลุ่มได้ 8 ราย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลนี้ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะสร้างสมการที่เป็นตัวแทนการทำงานของยีนกลุ่ม Proteolytic activity ซึ่งเป็นแบบแผนที่พบมากในกลุ่มประชากรที่ศึกษาอยู่ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลการแสดงออกของกลุ่มยีนดังกล่าวได้อย่างเป็นระบบและใช้ได้กับผู้ป่วยทุกราย จากแนวคิดนี้ได้สร้างสมการแบบง่ายโดย Cox regression model เป็นค่า risk score เพื่อใช้แยกกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยากรณ์โรคที่แตกต่างกันตามระดับการแสดงออกของ PLAU, SERPINB2 และ CTSL ดังนี้

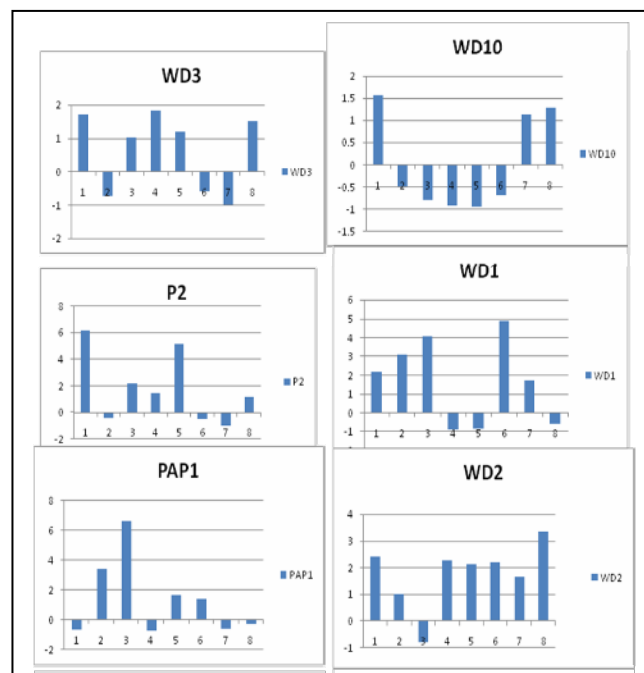
$$\text{Risk score} = 1.020 \text{ PLAU} + 1.214 \text{ CTSL} - 0.882 \text{ SERPINB2}$$

เมื่อแทนค่าในสมการการแสดงออกของยีนในสมการของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมดที่ศึกษา (n = 35) พบว่าสามารถจัดกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Proteolytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวตามสมการได้เป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ค่า 50th Percentile ของระดับการแสดงออกของ metastatic associated

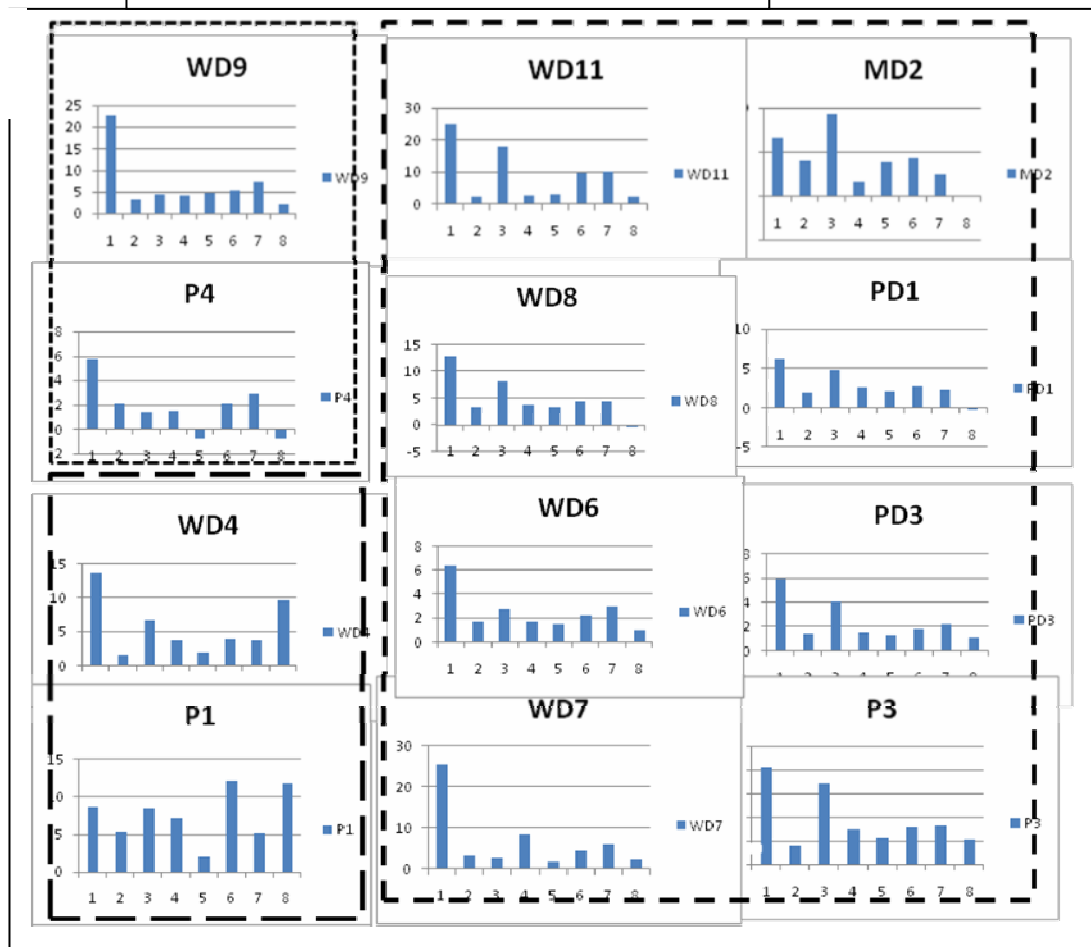
gene เป็นจุดตัด = 4.21 สามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk score สูงออกจากกลุ่มผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk score ต่ำ ซึ่งมีค่าระยะรอดชีพ (survival time) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Log rank, $P = 0.021$) ดังแสดงในรูปที่ 18 โดยผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk score ต่ำจะมีค่าระยะรอดชีพยาวกว่า (mean survival 403 days; 95% CI, 320-485 วัน) ผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk score สูง (mean survival 239 days; 95% CI, 167-311 วัน)

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า การวัดระดับการแสดงออกของ Proteolytic activity gene ในเม็ดเลือดขาวสามารถทำนายหรือพยากรณ์โรคของผู้ป่วยได้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของใช้วิธีการดังกล่าวในการพยากรณ์ภาวะมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการเลือกแนวทางการรักษาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดในผู้ป่วยแต่ละรายได้ในอนาคต

ก

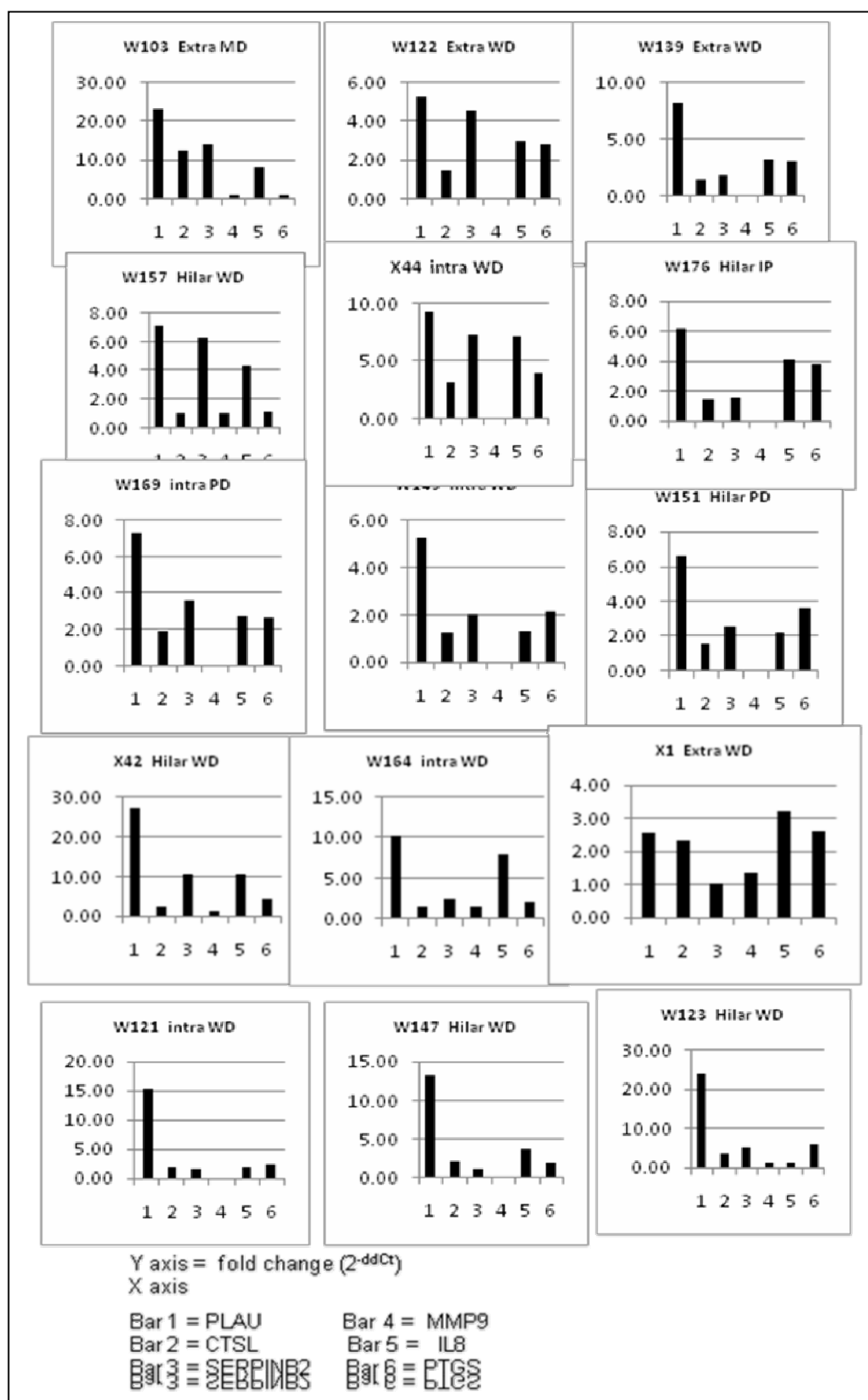


ข

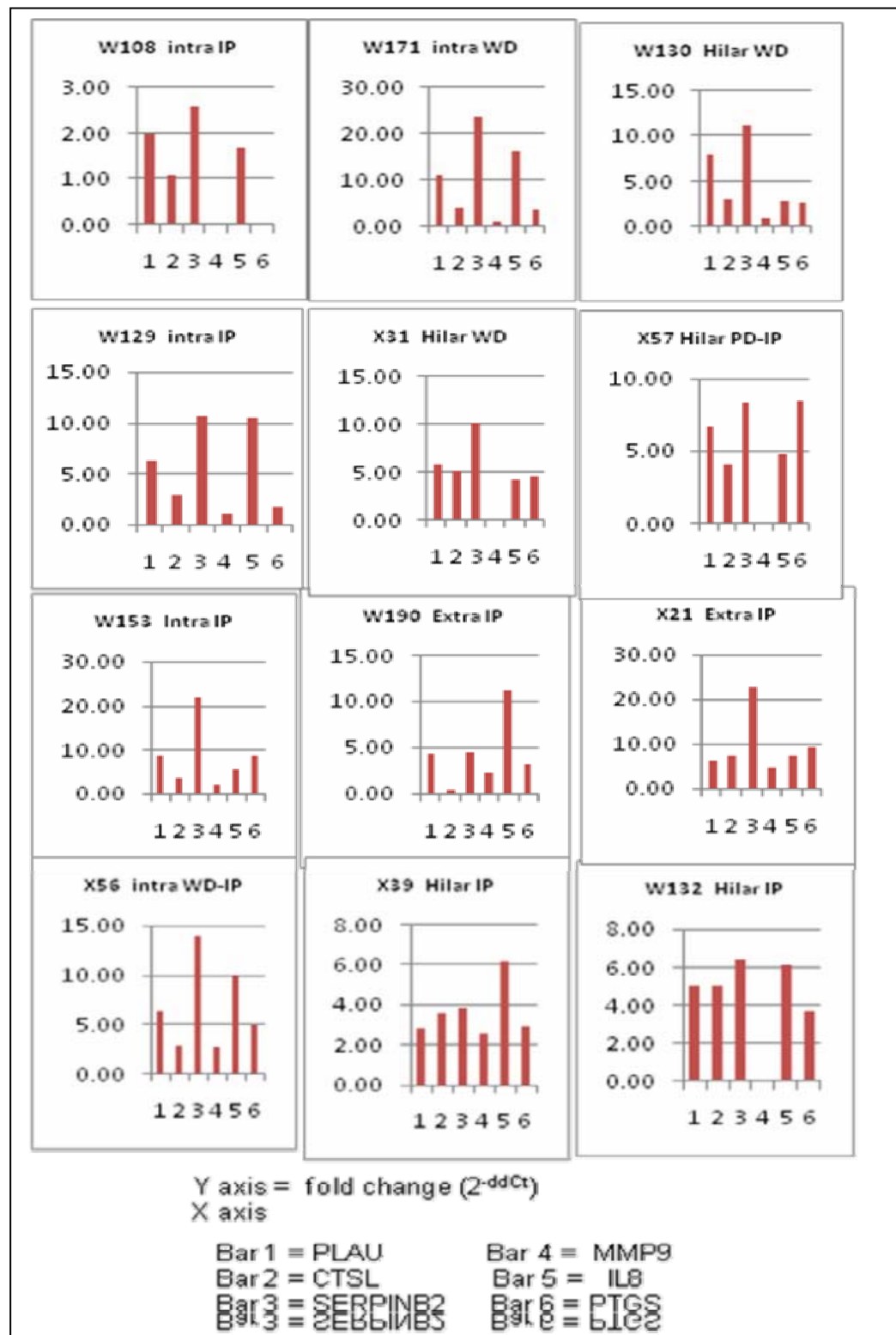


รูปที่ 16 แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

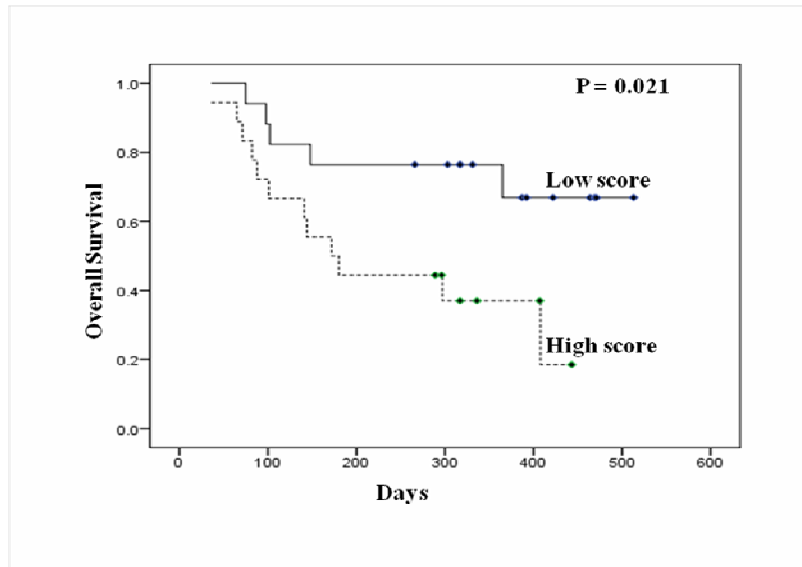
- ก. แผนภาพที่มีลักษณะเป็นปัจเจกบุคคล
- ข. แผนภาพที่สามารถจัดเป็นกลุ่มย่อย



รูปที่ 17 ก แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic สูง แต่ inflammation ต่ำในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย มะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 17 ข แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic ต่ำแต่ inflammation สูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย มะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 18 แผนภาพเปรียบเทียบระยะรอดชีพผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic และ inflammation ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

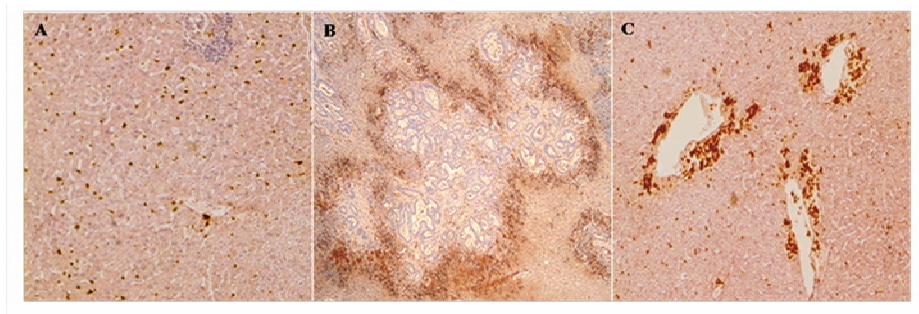
4.4 เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งสัมพันธ์กับระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาเม็ดเลือดขาวชนิด $CD14^+/16^+$ monocyte และการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับภาวะมะเร็งและระยะรอดชีพของผู้ป่วย แสดงว่าเม็ดเลือดขาวมีบทบาทสำคัญต่อมะเร็ง การทบทวนวรรณกรรมบ่งชี้ว่า เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ซึ่งเมื่อเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีและแปลงสภาพเป็น tissue macrophage มักทำงานร่วมกับเซลล์มะเร็งในการก่อหรือสนับสนุนประโยชน์ต่อการเจริญและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง เพื่อทดสอบสมมุติฐานดังกล่าว จึงได้ขยายการศึกษาเพื่อติดตาม tissue macrophage ที่เพิ่งแปลงสภาพจากเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte โดยใช้ Mac387 ซึ่งเป็น surface marker ของเซลล์ดังกล่าว และเพื่อแสดงว่า tissue macrophage เกี่ยวข้องการแพร่ลุกลามของมะเร็ง ได้เลือกยีน MMP9 ซึ่งพบในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตัวอย่างตรวจสอบ

การศึกษาโดยวิธี immunohistochemistry ของ Mac387 และ MMP9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 50 ราย พบว่า เซลล์เม็ดเลือดที่ติด Mac387 พบกระจายในเนื้อเยื่อตับและบริเวณมะเร็งที่มีสภาพ necrosis แต่พบจำนวนมากบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อตับและบริเวณรอบเส้นเลือด (รูปที่ 19) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการพบจำนวนเซลล์ที่ติด Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็งกับข้อมูลพยาธิวิทยาคลินิกของผู้ป่วยโดยใช้ univariate analysis พบว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะโรคที่ไม่ดี ได้แก่ มะเร็งชนิด non-papillary type ($P = 0.006$) และ periductal infiltrating types ($P = 0.047$) (ตารางที่ 9) การตรวจสอบเซลล์ที่มีการแสดงออกของ MMP9 โดย double staining immunohistochemistry แสดงว่าเซลล์ที่ติด Mac387 มีการแสดงออกของ MMP9 ด้วย (รูปที่ 20) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของเซลล์ที่มี Mac387 กับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ MMP9 ($P < 0.001$)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการพบเซลล์ที่ติด Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็งกับระยะรอดชีพของผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387 จำนวนมากมีระยะรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387 จำนวนน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$) โดยมีค่า mean survival 380 วัน (95% CI, 228-531 วัน) และ 679 วัน (95% CI, 541-817 วัน) ตามลำดับ (รูปที่ 21) ทั้งนี้มีเพียง 35% ของผู้ป่วยกลุ่มที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387

จำนวนมากที่มีระยะรอดชีพมากกว่า 1 ปีหลังรับการผ่าตัด ในขณะที่ 75% ของของผู้ป่วยกลุ่มที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387 จำนวนน้อยที่มีระยะรอดชีพมากกว่า 1 ปีหลังรับการผ่าตัด

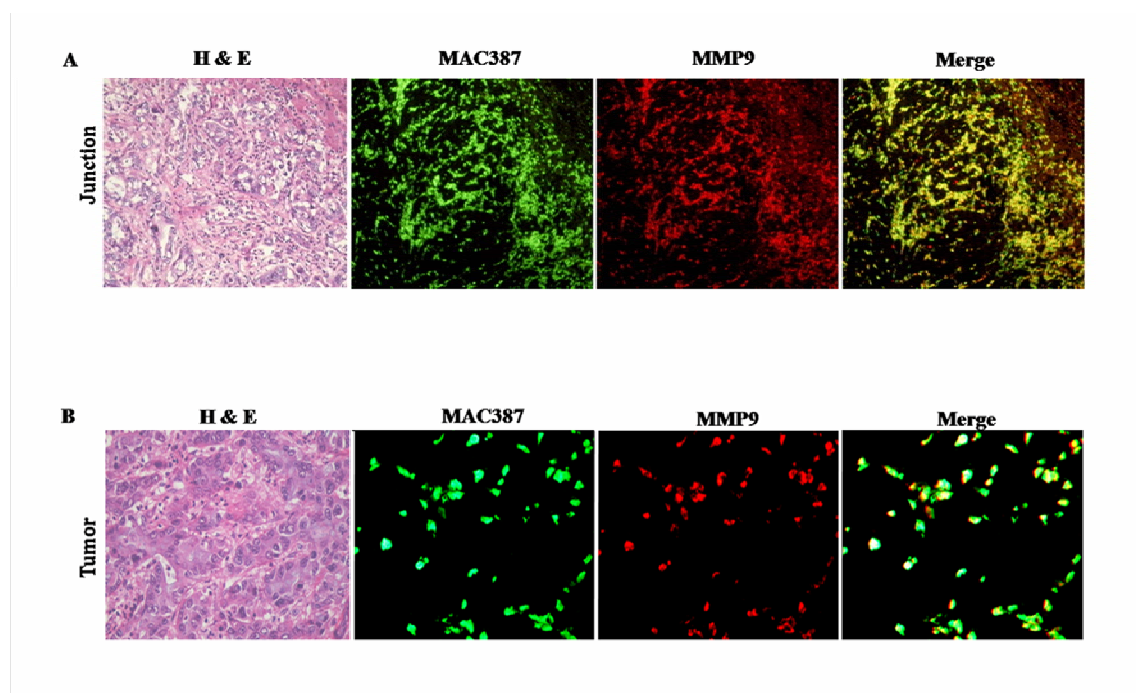


รูปที่ 19 Immunohistochemistry ของ Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

A เซลล์ tissue macrophage ที่ย้อมติด Mac387 ในเนื้อเยื่อที่ไม่พบมะเร็ง

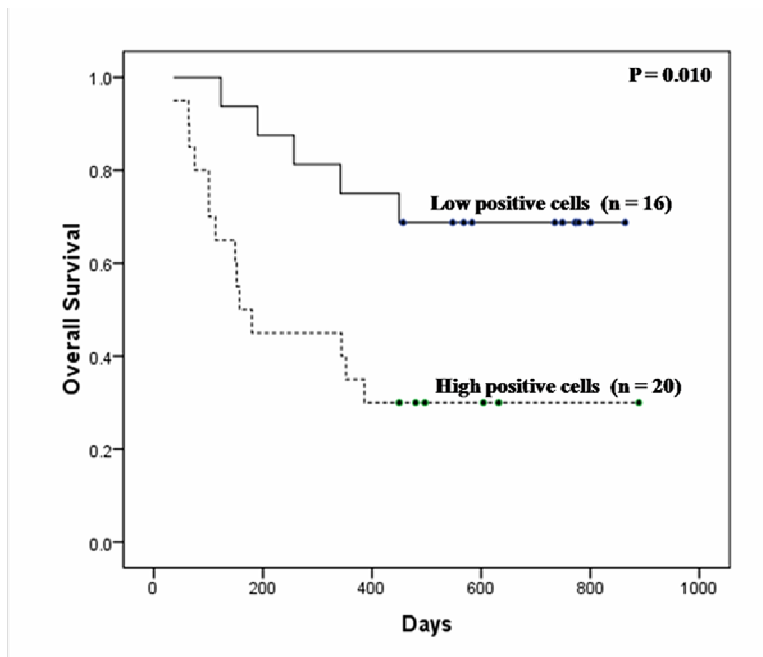
B เซลล์ tissue macrophage ที่ย้อมติด Mac387 ซึ่งพบหนาแน่นบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งติดเนื้อเยื่อ

C เซลล์ tissue macrophage ที่ย้อมติด Mac387 ที่พบบริเวณรอบเส้นเลือด



รูปที่ 20 Double immune-fluorescent staining ของ Mac387 และ MMP9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

A กำลังขยาย 200; B กำลังขยาย 400



รูปที่ 21 กราฟเปรียบเทียบระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามปริมาณการพบเซลล์ Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็ง การวิเคราะห์ระยะรอดชีพผู้ป่วยโดยใช้ Kaplan-Meier แสดงว่าผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387 จำนวนมากมีระยะรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387 จำนวนน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$)

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ Mac387 กับพยาธิวิทยาคลินิกของผู้ป่วย

Variable	MAC387 positive cells (%)				P value
	Number	Low	High		
Age: < 56	26	9 (34.6)	17 (65.4)		0.608
≥ 56	24	10 (41.7)	14 (58.3)		
Sex: Female	23	9 (39.1)	14 (60.9)		0.879
Male	27	10 (37.0)	17 (63.0)		
Tumor location: Intrahepatic CCA	32	13 (40.6)	19 (59.4)		0.61
Extrahepatic CCA	18	6 (33.3)	12 (66.7)		
Gross morphology: Mass forming type	24	7 (29.2)	17 (70.8)		0.047
Periductal infiltrating type	20	7 (35.0)	13 (65.0)		
Intraductal Growth type	6	5 (83.3)	1 (16.7)		
Tumor Stage: I-II	13	8 (61.5)	5 (38.5)		0.091
III	23	8 (34.8)	15 (65.2)		
IV	14	3 (21.4)	11 (78.6)		
Histology type: Non-Papillary	35	9 (25.7)	26 (74.3)		0.006
Papillary	15	10 (66.7)	5 (33.3)		
Vascular invasion: Absent	37	14 (32.4)	23 (67.6)		0.198
Present	13	3 (23.1)	10 (76.9)		

5. บทวิจารณ์

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าระบบเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปลี่ยนแปลงไปตามพยาธิสภาพ โดยเฉพาะกลุ่มเซลล์ monocyte ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกำจัดมะเร็งนั้น มีการเปลี่ยนแปลงที่มีแนวโน้มเกี่ยวพันภาวะมะเร็ง เพราะพบเซลล์กลุ่ม $CD14^+/16^+$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณของเซลล์ $CD14^+/16^+$ monocytes กลุ่มนี้ลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดก่อนมะเร็งออก นอกจากนี้ $CD14^+/16^+$ monocytes ที่พบในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอยู่ในภาวะถูกกระตุ้นมากกว่าเซลล์ $CD14^+/16^+$ monocytes ที่ตรวจพบในคนปกติ หลักฐานเหล่านี้แสดงว่าเซลล์ $CD14^+/16^+$ monocytes ที่ตรวจพบในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เหล่านี้มีการแสดงออกที่เกี่ยวข้องกับการสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (proteolytic enzyme) และสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของมะเร็ง การติดตามเซลล์ monocyte ที่เคลื่อนเข้าไปในเนื้อเยื่อมะเร็งโดยการย้อม Mac387 ซึ่งเป็น marker ของเซลล์ monocyte ที่แปลงสภาพ พบเซลล์กลุ่มดังกล่าวหนาแน่นในบริเวณขอบของเนื้อเยื่อมะเร็งที่ติดกับเนื้อเยื่อปกติรวมทั้งบริเวณรอบ ๆ เส้นเลือด ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทของเซลล์กลุ่มนี้ที่อาจเกี่ยวข้องกับการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง การตรวจพบการแสดงออกของ MMP9 ในเซลล์กลุ่มนี้แสดงว่าเซลล์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการช่วยให้เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังเนื้อเยื่อใกล้เคียง เพราะ MMP9 เป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเคลื่อนที่รุกรานออกนอกบริเวณต้นกำเนิดได้ ปริมาณของเซลล์ Mac387 ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อมะเร็งแปรผกผันกับระยะรอดชีพของผู้ป่วย สนับสนุนสมมุติฐานที่เชื่อว่าเซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวพันมะเร็งมากกว่าทำลายเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดีและการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะแพร่ลุกลามจึงควรมุ่งเป้าในการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้ด้วย เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพและป้องกันการเกิดซ้ำของมะเร็ง

การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าแบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีความแตกต่างจากเม็ดเลือดขาวของคนปกติหรือผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี โดยที่แบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็ง มีการแสดงออกของยีนที่กดภูมิคุ้มกันและยีนที่สนับสนุนการเจริญ การแบ่งตัวและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเมื่อเลือกยีน 3 ยีนที่มีการแสดงออกจำเพาะในภาวะมะเร็งและเกี่ยวข้องกับการสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้แก่ PLAUI, SERPINB2 และ CTSL จำนวนเป็นค่า risk score เพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค พบว่า สามารถทำนายระยะรอดชีพผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเม็ดเลือดขาวจึงเป็นตัวอย่างชีวภาพที่สามารถนำมาใช้เป็น marker ในการบ่งชี้ภาวะมะเร็งหรือพยากรณ์ภาวะโรคมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้ หากมีการศึกษาในรายละเอียดและทำการทดสอบในผู้ป่วยจำนวนมาก รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบในผู้ป่วยมะเร็งชนิดอื่น นอกจากนี้เลือดยังเป็นตัวอย่างที่นำออกจากผู้ป่วยได้ง่าย สะดวกและมีความเสี่ยงต่ำ

6. หนังสืออ้างอิง

1. Allavena, P., C. Garlanda, et al. (2008). "Pathways connecting inflammation and cancer." Curr Opin Genet Dev **18**(1): 3-10.
2. Allavena, P., A. Sica, et al. (2008). "The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance." Immunol Rev **222**: 155-161.
3. Allavena, P., A. Sica, et al. (2008). "The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages." Crit Rev Oncol Hematol **66**(1): 1-9.
4. Ancuta, P., J. Wang, et al. (2006). "CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells." J Leukoc Biol **80**(5): 1156-1164.
5. Anghelina, M., P. Krishnan, et al. (2006). "Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles." Am J Pathol **168**(2): 529-541.
6. Arien-Zakay, H., S. Lecht, et al. (2009). "Interferon-gamma-induced neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived progenitors." Leukemia **23**(10): 1790-1800.
7. Bardadin, K. A., P. J. Scheuer, et al. (1991). "Immunocytochemical observations on macrophage populations in normal fetal and adult human liver." J Pathol **164**(3): 253-259.
8. Bauer, J. W., H. Bilgic, et al. (2009). "Gene-expression profiling in rheumatic disease: tools and therapeutic potential." Nat Rev Rheumatol **5**(5): 257-265.
9. Belge, K. U., F. Dayyani, et al. (2002). "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." J Immunol **168**(7): 3536-3542.
10. Ben-Baruch, A. (2003). "Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions." Breast Cancer Res **5**(1): 31-36.
11. Bingle, L., N. J. Brown, et al. (2002). "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." J Pathol **196**(3): 254-265.
12. Bogan, R. L., M. J. Murphy, et al. (2009). "Dynamic changes in gene expression that occur during the period of spontaneous functional regression in the rhesus macaque corpus luteum." Endocrinology **150**(3): 1521-1529.
13. Brandtzaeg, P., D. B. Jones, et al. (1988). "Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen." J Clin Pathol **41**(9): 963-970.
14. Byrnes, A., A. Jacks, et al. (2009). "Gene expression in peripheral blood leukocytes in monozygotic twins discordant for chronic fatigue: no evidence of a biomarker." PLoS One **4**(6): e5805.
15. Calzada-Wack, J. C., M. Frankenberger, et al. (1996). "Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages." J Inflamm **46**(2): 78-85.
16. Chan, G., M. T. Nogalski, et al. (2009). "Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22369-22374.
17. Crowther, M., N. J. Brown, et al. (2001). "Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors." J Leukoc Biol **70**(4): 478-490.
18. David Dong, Z. M., A. C. Aplin, et al. (2009). "Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells." Curr Pharm Des **15**(4): 365-379.
19. De Palma, M., R. Mazzei, et al. (2008). "Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis." Cancer Cell **14**(4): 299-311.

20. Debey-Pascher, S., D. Eggle, et al. (2009). "RNA stabilization of peripheral blood and profiling by bead chip analysis." Methods Mol Biol **496**: 175-210.
21. Elgert, K. D., D. G. Alleva, et al. (1998). "Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection." J Leukoc Biol **64**(3): 275-290.
22. Esposito, I. and P. Schirmacher (2008). "Pathological aspects of cholangiocarcinoma." HPB (Oxford) **10**(2): 83-86.
23. Figueroa-Vega, N., M. Alfonso-Perez, et al. (2009). "Tie-2 Is overexpressed by monocytes in autoimmune thyroid disorders and participates in their recruitment to the thyroid gland." J Clin Endocrinol Metab.
24. Fingerle, G., A. Pforte, et al. (1993). "The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients." Blood **82**(10): 3170-3176.
25. Frankenberger, M., T. Sternsdorf, et al. (1996). "Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis." Blood **87**(1): 373-377.
26. Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
27. Gnatenko, D. V., J. J. Dunn, et al. (2009). "Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression (SAGE)." Methods Mol Biol **496**: 245-272.
28. Goebeler, M., J. Roth, et al. (1994). "The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14." J Leukoc Biol **55**(2): 259-261.
29. Goede, V., L. Brogelli, et al. (1999). "Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1." Int J Cancer **82**(5): 765-770.
30. Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
31. Gores, G. J. (2003). "Cholangiocarcinoma: current concepts and insights." Hepatology **37**(5): 961-969.
32. Goydos, J. S., A. M. Brumfield, et al. (1998). "Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker." Ann Surg **227**(3): 398-404.
33. Greene, F. L., D. L. Page, et al. (2002). AJCC cancer staging manual. New York, Springer-Verlag.
34. Hashimoto, I., J. Kodama, et al. (2000). "Macrophage infiltration and angiogenesis in endometrial cancer." Anticancer Res **20**(6C): 4853-4856.
35. Hidaka, A. (2007). "Clinicopathological study of patients undergoing resection of hilar cholangiocarcinoma." Kurume Med J **54**(1-2): 41-49.
36. Horelt, A., K. U. Belge, et al. (2002). "The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production." Eur J Immunol **32**(5): 1319-1327.
37. Illemann, M., N. Bird, et al. (2006). "MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases." Mol Cancer Res **4**(5): 293-302.
38. Inuzuka, K., Y. Ogata, et al. (2000). "Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and 9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma." J Surg Res **93**(2): 211-218.
39. Isa, T., T. Kusano, et al. (2001). "Predictive factors for long-term survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma." Am J Surg **181**(6): 507-511.
40. Ishigami, S., S. Natsugoe, et al. (2003). "Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer." Anticancer Res **23**(5A): 4079-4083.
41. Jo Chae, K., S. Y. Rha, et al. (2004). "Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in intraductal and nonintraductal growth type of cholangiocarcinoma." Am J Gastroenterol **99**(1): 68-75.

42. Kawamura, K., Y. Komohara, et al. (2009). "Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors." Pathol Int **59**(5): 300-305.
43. Kawanaka, N., Y. Nagake, et al. (2002). "Expression of Fc gamma receptor III (CD16) on monocytes during hemodialysis in patients with chronic renal failure." Nephron **90**(1): 64-71.
44. Kim, T. D., K. S. Song, et al. (2006). "Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer." BMC Cancer **6**: 211.
45. Komohara, Y., K. Ohnishi, et al. (2008). "Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas." J Pathol **216**(1): 15-24.
46. Kreutz, M., S. W. Krause, et al. (1992). "Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro." Res Immunol **143**(1): 107-115.
47. Lee, C. H., I. Espinosa, et al. (2008). "Prognostic significance of macrophage infiltration in leiomyosarcomas." Clin Cancer Res **14**(5): 1423-1430.
48. Leek, R. D. and A. L. Harris (2002). "Tumor-associated macrophages in breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(2): 177-189.
49. Lewis, C. E. and J. W. Pollard (2006). "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." Cancer Res **66**(2): 605-612.
50. Lewis, J. S., J. A. Lee, et al. (1999). "Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms." J Leukoc Biol **66**(6): 889-900.
51. Li, C., S. Shintani, et al. (2002). "Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma." Oncol Rep **9**(6): 1219-1223.
52. Li, L., X. Yang, et al. (2009). "Transcriptome-wide characterization of gene expression associated with unruptured intracranial aneurysms." Eur Neurol **62**(6): 330-337.
53. Lichtinghagen, R., T. Helmbrecht, et al. (1995). "Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver." Eur J Clin Chem Clin Biochem **33**(2): 65-71.
54. Lin, E. Y. and J. W. Pollard (2004). "Macrophages: modulators of breast cancer progression." Novartis Found Symp **256**: 158-168; discussion 168-172, 259-169.
55. Maningat, P. D., P. Sen, et al. (2009). "Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome." Physiol Genomics **37**(1): 12-22.
56. Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2004). "Tumor-associated macrophage as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumor progression." European Journal of Cancer **40**: 1660-1667.
57. Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-444.
58. Mantovani, A., S. Sozzani, et al. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol **23**(11): 549-555.
59. Marques, F., J. C. Sousa, et al. (2009). "Kinetic profile of the transcriptome changes induced in the choroid plexus by peripheral inflammation." J Cereb Blood Flow Metab **29**(5): 921-932.
60. Menshikov, M., E. Elizarova, et al. (2002). "Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis." Biochem J **367**(Pt 3): 833-839.
61. Mereghetti, L., I. Sitkiewicz, et al. (2009). "Identification of an unusual pattern of global gene expression in group B Streptococcus grown in human blood." PLoS One **4**(9): e7145.
62. Merkerova, M., A. Vasikova, et al. (2009). "Differential gene expression in umbilical cord blood and maternal peripheral blood." Eur J Haematol **83**(3): 183-190.

63. Nagorsen, D., S. Voigt, et al. (2007). "Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival." J Transl Med **5**: 62.
64. Nishio, H., M. Nagino, et al. (2005). "TNM classification for perihilar cholangiocarcinoma: comparison between 5th and 6th editions of the AJCC/UICC staging system." Langenbecks Arch Surg **390**(4): 319-327.
65. Nockher, W. A. and J. E. Scherberich (1998). "Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis." Infect Immun **66**(6): 2782-2790.
66. Ohno, S., H. Inagawa, et al. (2005). "Role of tumor-associated macrophages (TAM) in advanced gastric carcinoma: the impact on FasL-mediated counterattack." Anticancer Res **25**(1B): 463-470.
67. Ohno, S., H. Inagawa, et al. (2003). "The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients." Anticancer Res **23**(6D): 5015-5022.
68. Ohno, S., Y. Ohno, et al. (2004). "Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer." Anticancer Res **24**(5C): 3335-3342.
69. Ohta, M., H. Konno, et al. (2003). "The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer." Cancer Lett **192**(2): 215-225.
70. Orre, M. and P. A. Rogers (1999). "Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary." Gynecol Oncol **73**(1): 47-50.
71. Pinlaor, S., Y. Hiraku, et al. (2004). "Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis." Nitric Oxide **11**(2): 175-183.
72. Pinlaor, S., N. Ma, et al. (2004). "Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase." Carcinogenesis **25**(8): 1535-1542.
73. Pinlaor, S., B. Sripana, et al. (2005). "Nitrative and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion." World J Gastroenterol **11**(30): 4644-4649.
74. Pinlaor, S., S. Tada-Oikawa, et al. (2005). "Opisthorchis viverrini antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line." Int J Parasitol **35**(6): 591-596.
75. Pinlaor, S., P. Yongvanit, et al. (2003). "8-nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*." Biochem Biophys Res Commun **309**(3): 567-571.
76. Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." Nat Rev Cancer **4**(1): 71-78.
77. Porta, C., B. Subhra Kumar, et al. (2007). "Tumor promotion by tumor-associated macrophages." Adv Exp Med Biol **604**: 67-86.
78. Pucci, F., M. A. Venneri, et al. (2009). "A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes (TEMs), blood "resident" monocytes and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships." Blood.
79. Pulliam, L., R. Gascon, et al. (1997). "Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia." Lancet **349**(9053): 692-695.
80. Raghavachari, N., X. Xu, et al. (2009). "Characterization of whole blood gene expression profiles as a sequel to globin mRNA reduction in patients with sickle cell disease." PLoS One **4**(8): e6484.
81. Ramos-DeSimone, N., E. Hahn-Dantona, et al. (1999). "Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion." J Biol Chem **274**(19): 13066-13076.

82. Rivier, A., J. Pene, et al. (1995). "Blood monocytes of untreated asthmatics exhibit some features of tissue macrophages." Clin Exp Immunol **100**(2): 314-318.
83. Rothe, G., H. Gabriel, et al. (1996). "Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(12): 1437-1447.
84. Sadeghi, H. M., J. F. Schnelle, et al. (1999). "Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons." Exp Gerontol **34**(8): 959-970.
85. Saleh, M. N., S. J. Goldman, et al. (1995). "CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor." Blood **85**(10): 2910-2917.
86. Sasaki, M., K. Tsuneyama, et al. (2003). "Intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhosis presents granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Hum Pathol **34**(12): 1337-1344.
87. Sica, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer related inflammation: the macrophage connection." Cancer Lett **267**(2): 204-215.
88. Sica, A., T. Schioppa, et al. (2006). "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy." Eur J Cancer **42**(6): 717-727.
89. Sinha, A., K. Shahzad, et al. (2010). "Peripheral blood mononuclear cell transcriptome profiles suggest T-cell immunosuppression after uncomplicated mechanical circulatory support device surgery." Hum Immunol **71**(2): 164-169.
90. Sirica, A. E. (2005). "Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy." Hepatology **41**(1): 5-15.
91. Sripa, B. and C. Pairojkul (2008). "Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand." Curr Opin Gastroenterol **24**(3): 349-356.
92. Szaflarska, A., M. Baj-Krzyworzeka, et al. (2004). "Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation." Exp Hematol **32**(8): 748-755.
93. Tang, B. M., A. S. McLean, et al. (2009). "Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis." Crit Care Med **37**(3): 882-888.
94. Tangkijvanich, P., D. Thong-ngam, et al. (2004). "Diagnostic role of serum interleukin 6 and CA 19-9 in patients with cholangiocarcinoma." Hepatogastroenterology **51**(55): 15-19.
95. Tian, Z., N. Palmer, et al. (2009). "A practical platform for blood biomarker study by using global gene expression profiling of peripheral whole blood." PLoS One **4**(4): e5157.
96. Trishe Y.-M. Leong, Pongsak Wannakrairot, et al. (2007). "Pathology of cholangiocarcinoma." Current Diagnostic Pathology(13): 54-64.
97. Tsutsui, S., K. Yasuda, et al. (2005). "Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density." Oncol Rep **14**(2): 425-431.
98. Van Ginderachter, J. A., K. Movahedi, et al. (2006). "Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion." Immunobiology **211**(6-8): 487-501.
99. van Heerden, J. H., A. Conesa, et al. (2009). "Parallel changes in gene expression in peripheral blood mononuclear cells and the brain after maternal separation in the mouse." BMC Res Notes **2**: 195.
100. van Netten, J. P., B. J. Ashmed, et al. (1992). "'Macrophages' and their putative significance in human breast cancer." Br J Cancer **66**(1): 220-221.
101. Vatanasapt, V., V. Tangvoraphonkchai, et al. (1990). "A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand." Southeast Asian J Trop Med Public Health **21**(3): 489-494.

102. Venneri, M. A., M. De Palma, et al. (2007). "Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer." Blood **109**(12): 5276-5285.
103. Wang, Z. Q., A. S. Bapat, et al. (2001). "Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation." Immunology **102**(3): 331-337.
104. Williams, L., G. Jarai, et al. (2002). "IL-10 expression profiling in human monocytes." J Leukoc Biol **72**(4): 800-809.
105. Wilting, J., J. Becker, et al. (2009). "Lymphatics and inflammation." Curr Med Chem **16**(34): 4581-4592.
106. Zen, Y., T. Fujii, et al. (2006). "Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas." Hepatology **44**(5): 1333-1343.
107. Zhang, H., Y. Li, et al. (2007). "Human macrophage metalloelastase expression in gastric cancer and its relationship with gastric cancer prognosis." J Exp Clin Cancer Res **26**(3): 361-366.
108. Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996). "Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation." Immunol Today **17**(9): 424-428.
109. Ziegler-Heitbrock, H. W., G. Fingerle, et al. (1993). "The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages." Eur J Immunol **23**(9): 2053-2058.
110. Ziegler-Heitbrock, H. W., B. Passlick, et al. (1988). "The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood." Hybridoma **7**(6): 521-527.
111. Ziegler-Heitbrock, H. W., M. Strobel, et al. (1991). "Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood." Pathobiology **59**(3): 127-130.
112. Ziegler-Heitbrock, H. W., M. Strobel, et al. (1992). "Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations." Blood **79**(2): 503-511.
113. Ziegler-Heitbrock, L. (2007). "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation." J Leukoc Biol **81**(3): 584-592.

7. ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ (รายละเอียดในภาคผนวก)

- 7.1 การวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่อยู่ในฐาน ISI จำนวน 2 เรื่องและอยู่ในระหว่างส่งตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง
 - 7.1.1 Subimerb C, Pinlaor S, Khuntikeo N, Leelayuwat C, Morris A, McGrath MS, Wongkham S. Tissue invasive macrophage density correlates with prognosis in Cholangiocarcinoma. Mol Med Report 2010; 3(4): 597-606.
 - 7.1.2 Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, Khuntikeo N, Okada S, McGrath M, Wongkham S. Circulating CD14+CD16⁺ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. Clin Exp Immunol 2010 (in press)
 - 7.1.3 Subimerb C, Wongkham C, Khuntikeo N, Leelayuwat C, McGrath MS, Wongkham S. Expression profiles of peripheral blood leukocytes identify patients with Cholangiocarcinoma and predict outcome (submitted to Cancer Letters)

7.2 Poster presentations

- 7.2.1 Chutima Subimerb, Viraphong Lulitanond, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Sopit Wongkham “Increased level of CD14⁺CD16⁺ monocyte in peripheral blood related to tumor type of cholangiocarcinoma” The 3rd APOCP Conference, Bangkok, Thailand. November 3-5, 2006.
- 7.2.2 Chutima Subimerb, Viraphong Lulitanond, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Michael S McGrath, Sopit Wongkham “Increased levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes in blood and infiltrating macrophages in tissue related to tumor type and prognosis of cholangiocarcinoma” Society of leukocyte biology, Boston, United state of America. October 11-13, 2007.
- 7.2.3 Chutima Subimerb, Viraphong Lulitanond, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Kenneth G headlock, Michael S McGrath, Sopit Wongkham. The expression profile of peripheral blood cells in cholangiocarcinoma patients. Princess Congress VI, Bangkok, Thailand. November 25-26, 2007.
- 7.2.4 Chutima Subimerb, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Chawalit Pairajkul, Michael S McGrath, Sopit Wongkham “High level of infiltrating macrophages related to poor prognosis of cholangiocarcinoma” The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS, Asia and Africa Science Platform Program and, The Fourth LiverCare center Symposium Infection-Immunity and Cancer; “ Infection-Immunity and Cancer” , Khon Kaen , Thailand. February 19-20, 2008.
- 7.2.5 Chutima Subimerb, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Alanna Morris, Michael S McGrath, Sopit Wongkham “The presence of recent blood derived macrophage migrants in cholangiocarcinoma tissues is associated with elevation of activated blood CD14⁺CD16⁺ cells and poor survival”. 10th World Congress on Gastro Intestinal Cancer, Barcelona, Spain. June 25-28. 2008
- 7.2.6 Chaisiri Wongkham, Chutima Subimerb, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Michael S McGrath, Sopit Wongkham “Cholangiocarcinoma associated blood transcriptome” 20th Meeting of European Society for Cancer Research (EACR), Lyon, France. July 5-8, 2008.
- 7.2.7 Chutima Subimerb, Chaisiri Wongkham, Viraphong Lulitanond, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Narong Khuntikeo, Vatcharaphong Bhudhisawasdi, Michael S McGrath, Sopit Wongkham. Differential expression profile of peripheral blood leukocytes related to invasive activity in cholangiocarcinoma. American Association for Cancer Research; “100th Annual Meeting 2009”, Denver, Colorado, United State of America. April 18-22, 2009.

7.3 Oral Presentation

- 7.3.1 Chutima Subimerb, Chaisiri Wongkham, Viraphong Lulitanond, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Narong Khuntikeo, Vatcharaphong Bhudhisawasdi, Michael S McGrath, Sopit Wongkham “Differential Expression profile of peripheral blood leukocytes related to poor survival of cholangiocarcinoma patients” RGJ-Ph.D. congress X, Chonburi, Thailand. April 3-5, 2009.

7.4 จำนวนและรายละเอียดที่ได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

- 7.4.1 “From genome-wide analysis to target therapy in cholangiocarcinoma”, Sopit Wongkham, The 1st Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for the Integration of Life, 26-27 April, 2007, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

- 7.4.2 “Cholangiocarcinoma: from bench to bedside and community”, Sopit Wongkham, 13 June, 2007, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Pitsanulok, Thailand.
- 6.4.3 “Cholangiocarcinoma: Ongoing research in Thailand”. Sopit Wongkham, Mt. Zion Cancer Research Building, University of California, San Francisco, USA. 8 May, 2007.
- 6.4.4 “Advanced Technology for Cancer Diagnosis: Role of MT and RT.”, รศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ, การประชุมสัมมนาวิชาการเนื่องในวาระมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 80 พรรษา คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยมหิดล 25-27 มิถุนายน 2550 กรุงเทพฯ
- 7.4.5 “How to conduct a research with appreciation?” Sopit Wongkham. Research Appreciation Days. 2-3 Feb, 2008, University of Naresuan, Pitsanulok, Thailand.
- 7.4.6 “Diagnostic and prognostic significance of peripheral blood cells in cholangiocarcinoma.” Sopit Wongkham, Chutima Subimrern, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Viraphong Lulitanond, Narong Khuntikeo, Kenneth G headlock, Michael S McGrath. The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and The Fourth LiverCare Center Symposium on “Infection Immunity and Cancer “, February 19-20th, 2008, Charoen Thani Princess Hotel, Khon Kaen, Thailand.
- 7.4.7 “Cholangiocarcinoma: Update for today and tomorrow”. Sopit Wongkham Biomarkers for Cholangiocarcinoma. 2 April, 2008. Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Thailand
- 7.4.8 “Can blood transcriptome represent molecular signature of cholangiocarcinoma?” Sopit Wongkham. Mini-Symposium on Cholangiocarcinoma: Update for today and tomorrow. 16 May, 2008. National Cancer Center of Singapore, Singapore
- 7.4.9 “Cholangiocarcinoma Associated Genes Targeting for a Better Treatment”. Sopit Wongkham, Kanlayanee Sawanyawisuth, Wunchana Seubwai, Mutita Junking, Banchob Sripa, Chawalit Pairojkul, Narong Khuntikeo, Vajrabhongsas Bhudhisawasdi, Chaisiri Wongkham, Michael McGrath. NSTDA-Shimadzu Joint Symposium in Life Science on “Genomics and Post-Genomics in Cancer Research” In NSTDA Annual Conference (NAC) 2008, 25th March 2008, Thailand Science Park Convention Center, Bangkok, Thailand.

ลงนาม.....

(นางโสพิศ วงศ์คำ)

หัวหน้าโครงการ

21 ตุลาคม 2553

- 7.4.2 “Cholangiocarcinoma: from bench to bedside and community”, Sopit Wongkham, 13 June, 2007, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Pitsanulok, Thailand.
- 6.4.3 “Cholangiocarcinoma: Ongoing research in Thailand”. Sopit Wongkham, Mt. Zion Cancer Research Building, University of California, San Francisco, USA. 8 May, 2007.
- 6.4.4 “Advanced Technology for Cancer Diagnosis: Role of MT and RT.”, รศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ, การประชุมสัมมนาวิชาการเนื่องในวาระมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 80 พรรษา คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยมหิดล 25-27 มิถุนายน 2550 กรุงเทพฯ
- 7.4.5 “How to conduct a research with appreciation?” Sopit Wongkham. Research Appreciation Days. 2-3 Feb, 2008, University of Naresuan, Pitsanulok, Thailand.
- 7.4.6 “Diagnostic and prognostic significance of peripheral blood cells in cholangiocarcinoma.” Sopit Wongkham, Chutima Subimrern, Chanvit Leelayuwat, Somchai Pinlaor, Viraphong Lulitanond, Narong Khuntikeo, Kenneth G headlock, Michael S McGrath. The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and The Fourth LiverCare Center Symposium on “Infection Immunity and Cancer “, February 19-20th, 2008, Charoen Thani Princess Hotel, Khon Kaen, Thailand.
- 7.4.7 “Cholangiocarcinoma: Update for today and tomorrow”. Sopit Wongkham Biomarkers for Cholangiocarcinoma. 2 April, 2008. Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Thailand
- 7.4.8 “Can blood transcriptome represent molecular signature of cholangiocarcinoma?” Sopit Wongkham. Mini-Symposium on Cholangiocarcinoma: Update for today and tomorrow. 16 May, 2008. National Cancer Center of Singapore, Singapore
- 7.4.9 “Cholangiocarcinoma Associated Genes Targeting for a Better Treatment”. Sopit Wongkham, Kanlayanee Sawanyawisuth, Wunchana Seubwai, Mutita Junking, Banchob Sripa, Chawalit Paironkul, Narong Khuntikeo, Vajrabhongsas Bhudhisawasdi, Chaisiri Wongkham, Michael McGrath. NSTDA-Shimadzu Joint Symposium in Life Science on “Genomics and Post-Genomics in Cancer Research” In NSTDA Annual Conference (NAC) 2008, 25th March 2008, Thailand Science Park Convention Center, Bangkok, Thailand.

ลงนาม.....

(นางโสพิศ วงศ์คำ)

หัวหน้าโครงการ

21 ตุลาคม 2553

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่อยู่ในฐาน ISI จำนวน 2 เรื่องและอยู่ในระหว่างส่งตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง

- 1 Subimerb C, Pinlaor S, Khuntikeo N, Leelayuwat C, Morris A, McGrath MS, Wongkham S.
Tissue invasive macrophage density correlates with prognosis in Cholangiocarcinoma. Mol
Med Report 2010; 3(4): 597-606.
- 2 Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, Khuntikeo N, Okada S, McGrath M, Wongkham S.
Circulating CD14+CD16⁺ monocyte levels predict tissue invasive character of
cholangiocarcinoma. Clin Exp Immunol 2010 (in press)
- 3 Subimerb C, Wongkham C, Khuntikeo N, Leelayuwat C, McGrath MS, Wongkham S.
Expression profiles of peripheral blood leukocytes identify patients with Cholangiocarcinoma
and predict outcome (submitted to Cancer Letters)

Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma

CHUTIMA SUBIMERB^{1,4}, SOMCHAI PINLAOR^{2,4}, NARONG KHUNTIKEO^{3,4}, CHANVIT LEELAYUWAT^{4,5}, ALANNA MORRIS⁶, MICHAEL S. McGRATH⁶ and SOPIT WONGKHAM^{1,4}

Departments of ¹Biochemistry, ²Parasitology, and ³Surgery; ⁴Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University; ⁵Department of Immunology, Faculty of Associated Medical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand; ⁶Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, CA 94110, USA

Received December 21, 2009; Accepted April 22, 2010

DOI: 10.3892/mmr_00000303

Abstract. Cholangiocarcinoma (CCA) is a high metastatic cancer with no effective treatment. Here, the pro-metastatic action of tissue macrophages in CCA is demonstrated and suggested as a prognostic marker and novel target for the therapeutic intervention of CCA. Fifty CCA tissues were immunohistochemically stained with a marker for reactive/infiltrating monocytes/macrophages (MAC387) and matrix metalloproteinase (MMP)-9. The antigenic densities in positively-stained cells along the leading edge of tumors were scored. Correlations between the densities of MAC387, MMP-9-positive cells, clinicopathological features and patient survival were investigated. High densities of MAC387-positive cells were detected in more than 60% of the CCA tissues. This was significantly associated with poor prognosis parameters (non-papillary and mass-forming type CCA). Overall survival was worst in patients with high-density MAC387-positive cells. Double immunofluorescent staining indicated that MAC387-positive cells co-expressed MMP-9. Immunohistochemical staining of MMP-9 in serial sections of CCA tissues indicated that MMP-9 was rarely expressed in CCA tumor cells, but highly expressed in MAC387-positive cells and polymorphonucleated infiltrating cells. Patients with high tissue expression levels of MAC387 in combination with MMP-9-expressing cells had the worst survival. These factors were found to be independent predictors of the post-resectional survival of CCA patients. Since CCA tumor cells rarely expressed MMP-9, it is likely that tissue macrophages are critical for degrading the extracellular matrix and for facilitating tumor metastasis. They may therefore serve as a prognostic marker for poor clinical outcome, and represent novel targets for the therapeutic intervention of CCA.

Introduction

Carcinogenesis and tumor progression are multistep processes in which genetic alterations and modifications in malignant cells may help to establish tumor-supporting microenvironments. A variety of soluble mediators (e.g., chemokines and cytokines) have been implicated in the recruitment of leukocytes to the tumor microenvironment, a process that has either been associated with tumor progression or inhibition in different types of tumors. Although all classes of leukocytes are found within tumors, the most abundant cells are tumor associated macrophages (TAMs) (1).

TAMs are diffusely found throughout tumors in localized zones, tumor edges, around the ductal areas and in the tumor stromal areas (2,3). Although macrophages under certain conditions can kill tumor cells (antitumor activity), several studies have highlighted their potential role as tumor promoters. The balance between the pro-tumorigenic and antitumorigenic properties of macrophages may depend on tumor type and organ site. TAMs are derived from circulating monocytes that infiltrate the tumor and differentiate to macrophages (1,4). MAC387, which is expressed in circulating neutrophils and monocytes, is a macrophage marker that distinguishes resident tissue macrophages from newly arrived blood migrants (5,6).

Cholangiocarcinoma (CCA), a slow growing but highly metastatic tumor, is highly prevalent in northeast Thailand. Both epidemiologic and experimental evidence implicates chronic inflammation resulting from liver fluke (*Opisthorchis viverrini*; OV) infection as the major risk factor for CCA in Thailand (7,8). The role of infiltrating leukocytes in carcinogenesis and the progression of experimental CCA is supported by the high levels of infiltrating leukocytes within the tumor tissues of OV-associated CCA hamsters (9). No study has been performed on human CCA to test whether this class of tumor contains tumor infiltrating macrophages. Whether the presence of these macrophages plays a role in pro- or anti-tumorigenic activities is unclear.

In this study, we report the association of newly infiltrated tissue macrophages (MAC387-positive cells) and TAM expressed factors – namely matrix metalloproteinase (MMP)-9

Correspondence to: Dr Sopit Wongkham, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
E-mail: sopit@kku.ac.th

Key words: macrophage, cholangiocarcinoma, MAC387, prognostic marker, survival

– with poor prognosis in CCA patients. To date, inflammatory TAMs have not been targets for therapeutic intervention. However, in for example rheumatoid arthritis, anti-inflammatory therapeutic approaches have significantly improved patient clinical outcomes. The goal of the present study was to test whether CCA, an aggressive form of tumor arising from an inflammatory environment, contains inflammatory TAMs, and to determine whether TAMs play a role in pro-tumorigenic activities and whether they may serve as important cell targets for future therapeutic intervention.

Materials and methods

Subjects and tissues. Fifty paraffin-embedded blocks were obtained from the specimen bank of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Informed consent was obtained from each subject, and the Human Research Ethics Committee of Khon Kaen University approved the research protocol (HE471214 and HE480312). Age, gender, tumor location, histological grading and pTNM stage were evaluated by reviewing the medical charts and pathological records.

Immunohistochemistry studies. Specimens were fixed in 10% neutral formalin buffer, embedded in paraffin and cut into 5- μ m-thick sections. Immunohistochemical staining was performed by an immunoperoxidase method using mouse monoclonal anti-human myeloid/histocyte antigen (MAC387 clone; Dako, Glostrup, Denmark) and rabbit monoclonal anti-human MMP-9 (Dako). Each section was deparaffinized and re-hydrated with antigen retrieval citrate buffer (pH 6), and endogenous peroxidase was blocked with hydrogen peroxide in methanol. The serial sections were incubated with 1:200 MAC387 for 30 min or 1:100 anti-human MMP-9 overnight, followed by the addition of Envision labeled polymer peroxidase (Dako) for 30 min. After washing, the sections were reacted with liquid 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate chromogen system (Dako). All slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. Paraffin-embedded sections of human tonsil and colon cancer tissue sections were used as positive controls for MAC387 staining and MMP-9 staining, respectively.

The densities of MAC387 and MMP-9-positive cells at the leading edge of invasive tumor were semi-quantitatively classified into four scoring categories: 0, negative; 1⁺, 1-25%; 2⁺, 26-50%; and 3⁺, >50%. The specimens were evaluated by two researchers without any knowledge of prognosis or clinicopathologic variables. For statistical analysis, the scores 0 and 1⁺ were categorized as low expression (or negative), and the scores 2⁺ and 3⁺ as high expression (or positive).

Double immunofluorescence-labeling method. A modified double immunofluorescence-labeling method was performed to examine the co-localization of human myeloid/histocyte antigen with MMP-9. Heat-mediated antigen retrieval was performed in a pressure cooker with citrate buffer (pH 6) and 0.05% Tween-20 for 3 min. The sections were cooled to room temperature for 30 min then incubated with the primary antibodies at room temperature overnight. The co-localization of MMP-9 and MAC387 in CCA tissue was assessed using 1:100

of rabbit polyclonal anti-human MMP-9 and 1:200 of mouse monoclonal anti-MAC387. The sections were incubated for a further 3 h with 1:400 of Alexa 488-labeled goat antibody against rabbit IgG and an Alexa 568-labeled goat antibody against mouse IgG (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). The stained sections were examined using a fluorescence microscope.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using SPSS statistical software version 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and STATA version 8. Cross tabulations were analyzed with the χ^2 -test for associations between MAC387 and MMP-9 expression and the clinicopathological features of CCA patients. Kaplan-Meier survival analysis was used to estimate disease-specific survival, and comparisons between groups were performed using the log-rank test. Multivariate survival analysis was used to investigate the importance of MAC387 and MMP-9 expression in comparison to other prognostic parameters. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The mean age of the CCA patients recruited to the study ($n=50$) was 56 years (range 33-75). The ratio of men to women was 1.17 to 1. Tissues were obtained during liver resection for CCA. None of the patients received radiotherapy or chemotherapy prior to the surgery. Tumor staging was based on the American Joint Committee on Cancer classification (10). The clinicopathological features of the patients are shown in Table I. Patients with CCA stages I-III ($n=36$) received a resection with curative intention, whereas patients with stage IV CCA ($n=14$) underwent palliative surgery to relieve jaundice, debulk the tumor and achieve an improved quality of life. The survival of each CCA patient was recorded from the date of surgery to the date the patient succumbed to the disease or to June 13, 2008. Only patients with CCA stages I-III were included in the survival analysis. The median duration for follow-up was 299 days. The median overall survival was 386 days and the overall survival rate was 52% at one year post-surgery.

MAC387-positive cells in CCA tissues and clinical significance. Immunohistochemistry of 50 CCA tissues revealed that MAC387-positive cells were distributed throughout the tumor-involved liver tissue, including the leading edge of invasive tumor, tumor parenchyma (Fig. 1A) and perivascular areas. The majority of MAC387-positive cells were located in apparent direct contact with or immediately adjacent to tumor cells at the edge of invasive tumor (Fig. 1B). MAC387-positive cells were also present in regions of necrosis. Although the highest density of MAC387-expressing cells was at the tumor edge, they were also frequently present in perivascular areas of tumors (Fig. 1C). As MAC387 stains blood-derived macrophage migrants, these perivascular cells may represent the most recent blood-derived monocytes in CCA tissues.

Since MAC387-positive cells were found in high quantities at the leading edge of the tumor, we quantitatively analyzed the correlation between the density of MAC387-positive cells in this region and the clinicopathological parameters using a univariate analysis. High numbers of MAC387-positive cells were significantly associated with poor survival outcomes, namely

Table I. Density of MAC387-positive cells in cholangiocarcinoma (CCA) tissues in relation to the clinicopathological features of the patients.

Variable	MAC387-positive cells			P-value
	No.	Low (%)	High (%)	
Age				0.608
<56	26	9 (34.6)	17 (65.4)	
≥56	24	10 (41.7)	14 (58.3)	
Gender				0.879
Female	23	9 (39.1)	14 (60.9)	
Male	27	10 (37.0)	17 (63.0)	
Tumor location				0.610
Intrahepatic CCA	32	13 (40.6)	19 (59.4)	
Extrahepatic CCA	18	6 (33.3)	12 (66.7)	
Gross morphology				0.047
Mass forming type	24	7 (29.2)	17 (70.8)	
Periductal infiltrating type	20	7 (35.0)	13 (65.0)	
Intraductal growth type	6	5 (83.3)	1 (16.7)	
Tumor stage				0.091
I-II	13	8 (61.5)	5 (38.5)	
III	23	8 (34.8)	15 (65.2)	
IV	14	3 (21.4)	11 (78.6)	
Histological type				0.006
Non-papillary	35	9 (25.7)	26 (74.3)	
Papillary	15	10 (66.7)	5 (33.3)	
Vascular invasion				0.198
Absent	37	14 (32.4)	23 (67.6)	
Present	13	3 (23.1)	10 (76.9)	

the non-papillary ($P=0.006$), mass forming and periductal infiltrating types of CCA ($P=0.047$) (Table I). There was no correlation between the density of MAC387-positive cells and gender, age, tumor location, tumor staging or vascular invasion.

High density of MAC387-expressing cells and poor patient survival. Kaplan-Meier and log-rank tests were used to determine the overall survival of CCA patients with low vs. high expression of MAC387 at the tumor edge. No patients with perioperative death (survival <30 days) were included in the analysis. Overall, the post-resectional survival of patients with CCA stages I-III was significantly reduced in patients with high levels of MAC387-positive cells (mean survival 380 days; 95% CI 228-531 days) compared to those with a low density of MAC387-positive cells (mean survival 679 days; 95% CI 541-817 days; $P=0.01$) (Fig. 2). The overall survival rates were 35 and 75% at 1 year post-surgery for patients with high and low levels of tissue MAC387-positive cells, respectively.

Age, gender, tumor location, tumor type and vascular invasion had no influence on survival. However, overall survival was significantly decreased in patients with advanced stage tumors (stages III and IV), non-papillary type CCA or a high density of MAC387-positive cells (Table II).

MMP-9 expression in MAC387-positive cells. Since the significance of the high density of MAC387-expressing cells at the leading edge of invasive tumor was observed to be associated with poor survival parameters and shorter survival in CCA patients, we further analyzed whether MAC387-positive cells co-expressed MMP-9, a factor known to play a significant role in tumor invasion. Double immunofluorescent analyses were performed on CCA tissues positive for the MMP-9 antibody together with MAC387. MAC387-positive cells with co-expression of MMP-9 were found in the highest quantities at the leading edge of the tumor and tumor-involved tissue areas (Fig. 3A and B). Scattered MAC387-positive cells with MMP-9 expression were also observed in non-tumor tissue.

Serial sections of CCA tumor tissues were examined for MAC387 and MMP-9 expressing cells by immunohistochemistry. Although MMP-9 was observed in cells with tissue invasion characteristics, the antigen was rarely observed in CCA cells. Only 6% (3/50) of CCA tissues were positive, with weak immunostaining, for MMP-9. By contrast, MMP-9 was significantly expressed in tissue-infiltrating leukocytes, especially monocyte-macrophages and polymorphonucleated cells. The distribution of MMP-9-positive cells within CCA tissues was similar to that of

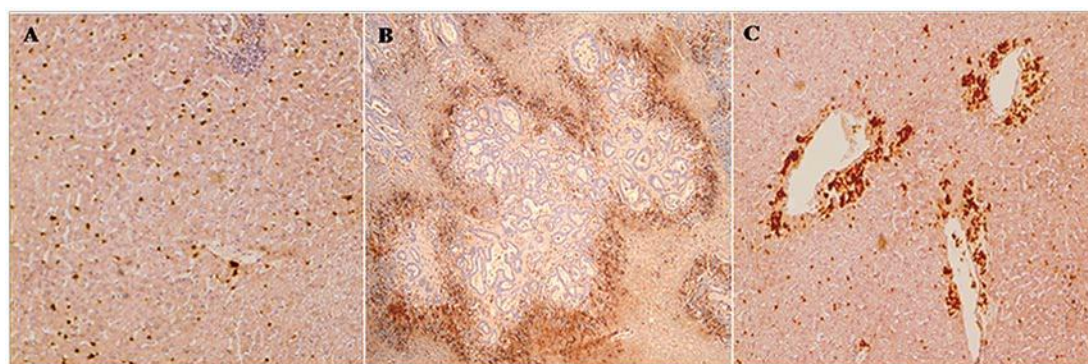


Figure 1. Distribution and density of MAC387-positive cells in CCA tissue detected by immunostaining. (A) Non-malignant liver tissue (x10 HP). (B) Leading edge of invasive tumor (x4 HP). (C) Perivascular areas (x10 HP).

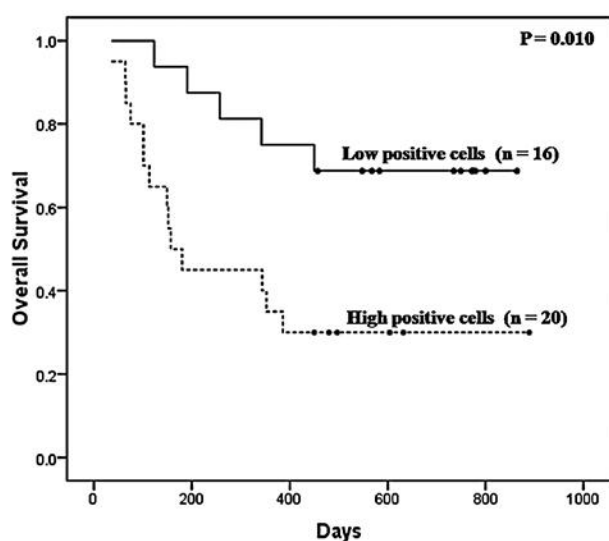


Figure 2. Survival curves using Kaplan-Meier analysis for patients with CCA stages I-III. CCA patients with a low density of MAC387-positive cells had a better survival than those with a high density of MAC387-positive cells. Black circles indicate censor cases.

MAC387-positive cells. High levels of MMP-9-positive cells were found at the CCA tumor invasive edge. A high density of MMP-9-expressing cells was found in 44% (22/50) of the CCA patients, and was significantly associated with a high density of MAC387-positive cells ($P < 0.001$).

Multivariate Cox proportional hazard analysis. Finally, we statistically assessed the overall post-resectional survival of CCA patients in relation to the cell density of MAC387 and MMP-9-positive cells. Multivariate analysis was performed to explore the importance of monocyte/macrophage (MAC387-expressing cells) in comparison to other prognostic parameters. Cox proportional hazards analysis in the multivariate analysis model was performed, taking into account age, histological tumor type, tumor staging, MAC387-positive cell density and the density of cells co-expressing MAC397 and MMP-9 (MAC387⁺ MMP-9⁺). Only age, tumor type and the density of cells expressing MAC387 and MMP-9 were identified as independent prognostic markers for patients with CCA (Table III).

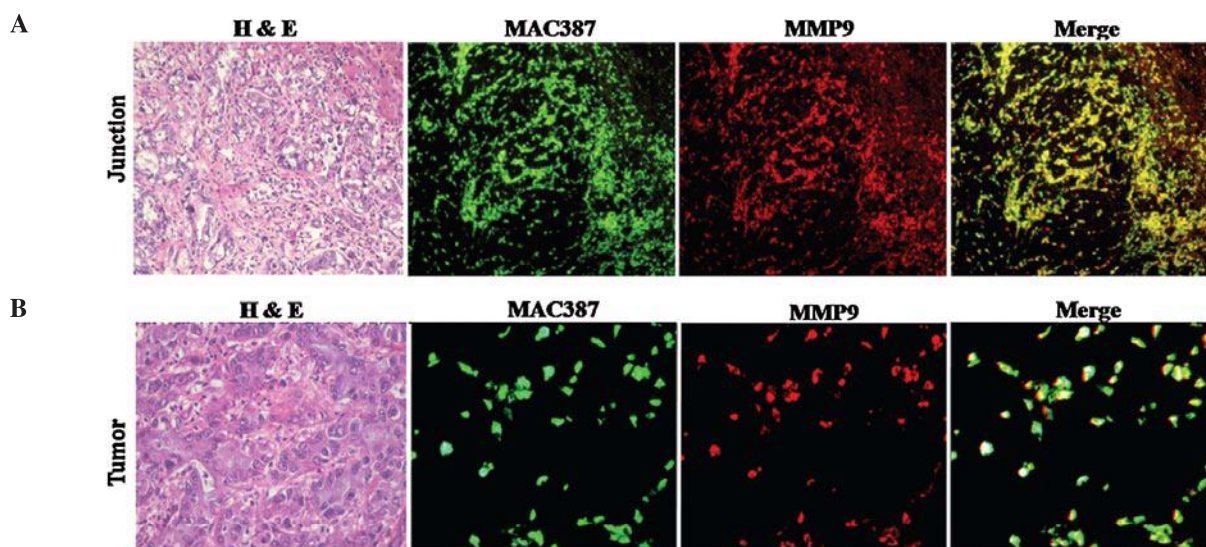


Figure 3. Co-expression of MAC387-positive cells with MMP9 detected by immunostaining at the (A) leading edge junction (x20 HP) and (B) tumor area of cholangiocarcinoma tissue (x40 HP).

Table II. Factors influencing overall survival of cholangiocarcinoma (CCA) patients.

Variable	Hazard ratio	P-value	95% CI
Age			
<56	1		
≥56	1.645	0.161	0.819, 3.301
Gender			
Female	1		
Male	1.079	0.829	0.538, 2.163
Tumor location			
Extrahepatic CCA	1		
Intrahepatic CCA	0.990	0.979	0.484, 2.067
Gross morphology			
Mass forming type	1		
Periductal infiltrating type	0.894	0.757	0.441, 1.815
Intraductal growth type	0.145	0.061	0.019, 1.093
Tumor stage			
I-II	1		
III	4.201	0.023	1.219, 14.471
IV	8.549	0.001	2.390, 30.567
Histology type			
Non-papillary	1		
Papillary	0.262	0.006	0.1001, 0.685
Vascular invasion			
Absent	1		
Present	1.455	0.326	0.688, 3.078
MAC387-positive cells			
Low	1		
High	2.821	0.012	1.259, 6.323

Table III. Multivariate analysis by a Cox proportional hazards regression model in cholangiocarcinoma (CCA) patients.

Variable	Crude hazard ratio	Adjusted hazard ratio	95% CI	P-value ^a
Age				
<56	1	1		
≥56	1.645	2.34	1.09, 5.00	0.02
Histology type				
Non-papillary	1	1		
Papillary	0.262	0.36	0.12, 1.06	0.04
Tumor stage				
I-II	1	1		
III	4.201	2.11	0.55, 8.02	0.08
IV	8.549	3.89	0.99, 15.25	
MAC387-positive cells				
Low	1	1		
High	2.821	0.61	0.18, 2.12	0.43
MAC387 + MMP-9-positive cells				
Low	1	1		
High	5.11	5.55	1.07, 28.76	0.03

^aPartial likelihood ratio test.

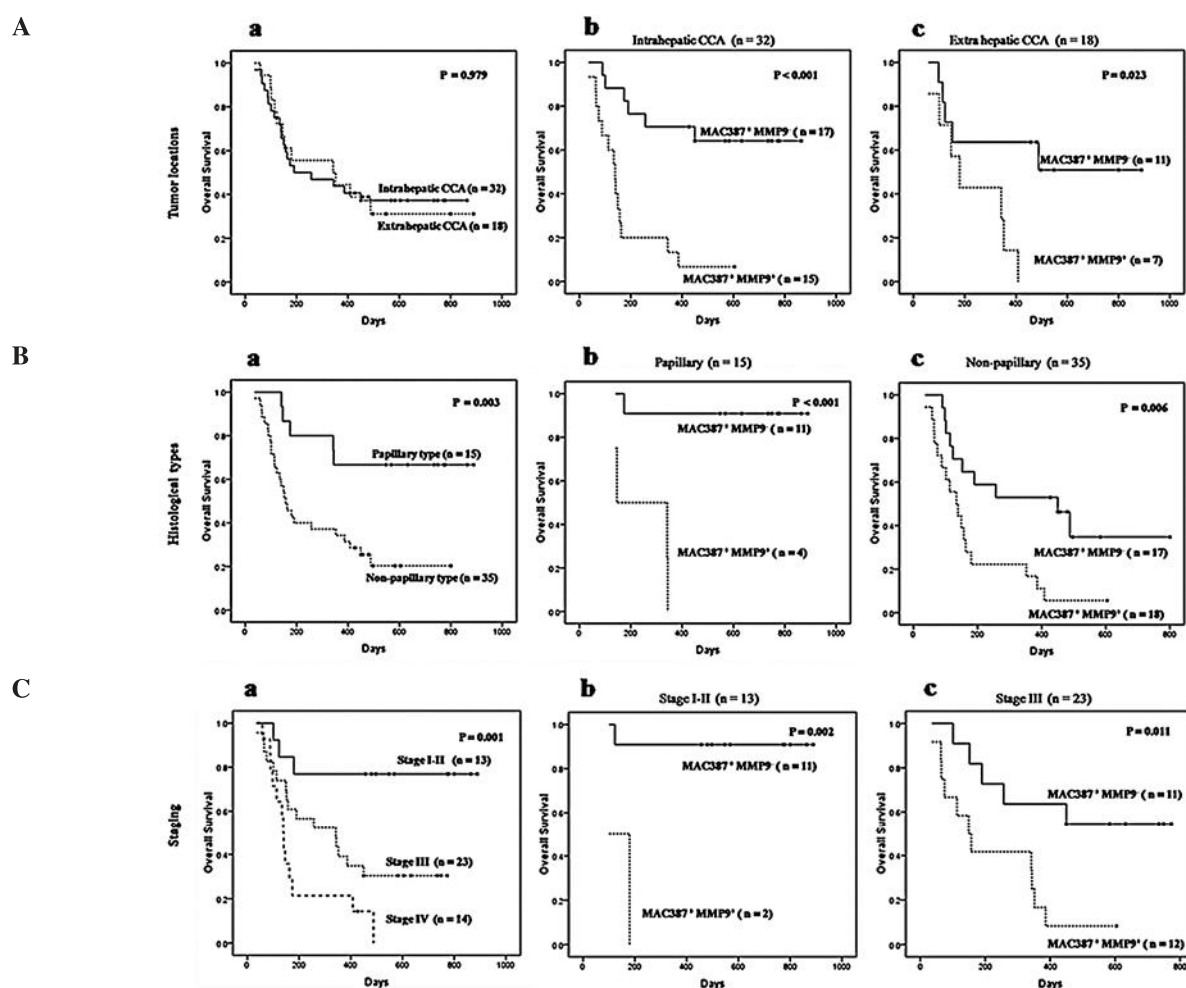


Figure 4. Prognostic significance of MAC387⁺ MMP-9⁺ cells in CCA tissue. Cumulative overall survivals was determined using Kaplan-Meier analysis for CCA patients with MAC387⁺ MMP-9⁺ cells vs. those with MAC387⁺ MMP-9⁻ cells in relation to (A) tumor location, (B) histological type and (C) tumor stage. Black circles indicate censor cases.

MAC387 and MMP-9 expression and poor prognosis. CCAs are heterogeneous. Tumor location, histological type and staging have been shown to have prognostic significance in determining the overall survival of patients. In the present study, multivariate analysis by a Cox proportional hazards regression model indicated that a high density of cells expressing MAC387 in conjunction with MMP-9 in CCA tissue is an independent factor in poor patient outcome. For further analysis, Kaplan-Meier survival curves were plotted in order to investigate the influence of the MAC387⁺ MMP-9⁺ cells on the overall survival of patients in relation to each prognostic parameter. Log-rank statistical analysis was used to compare the survival rate in patients with MAC387⁺ MMP-9⁺ cells to that in patients with MAC387⁺ MMP-9⁻ cells. Regardless of tumor location, histological type and tumor staging, patients with a high density of MAC387⁺ MMP-9⁺ cells had a significantly shorter survival than those with MAC387⁺ MMP-9⁻ cells (Fig. 4). Mean survival times stratified according to MAC387⁺ MMP-9⁺ cells vs. MAC387⁺ MMP-9⁻ cells are summarized in Table IV. There was an inverse association between MAC387⁺ MMP-9⁺ cells and the survival of patients with intrahepatic CCA. Similar associations were found for patients with extrahepatic CCA, papillary or non-papillary type CCA, or CCA stages I-II and III. However, MAC387⁺ MMP-9⁺ cells had no prognostic significance in stage IV patients.

Discussion

Tissue macrophages are the major class of infiltrating leukocytes in solid tumors (1) and are known to play an inhibitory or promotional role in tumorigenesis (1,11,12). In the present study, we determined the degree of MAC387 expression in CCA tissue, which represented a subset of recent blood-derived reactive/infiltrating monocytes/macrophages, but not Kupffer cells (6,13,14). The relationship of these cells to clinicopathological factors and post-operative survival was also examined.

The data demonstrate that a high density of MAC387-positive cells at the leading edge of invasive tumor was significantly associated with the non-papillary, mass forming and periductal infiltrating types of CCA. These observations suggest that a high density of MAC387-positive cells is correlated with an undesirable outcome, since the present study (Table II) and previous reports show that these parameters are poor prognostic indicators of CCA (15-17). The correlation between high levels of MAC387 expression and poor prognosis was again emphasized with the finding that an incremental increase in the density of MAC387-positive cells was inversely related to CCA patient survival. Patients with a high density of MAC387 cells had a significantly worse

Table IV. Comparison of mean survival times of cholangiocarcinoma (CCA) patients according to the presence of MAC387-positive cells with or without co-expressing MMP-9.

Variable	No.	Mean survival time (days)		P-value
		Mean	95% CI	
Intra and extra-hepatic CCA				
Intra-hepatic CCA				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	17	631	478-784	<0.001
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	15	177	102-251	
Extrahepatic CCA				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	11	558	344-773	0.023
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	7	226	124-329	
Histological types				
Papillary type				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	11	824	702-945	<0.001
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	4	243	130-356	
Non-papillary type				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	17	430	282-578	0.006
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	18	181	112-250	
Tumor stage				
Stage I-II				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	11	819	689-949	0.002
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	2	140	63-217	
Stage III				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	11	526	359-693	0.011
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	12	223	127-320	
Stage IV				
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁻	6	242	84-399	0.259
MAC387 ⁺ MMP-9 ⁺	8	159	86-233	

overall post-resectional survival than those with a low tissue density of MAC387. This indicates the pro-tumorigenic role of these recent blood-derived migrant-macrophages in CCA. The association of TAMs with poor patient outcome has been reported in patients with various types of cancer (18,19).

The pro-tumorigenic functions of TAMs in certain types of cancer are related to their differentiation state as M2-polarized macrophages releasing various factors supporting tumor growth, metastasis, angiogenesis, tissue remodeling and the suppression of adaptive immunity (19-23). One key mechanism by which macrophages promote invasion and metastasis involves the production of protease enzymes for the digestion of the extracellular matrix. This tissue digestion subsequently facilitates cancer cell migration and tissue invasion (23). Serine proteases and MMPs are thought to be the principle activators of MMP precursors *in vivo*. Normally, the proteolytic activities of MMPs are regulated via MMP synthesis balancing between activators and inhibitors of precursor proenzymes. The proteinase-proteinase cascade is initiated by the activation of plasmin by uPA, which then activates proMMP-3 (MMP-3 precursor) to MMP-3. MMP-3 in turn activates MMP-9 (24,25). The association of MMP-9 expression within tumors with tumor invasion, metastasis and poor prognosis for CCA patients has

been demonstrated in numerous studies. A similar association and shorter survival of patients with high MMP-9 expression has been observed in hepatocellular and colorectal carcinoma and renal cancers (16-28). The cellular location of these tissue-invasion molecules has always been assumed to be within cancer cells or tissue macrophages. However, in the present study, these factors localized primarily with tissue-invasive MAC387-expressing recent blood-derived monocytes/macrophages.

There is now a large body of evidence implicating tissue macrophages as an important site for the production of MMP-9 during tumor metastasis. Our finding, that CCA specimens with a high density of MAC387-positive cells at the tumor invasive edge was associated with poor prognostic parameters and metastatic stages in CCA, encouraged us to investigate the involvement of MAC387-positive cells in enhancing protease bioactivity – namely MMP-9 expression in CCA tissues. In the present study, we observed a very strong correlation between the presence of high levels of MAC387-positive cells in CCA regions and the high expression of MMP-9. Double immunofluorescence studies confirmed that, in most cases, MMP-9 immunoreactivities co-localized with MAC387-positive cells, indicating that MAC387-expressing macrophages were the major site of tumor-associated MMP-9 expression (Fig. 3).

The recent blood-derived migrant macrophages (MAC387-positive cells) may have direct activity in promoting tissue invasion in CCA. The co-expression of MAC387 with MMP-9 may be responsible for tissue remodeling by degrading the extracellular matrix of surrounding tissue, resulting in a microenvironment favourable to tumor cell invasion. This assumption is supported by the observation that CCA tumor cells rarely expressed tissue invasion molecules (MMP-9) as compared to the MAC387-positive cells. In addition, MAC387⁺ MMP-9⁺ cells were observed in non-tumor tissue adjacent to the tumor front.

In this study, the presence of high levels of MAC387 and MMP-9 in the leading edge of the tumor was an indicator of an unfavorable outcome, with a 3- to 5-fold shorter survival time. Notably, patients whose tissues were negative for these markers had the best survival. The influence of MAC387⁺ MMP-9⁺ cells on the unfavorable outcome of CCA patients was again emphasized in the multivariate analysis, which showed that the presence of MAC387⁺ MMP-9⁺ cells in CCA tissue was an independent prognostic marker in a Cox proportional hazards analysis for the post-resectional survival of CCA patients (Table III). These data favor a model wherein MAC387-positive recent blood-derived macrophages promote tumor invasion by degrading the extracellular matrix via MMP-9 activities. The pro-metastatic role of MAC387⁺ cells is further supported by our finding that MAC387⁺ MMP-9⁺ cells are an independent prognostic marker for an unfavorable outcome in a CCA regardless of tumor location, type or stage.

Metastasis is a multistep process in which cancer cells spread within local organs and subsequently throughout the body. To facilitate this tissue-invasion process, tumor cells must have associated tissue degradative enzymes. In the present study, we identified the predominant pro-tumorigenic cell in CCA to be recent blood-derived macrophages co-expressing the macrophage marker MAC387 and the tissue-invasion associated molecule MMP-9. These cells, through their proteolytic activities, may play the most important role in tumor progression in patients with CCA, signified by the shortened survival of patients expressing high levels of these two markers. This is the first study to directly implicate recent blood-derived macrophage expression of tissue invasion molecules in the pathogenesis of metastatic cancer. The study also suggests that approaches directed at this population of tissue invasion-promoting macrophages may be useful as an adjunctive therapy for this class of highly metastatic cancer. For example, recent studies on breast cancer implicated osteopontin (a major macrophage attractant) in metastasis, and suggested that the knockout of osteopontin expression may block metastasis. However, previously osteopontin had mainly been implicated in tissue invasion/inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, another disease highly associated with MAC387 invasion (29-31). Clearly, if CCA (an incurable highly-invasive cancer) is associated with MAC387 invasion, novel immunomodulatory approaches such as those being examined in inflammatory diseases should be studied. As a final point, determining the level of MAC387-expressing cells and their protease product (MMP-9 expression) may be a useful metastatic stage prognostic marker in CCA patients, and lead to the development of novel approaches to address this important tumor invasion-associated cell population.

Acknowledgements

This study was supported by the Basic Research Grant, Thailand Research Fund (BRG-4980015); the Royal Golden Jubilee-PhD Program to C. Subimerb and S. Wongkham (PHD/0091/2547), and the US National Cancer Institute AIDS and Cancer Specimen Resource funding (U01CA 066529-14) to M. McGrath.

References

1. Balkwill F and Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539-545, 2001.
2. Lee AH, Happerfield LC, Bobrow LG and Millis RR: Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 50: 669-673, 1997.
3. Goede V, Brogelli L, Ziche M and Augustin HG: Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* 82: 765-770, 1999.
4. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET and Lewis CE: Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70: 478-490, 2001.
5. Goebeler M, Roth J, Teigelkamp S and Sorg C: The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14. *J Leukoc Biol* 55: 259-261, 1994.
6. Brandtzaeg P, Jones DB, Flavell DJ and Fagerhol MK: Mac387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. *J Clin Pathol* 41: 963-970, 1988.
7. Bhamarapravati N and Thamavit W: Animal studies on liver-fluke infestation, dimethylnitrosamine and bile duct carcinoma. *Lancet* 1: 206-207, 1978.
8. Vatanasapt V, Tangvoraphonkchai V, Titapant V, Pipitgool V, Viriyapap D and Sriamporn S: A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21: 489-494, 1990.
9. Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, *et al.*: Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric Oxide* 11: 175-183, 2004.
10. Greene FL, Page DL, Fleming ID, *et al.*: *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th edition. Springer-Verlag, New York, 2002.
11. Mantovani A, Allavena P and Sica A: Tumor-associated macrophage as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumor progression. *Eur J Cancer* 40: 1660-1667, 2004.
12. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, *et al.*: Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211: 487-501, 2006.
13. Pulford KA, Rigney EM, Micklem KJ, *et al.*: KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 42: 414-421, 1989.
14. Bardadin KA, Scheuer PJ, Peczek A and Wejman J: Immunocytochemical observations on macrophage populations in normal fetal and adult human liver. *J Pathol* 164: 253-259, 1991.
15. Uenishi T, Hirohashi K, Kubo S, Yamamoto T, Yamazaki O and Kinoshita H: Clinicopathological factors predicting outcome after resection of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 88: 969-974, 2001.
16. Leong TYM, Wannakrairot P, Lee ES and Leong AS-Y: Pathology of cholangiocarcinoma. *Curr Diag Pathol* 13: 54-64, 2007.
17. Isa T, Kusano T, Shimoji H, Takeshima Y, Muto Y and Furukawa M: Predictive factors for long-term survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 181: 507-511, 2001.
18. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, *et al.*: Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 23: 4079-4083, 2003.
19. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P and Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549-555, 2002.
20. Ben-Baruch A: Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 5: 31-36, 2003.

21. Bingle L, Brown NJ and Lewis CE: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196: 254-265, 2002.
22. Leek RD and Harris AL: Tumor-associated macrophages in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7: 177-189, 2002.
23. Pollard J: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4: 71-78, 2004.
24. Ogata Y, Itoh Y and Nagase H: Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem* 270: 18506-18511, 1995.
25. Morodomi T, Ogata Y, Sasaguri Y, Morimatsu M and Nagase H: Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem J* 285: 603-611, 1992.
26. Inuzuka K, Ogata Y, Nagase H and Shirouzu K: Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and 9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma. *J Surg Res* 93: 211-218, 2000.
27. Kim TD, Song KS, Li G, *et al*: Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 6: 211, 2006.
28. Illemann M, Bird N, Majeed A, *et al*: MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res* 4: 293-302, 2006.
29. Nemoto H, Rittling SR, Yoshitake H, *et al*: Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues. *J Bone Miner Res* 16: 652-659, 2001.
30. Xu G, Sun W, He D, *et al*: Overexpression of osteopontin in rheumatoid synovial mononuclear cells is associated with joint inflammation, not with genetic polymorphism. *J Rheumatol* 32: 410-416, 2005.
31. Zheng W, Li R, Pan H, *et al*: Role of osteopontin in induction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 β through the NF- κ B and MAPK pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60: 1957-1965, 2009.

Circulating CD14⁺CD16⁺ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma

C. Subimerb,* S. Pinlaor,[†]
V. Lulitanond,[‡] N. Khuntikeo,[§]
S. Okada,[¶] M. S. McGrath^{**} and
S. Wongkham*

**Department of Biochemistry, and Liver fluke
and Cholangiocarcinoma Research Center,*

*[†]Department of Parasitology, and Liver fluke
and Cholangiocarcinoma Research Center,*

*[‡]Department of Microbiology, and [§]Department
of Surgery, and Liver fluke and
Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of
Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen,
Thailand, [¶]Division of Hematopoiesis, Center for
AIDS Research, Kumamoto University, Japan,
and ^{**}Department of Laboratory Medicine,
University of California, San Francisco, CA, USA*

Accepted for publication 26 April 2010

Correspondence: S. Wongkham, Department of
Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen
University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

E-mail: sopit@kku.ac.th

Summary

Chronic inflammation as a risk factor for cancer development is driven in part by monocyte/macrophages, which in many cancers exhibit pro-tumorigenic activity. In this study we identified elevation in CD14⁺CD16⁺, a minor blood monocyte subpopulation in cholangiocarcinoma (CCA) patients, compared to normal and biliary disease patient specimens. Tumour association was suggested by the observation that this elevated level decreased to normal after tumour resection. Moreover, the elevated level of CD14⁺CD16⁺ monocytes in CCA patient blood correlated with degree of MAC387-positive (recent blood-derived macrophage migrant-specific marker) tumour-associated macrophage infiltration as determined by immunohistochemistry. These CD14⁺CD16⁺ monocytes were suggested to enhance tumour progression as this subpopulation possesses (i) high expression of adhesion molecules (CD11c, CD49d, and CD54) and scavenger receptor (CD163), which enable them to adhere strongly to endothelial cells, and (ii) that peripheral blood monocytes from CCA patients express high levels of growth and angiogenic factor-related genes (epiregulin, VEGF-A and CXCL3). Elevation of peripheral CD14⁺CD16⁺ monocyte levels was associated with features associated with poor prognosis CCA parameters (non-papillary type and high number of tissue macrophages). These data indicate that the CD14⁺CD16⁺ monocytes from CCA patients with pro-tumorigenic characteristics may associate with rapid tumour progression and poor patient outcome. If confirmed in subsequent studies, the level of CD14⁺CD16⁺ monocytes may serve as a marker for disease activity in CCA patients and serve as a target for pathogenic macrophage specific drug development.

Keywords: CD14⁺CD16⁺ monocyte, cholangiocarcinoma, pro-tumorigenicity

Introduction

It is well documented that chronic inflammation contributes to cancer development and disease progression in different types of solid tumour. Macrophages represent the major class of immune cells within the tumour microenvironment [1,2], and have been shown to exhibit pro-tumoral function [3]. The associations of tumour-associated macrophages (TAMs) with poor patient outcome have been reported for patients with various cancers [4–6].

It is generally accepted that blood monocytes, a heterogeneous cell population, are precursors of tissue macrophages. Monocytes participate in pro- or anti-inflammatory conditions depending upon their state of differentiation and activation [7]. The majority of monocytes express cell surface

CD14 (CD14⁺CD16[−]) and are thought to represent classical monocytes that mediate inflammatory responses ('inflammatory' monocytes). A minor subpopulation of monocytes also express the cell surface activation marker CD16, identifying them as more mature than the CD14⁺CD16[−] subpopulation. CD14⁺CD16⁺ monocytes are thought to be the precursors of tissue-resident macrophages and are referred to as 'resident' monocytes [8–13].

The functional significance of CD14⁺CD16⁺ monocytes is unclear. CD14⁺CD16⁺ monocytes have been documented to have proinflammatory activity, as they produce tumour necrosis factor (TNF)- α after lipopolysaccharide stimulation [14,15]. In addition, CD14⁺CD16⁺ cells have been shown to participate in anti-tumour responses as judged by the enhanced production of proinflammatory cytokines

[TNF- α , interleukin (IL)-12p40 and IL-12p70], reactive nitrogen intermediate and increased cytotoxic and cytostatic activity [16]. Conversely, in certain disease states CD14⁺CD16⁺ monocytes have been shown to promote tumour growth and express the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) Tie 2-associated angiogenic activity [17].

The CD14⁺CD16⁺ subset of monocytes in healthy individuals varies from 3% to 13% of all CD14⁺ cells [14,18–21], but this proportion has been shown to increase in a number of acute and chronic inflammatory syndromes, such as acquired immune deficiency syndrome (AIDS) [22], bacterial sepsis [23], solid cancer [24], AIDS dementia [25], acute and chronic infection undergoing haemodialysis [26] and sporadic amyotrophic lateral sclerosis [27].

Cholangiocarcinoma (CCA), a malignancy of bile duct epithelial cells lining the intrahepatic and extrahepatic bile duct, is now increasing both in worldwide incidence and mortality rate [28]. CCA is found more frequently in South-east Asia, with the highest prevalence in the Northeast of Thailand. Both epidemiology and experimental evidence implicate chronic inflammation from the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* (OV), which is endemic in this region, as a major risk factor for CCA in Thailand [29]. High levels of infiltrating leucocytes within tumour tissues in the OV infection-associated CCA hamster model support the role of chronic inflammation in carcinogenesis and progression of CCA [30].

As TAMs derive from circulating monocytes that infiltrate tumour tissues and differentiate to macrophages, in the present study we have examined peripheral blood mononuclear cells from CCA patients to determine whether monocytes from CCA patients exhibited pro-tumorigenic activity and whether an activated monocyte subset, CD14⁺CD16⁺ monocytes, occurred more often in patients with CCA. In this study, we describe the correlation of CD14⁺CD16⁺ monocyte levels with clinicopathological features and survival of CCA patients.

Materials and methods

Blood samples

Heparinized blood was collected from three subject groups, namely healthy subjects ($n = 46$), patients with benign biliary tract disease (BBD, $n = 18$) and CCA patients ($n = 44$). Specimens from histologically confirmed CCA and BBD patients were obtained from Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University after appropriate human subjects approvals were in place. Pre- and two 6-month post-operative blood samples were collected from five CCA subjects after tumour resection without additional treatment. Specimens from healthy subjects were obtained from the Health Check-up Unit, Srinagarind Hospital, and were age- and sex-matched with CCA patients. These normal

controls had normal complete blood counts and liver function tests, and had no apparent chronic inflammatory diseases such as diabetic mellitus or hepatitis. Informed consent was obtained from each subject and the Human Research Ethics Committee, Khon Kaen University approved our research protocol (HE471214 and HE480312).

The age, gender, tumour location, histological grading and pathological tumour–node–metastasis (pTNM) stage were evaluated by reviewing the medical charts and pathological records. Survival of each CCA patient was recorded from the date of surgery to the date of death or to 13 June 2008.

Monocyte preparation

Heparinized blood was diluted with an equal volume of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free phosphate-buffered saline (PBS). The diluted blood (2 vol) was overlaid on 1 vol of Ficoll Hypaque (Axis-Shield, Oslo, Norway). After centrifugation at 350 *g*, at room temperature for 20 min, cells at the plasma/Ficoll Hypaque interface were transferred and washed with PBS. After centrifugation (600 *g* for 5 min), the left-over red blood cells were lysed with 5 ml red blood cell (RBC) lysis buffer for 3 min and the suspension was centrifuged at 600 *g* for 5 min. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected and suspended in RPMI-1640 with 10% fetal bovine serum (FBS). The PBMCs (5×10^6) were incubated at 37°C for 3 h in a 10-cm plastic tissue culture dish to obtain adherence of monocytes. The non-adherent lymphocytes were washed out by two successive rinses with warm medium. These preparations contained at least 90% monocytes as assessed by immunofluorescent staining with antibody to the CD14 antigen.

Measurement of mRNA expression by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA extraction was performed using Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Total RNA (500 ng) in 25 μ l of sterile distilled water was heated at 65°C for 10 min and chilled on ice for 2 min. The RNA solution was then transferred into a tube containing first-strand reaction mixed beads (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), 0.5 μ M random hexamer and sterile distilled water to a final volume of 33 μ l. Reverse transcription was carried out in a 37°C water bath for 1 h.

Transcription copy number for a specific gene of interest (*EREG*, *VEGFA*, *CXCL3* and *CXCL10* and internal control; β -actin) was measured using an adaptation of a two-step real-time RT-PCR method. PCR was performed with ~25 ng cDNA sample using SYBR[®] Green PCR Master Mix assay with the ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplifications included one cycle of template denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 45 s. The presence of a single amplified product was confirmed by

DNA melting-point analysis. Threshold cycles (Ct) for each amplification reaction were determined using the 7500 System SDS software version 1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The gene-specific primers for individual samples were normalized to signals obtained with β -actin from the same sample. Relative change in gene expression of CCA patients and healthy subjects was analysed using the $2^{-\Delta Ct}$ method, where $\Delta Ct = (\text{average } Ct_{\text{target}} - \text{average } Ct_{\text{actin}})$. Significant differences between groups were analysed by Student's *t*-test.

Flow cytometry for monocyte subset

Approximately 1×10^6 cells from heparinized blood were stained immediately using a stain-and-then-lyse direct immunofluorescence technique with CD14 fluorescein isothiocyanate (FITC) and CD16 phycoerythrin (PE) (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's specification. At least 5000 cells were counted per analysis for CD14⁺CD16⁺ monocytes using Coulter EPICS_MXL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) with CXP Software (Beckman Coulter).

The identification of surface adhesion molecules (CD11a, CD11c, CD18, CD29, CD49d and CD54 (Bioscience, San Diego, CA, USA) and scavenger receptors (CD163, and CD204; Bioscience) on CD14⁺⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes was performed using PBMCs separated via Ficoll Hypaque as described by the manufacturer (Axis-Shield, Oslo, Norway). For four-colour staining, approximately 1×10^6 PBMCs were stained with a CD14 Pacific Blue (Caltage, Little Balmer, Bucks, UK), CD16 allophycocyanin (APC) (Biolegend, San Diego, CA, USA) combination with a mix of either FITC or PE conjugates identifying specific cell surface markers. The expression levels of each molecule were measured and reported as mean fluorescence intensity (MFI) by LSR flow cytometer (Becton Dickinson). At least 20 000 events per sample were analysed. Fluorescence gating parameters were established with all antibodies using isotype-matched antibody controls; positive values represent those above the 99% negative staining threshold.

Immunohistochemistry of tissue macrophages

CCA tissues were fixed in 10% neutral formalin buffer and immunohistochemical staining was performed using an immunoperoxidase method. Briefly, tissue sections were incubated with 1:200 mouse monoclonal anti-human myeloid/histiocyte antigen (MAC387 clone; Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min followed by the addition of Envision-labelled polymer peroxidase (Dakocytomation, Glostrup, Denmark) for 30 min. The MAC387 antibody was used to define recent blood monocyte derived migrants rather than using anti-CD68 antibodies, which recognize long-lived tissue macrophages. After washing, the sections were reacted with liquid 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride sub-

strate chromogen system (Dakocytomation). All slides were counterstained with Mayer's haematoxylin.

The densities of MAC387 at the leading edge of invasive tumour were classified semi-quantitatively into four scoring categories: 0 = negative; 1⁺ = 1–25%; 2⁺ = 26–50%; and 3⁺ = >50% (supplementary data). For statistical analysis, the scores 0 and 1⁺ were categorized as low expression and score 2⁺ and 3⁺ as high expression.

Statistical analysis

The numbers of CD14⁺CD16⁺ monocytes among groups and expression levels of the adhesion molecules and scavenger receptors on CD14⁺CD16[−] and CD14⁺CD16⁺ monocytes were compared and analysed with Student's *t*-test. The associations between levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes and clinicopathological features of CCA patients and density of MAC387-positive cells in CCA tissues were analysed using cross-tabulation with the χ^2 -test. Kaplan–Meier survival analysis was used to estimate the overall survival and comparison between-group analyses were conducted with a log-rank test. Statistic analyses were determined using SPSS statistical software version 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and STATA version 8 (Statacorp, College Station, TX, USA). *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Peripheral blood monocytes from CCA patients exhibit pro-tumorigenic characteristics

Five CCA patients (three males, two females), average age 54.8 ± 5.9 years, and four healthy subjects sex- and age-matched with those of CCA patients, were asked to participate in this study. In order to investigate pro-tumorigenic gene expression characteristics in CCA blood monocyte populations from the peripheral blood of CCA patients, we performed real-time RT-PCR of four candidate genes including growth factor (*EREG*), angiogenic chemokines (*VEGFA* and *CXCL3*) and an angiostatic chemokine (*CXCL10*). The results demonstrated that the *EREG* and *CXCL3* transcripts in monocytes from CCA patients were significantly higher, whereas *CXCL10* transcripts were lower when compared with monocytes from healthy subjects (*P* < 0.05) (Fig. 1). The expression level of *VEGFA* in monocytes from CCA patients was higher than that of the healthy group; however, that difference was not statistically significant.

We analysed further whether the higher expression levels of these pro-tumorigenic genes (*EREG*, *CXCL3* and *CXCL10*) observed in the monocytes from CCA patients were due to the minor subpopulation CD14⁺CD16⁺ monocytes. We first analysed the amount of CD14⁺CD16⁺ monocytes in the peripheral blood from CCA and healthy subjects used in the expression study and then analysed the

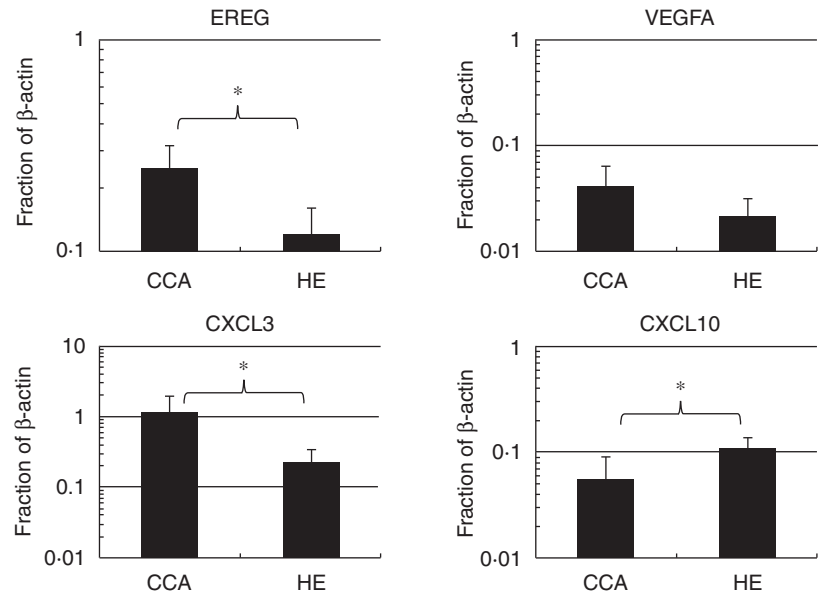


Fig. 1. Expression levels of *EREG*, *VEGFA*, *CXCL3* and *CXCL10* of peripheral blood monocytes from cholangiocarcinoma (CCA) patients in comparison with those from healthy subjects. Monocytes from CCA patients expressed significantly higher levels of *EREG* and *CXCL3* and lower levels of *CXCL10* than those from healthy subjects. * $P < 0.05$; Student's *t*-test.

possible association of these cells with the expression level of each gene using linear regression. The preliminary data indicated that peripheral blood from CCA patients contained higher number of CD14⁺CD16⁺ cells compared to those from healthy subjects and the amount of CD14⁺CD16⁺ cells associated strongly with expression levels of *CXCL3* ($r = 0.84$; $P < 0.03$) and had a tendency to correlate with *EREG*, but without statistical significance (Fig. 2).

CCA patient blood specimens have high levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes

Because previous studies have shown that CD14⁺CD16⁺ monocytes exhibit features related to tissue macrophage activation and anti-tumour response, in addition to our

finding that these cells may exhibit pro-tumorigenic characteristics, we next investigated whether this specific monocyte subset was elevated significantly in the peripheral blood of CCA patients in a larger sample size. To quantitate the CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation in peripheral blood, whole blood samples from CCA patients and healthy subjects were stained with CD14 and CD16 antibodies and analysed by flow cytometry. CD14⁺CD16⁺ cells from healthy donors ($n = 46$) accounted for $13 \pm 6\%$ of all CD14⁺ monocytes or 48.5 ± 26.6 cells/ μ l blood. A dramatic expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes was observed in the blood from both BBD ($n = 18$) and CCA patients ($n = 44$). The level of CD14⁺CD16⁺ monocytes in patients with CCA was $30 \pm 12\%$ of all monocytes or 171 ± 129 cells/ μ l, which was significantly higher than those of patients with BBD

Fig. 2. The association of CD14⁺CD16⁺ monocytes from cholangiocarcinoma (CCA) subjects and expression levels of pro-tumorigenic genes. (a) Amount of CD14⁺CD16⁺ cells in peripheral blood of CCA patients compared with healthy controls ($P = 0.25$). The data present as mean \pm standard deviation. (b–d) The association between CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation and the expression levels of *EREG* ($P = 0.41$), *CXCL3* ($P < 0.03$) and *CXCL10* ($P = 0.88$).

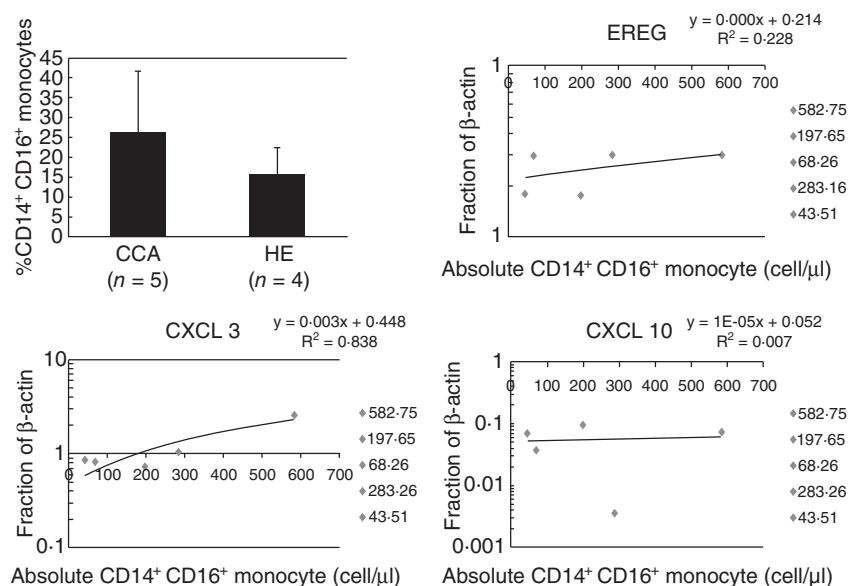
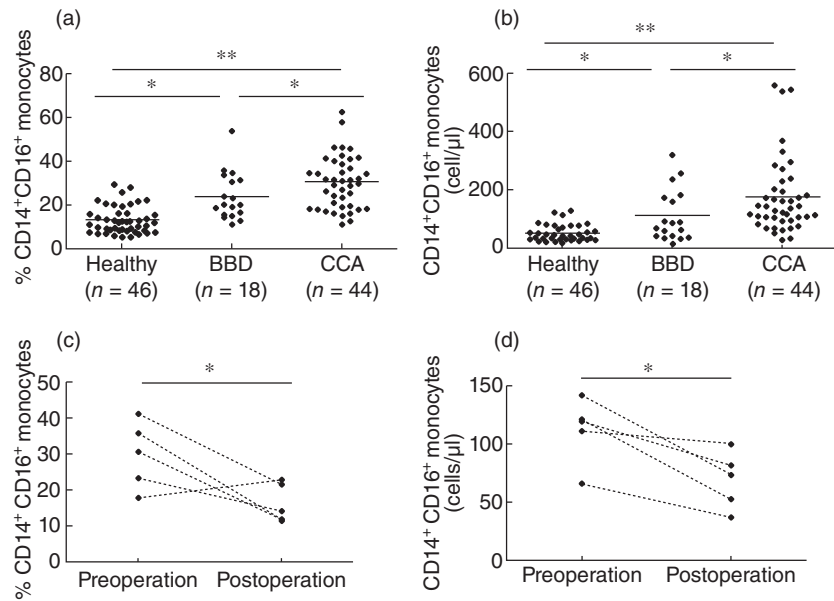


Fig. 3. Two-colour flow-cytometric analysis of circulating monocyte subpopulations in whole blood. Monocytes were gated according to their forward- and side-scatter characteristics. The expansions of CD14⁺CD16⁺ monocytes in peripheral blood of cholangiocarcinoma (CCA) patients, benign biliary disease patients (BBD) and healthy subjects were compared based on the numbers of CD14⁺CD16⁺ monocytes in percentage value (a) and absolute number (b). The expansions of CD14⁺CD16⁺ monocytes in peripheral blood of CCA patients between pre- and post-operations ($n = 6$) were compared based on the numbers of CD14⁺CD16⁺ monocytes in percentage value (c) and absolute number (d). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.



($23 \pm 10\%$ of all monocytes or 109 ± 89 cells/ μ l) and healthy subjects ($P < 0.05$; Fig. 3a,b).

The association of CD14⁺CD16⁺ monocytes and tumour tissues was investigated further by quantifying the levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes from peripheral blood of CCA patients' pre- and post-tumour resection. Five CCA patients who did not obtain any treatment after tumour resection were included in this study. The elevated level of CD14⁺CD16⁺ monocytes observed in the CCA patients ($n = 5$) was $29 \pm 9\%$ of all monocytes or 111 ± 28 cells/ μ l, and decreased significantly to near the normal level ($16 \pm 5\%$ of all monocytes or 68 ± 24 cells/ μ l) after tumour removal ($P < 0.05$; Fig. 3c,d).

Surface antigen expression patterns define unique features of CCA associated CD14⁺CD16⁺ monocytes

Adhesion molecules and scavenger receptors on monocytes may be involved in the localization of cells to a compartment such as the marginal pool and/or may represent define distinct subsets related to monocytic differentiation/maturation. To study whether the two monocyte subpopulations (CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺) differed in surface antigen expression, a four-colour flow cytometric analysis was performed. We found that several monocyte subset markers, CD11c, CD49d and CD54, were elevated significantly in CD14⁺CD16⁺ monocytes compared with those of CD14⁺CD16⁻ subset ($P < 0.05$) (Table 1). The expression of two scavenger receptors (CD163 and CD204) showed trends towards higher levels on CD14⁺CD16⁺ monocytes than CD14⁺CD16⁻ monocytes; however, these differences were not statistically significant. These data are consistent with blood CD14⁺CD16⁺ monocytes having properties of mature tissue macrophages and may be the blood form of macroph-

age responsible for supporting tumour growth and disease progression.

Elevated levels of blood CD14⁺CD16⁺ monocytes are associated with poor prognosis in patients with CCA

CD14⁺CD16⁺ monocyte levels were elevated in subsets of CCA patient blood specimens. To test whether these cells would be associated with CCA disease, pathogenesis, clinicopathological parameters of CCA patients and density of TAMs (MAC387 positive recent blood-derived macrophage migrants) in CCA tissues were analysed by univariate analysis. Only CCA patients with complete clinicopathological parameters ($n = 37$) were included in the analysis. CCA subjects were divided into two groups according to the mean \pm standard deviation of the blood CD14⁺CD16⁺ monocyte levels in healthy subjects, into patients with low (<100 cells/ μ l) and patients with high levels (>100 cells/ μ l) of CD14⁺CD16⁺ monocytes. Immunohistochemistry of

Table 1. Phenotypes of CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulations.

	CD14 ⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺ CD16 ⁺	P-value
Adhesion molecules			
CD11a	114.9 ± 56.4	137.3 ± 66.4	0.478
CD11c	276.6 ± 40.1	372.6 ± 54.11	0.001
CD18	738.5 ± 108.4	779.1 ± 136.5	0.521
CD29	601.2 ± 211.8	701.5 ± 267.2	0.420
CD49d	99.4 ± 25.9	176.6 ± 77.2	0.018
CD54	139.8 ± 34.7	159.7 ± 47.6	0.035
Scavenger receptors			
CD163	35.3 ± 13.8	41.8 ± 15.0	0.399
CD204	16.1 ± 4.4	24.7 ± 12.6	0.091

Table 2. The correlation of CD14⁺CD16⁺ monocyte levels and clinicopathological parameters.

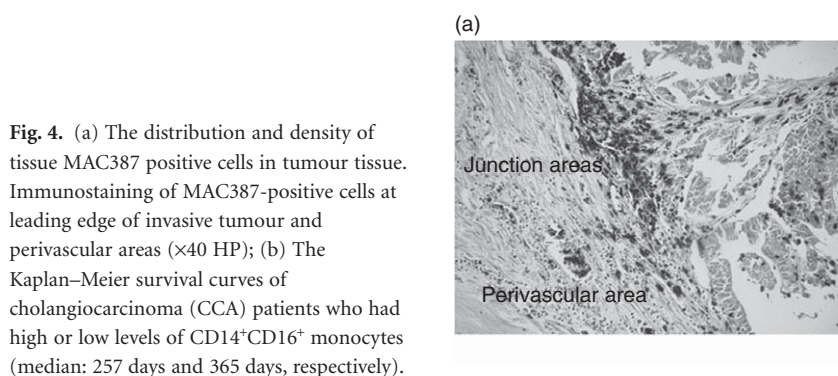
Variable	Number	CD14 ⁺ CD16 ⁺ count (cells/ml)		P-value
		Low (%)	High (%)	
Age (years)				0.588
<57	20	5 (25)	15 (75)	
≥57	17	3 (17.6)	14 (82.4)	
Sex				0.321
Female	15	2 (13.3)	13 (86.7)	
Male	22	6 (27.3)	16 (80)	
Tumour location				0.795
Intrahepatic CCA	20	4 (20)	13 (76.5)	
Extrahepatic CCA	17	4 (23.5)	12 (66.7)	
Tumour type				0.767
Mass-forming type	9	2 (22.2)	7 (77.8)	
Periductal infiltrating type	20	5 (25)	15 (75)	
Intraductal growth type	8	1 (12.5)	7 (87.5)	
Tumour stage				0.752
I–II	10	3 (30)	7 (70)	
III–IV	27	5 (18.5)	22 (81.5)	
Histology type				0.040
Non-papillary	25	3 (12)	22 (88)	
Papillary	12	5 (41.7)	7 (58.3)	
Vascular invasion				0.379
Absent	28	7 (25)	21 (75)	
Present	9	1 (11.1)	8 (88.9)	
Tissue macrophages (MAC387 ⁺ cells)				0.040
Low	12	5 (41.7)	7 (58.3)	
High	25	3 (12)	22 (88)	

CCA: cholangiocarcinoma.

MAC387 staining demonstrated that tumour tissue from CCA patients with a high level of blood CD14⁺CD16⁺ monocytes exhibited a high density of tissue MAC387-positive cells (Table 2). These macrophages were observed at the leading edge of tumour tissues and perivascular areas (Fig. 4a). As shown in Table 2, a high level of CD14⁺CD16⁺ monocytes was associated significantly with non-papillary type CCA and the high density of TAMs with positive MAC387 staining in CCA tissues ($P < 0.05$). There was no

correlation between levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes with gender, age, tumour location, tumour staging and vascular invasion.

Overall survival was compared among CCA patients with low and high levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes. Patients with survival under 30 days were labelled as 'peri-operative death' and were excluded from the analysis. There was no significant difference in the median overall post-resectional survival between CCA patients with low and those with high



levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes (log-rank, $P = 0.597$) (Fig. 4b). However, the higher frequency of patients who had post-resectional survival for 11 months in the CCA patients with low levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes (six of eight, 75%) than those with high levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes (13 of 29, 44.8%) was noticed.

Discussion

The roles of tumour-associated macrophages enhancing tumour growth by secreting various growth factors and pro-angiogenic cytokines are well documented. Monocytes are precursors of tissue macrophages and may exhibit special functions within a tumour environment. In the present study, we have shown that monocytes from peripheral blood of CCA patients had tumour-promoting characteristics, as these cells expressed higher levels of growth factor (*EREG*) and angiogenic chemokines (*CXCL3*) but lower levels of angiostatic chemokine (*CXCL10*) genes than monocytes obtained from healthy people. The expression pattern of these cytokines indicates that peripheral blood monocytes from CCA patients possess the M2 pro-tumorigenic phenotype. It has been shown in many studies that various tumour-derived molecules drive TAMs towards the tumour-promoting M2 phenotype [31,32]. Thus, peripheral blood monocytes from CCA patients may be influenced by tumour-derived molecules to express pro-tumorigenic factors, migrate to tumour-involved areas and differentiate to tissue macrophages to support growth and progression of the tumour.

The presence of elevated levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes with tissue macrophage features and the association of this subpopulation with disease has been shown in various pathological conditions, including infection, inflammatory syndrome, sepsis and cancers. In the present study, we demonstrate for the first time that patients with CCA have increased levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes in their blood. The direct association of this monocyte subpopulation with CCA tumour tissue is demonstrated by the fact that the elevated level of CD14⁺CD16⁺ monocytes was decreased to near the normal level found in healthy subjects after tumour resection. CD14⁺CD16⁺ monocytes evolve from CD14⁺CD16⁻ monocytes [21]. Certain cytokines, e.g. macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [24], as well as IL-10 in the presence of M-CSF and IL-4 [33,34], have been shown to increase the proportional level of CD14⁺CD16⁺ monocytes from CD14⁺CD16⁻ monocytes as precursors. CCA tumour tissues may produce these specific cytokines that possibly induce elevated levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes in CCA patients. High expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in tumour epithelium of human intrahepatic CCA tissues reported by Sasaki [35] may support this postulation.

High expression of adhesion molecules CD11a, CD11c, CD18, CD29, CD49d and CD54 found in CD14⁺CD16⁺

monocytes implies that this monocyte subpopulation may adhere strongly to vascular endothelium and this may subsequently promote migration of blood monocytes into tumour-involved areas. There is substantial evidence that monocyte recruitment from the circulating bloodstream to sites of inflammation involves a complex sequence of adhesion and cytoskeletal events mediated by members of the integrin family. CD11b/CD18 and CD11c/CD18 regulate the effector responses of leucocyte adhesion [36]. Elevated expression of CD11c also contributes to greater number of receptors present in clusters that are able to participate in ligand engagement and increased strength of adhesion [37,38]. The high density of MAC387-positive cells found in the leading edge of tumour and especially within perivascular areas as shown in this study may reflect recent blood-derived monocytes/macrophages recruited into the tumour vicinity. As MAC387 is not a general macrophage stain, but one that recognizes a tissue invasion molecular complex (S100A8/A9) required for transit from blood to tissues, it is likely that the MAC387⁺ cells in CCA represent recent migrants. The association of MAC387⁺ cells found in CCA tissues and the worst survival of patients has been reported recently [39]. As CCA cells rarely expressed matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), while these tissue macrophages expressed MMP-9, it is therefore likely that the tissue macrophages are critical for degrading extracellular matrix and facilitating tumour metastasis.

High levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes may influence tumour pathogenesis; however, it may also reflect the inflammation condition, as higher levels of these monocytes than those of healthy people were also observed in patients with benign biliary diseases. The observation that a higher frequency of patients surviving 11 months was found in the patients with low levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes than those with high level of CD14⁺CD16⁺ monocytes. In addition, high levels of CD14⁺CD16⁺ monocytes were associated with poor prognostic types of CCA – namely non-papillary type CCA and high density of TAMs. Recent studies have shown that CD14⁺CD16⁺ but not CD14⁺CD16⁻ monocytes expressed Tie 2 [17], which is an angiopoietin receptor (Tie 2/Tek) found in the human peripheral blood monocyte subpopulation with marked tumour-promoting proangiogenic activity. Angiopoietin 2 (Ang 2), a Tie 2 ligand, is found mainly in activated and angiogenic blood vessels as well as cancer cells [40], and may induce transmigration of Tie 2/CD14⁺CD16⁺ monocytes into the tissues [40,41]. These data support our hypothesis that CD14⁺CD16⁺ monocytes found in peripheral blood of CCA patients may be the subpopulation of TAMs with angiogenic properties and promote tumour progression.

Taken together, this study indicates that peripheral blood monocytes from CCA patients exhibit pro-tumorigenic features which may facilitate progression of CCA. An expansion of the CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation found in peripheral blood of CCA patients was associated with

tumour origin, high density of tumour-associated macrophages and poor prognosis of patients. It is likely that this monocyte subpopulation possibly promotes tumour progression and hence, if confirmed in subsequent studies, the therapy targeting to this monocyte subset may be an alternative treatment of CCA.

Acknowledgements

This works were co-supported by Basic Research Grant (BRG-4980015) and the Royal golden Jubilee-PhD Program, Thailand Research Fund for C. Subimerb and S. Wongkham; US National Cancer Institute AIDS and Cancer Specimen resource funding (U01CA 066529-14) for M. McGrath.

Disclosure

None.

References

- Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumor-associated macrophage as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumor progression. *Eur J Cancer* 2004; **1660**–7.
- Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 2008; **267**:204–15.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; **66**:605–12.
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K *et al.* Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 2003; **23**:4079–83.
- Li C, Shintani S, Terakado N *et al.* Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2002; **9**:1219–23.
- Orre M, Rogers PA. Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 1999; **73**:47–50.
- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 1993; **53**:602–18.
- Allan DS, Colonna M, Lanier LL *et al.* Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1999; **189**:1149–56.
- Almeida J, Bueno C, Alguero MC *et al.* Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(–)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(–/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(–) dendritic cells. *Clin Immunol* 2001; **100**:325–38.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; **19**:71–82.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:953–64.
- Kwakkenbos MJ, Chang GW, Lin HH *et al.* The human EGF-TM7 family member EMR2 is a heterodimeric receptor expressed on myeloid cells. *J Leukoc Biol* 2002; **71**:854–62.
- Rothe G, Gabriel H, Kovacs E *et al.* Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**:1437–47.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A *et al.* The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; **168**:3536–42.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H *et al.* Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996; **87**:373–7.
- Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M *et al.* Antitumor response of CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation. *Exp Hematol* 2004; **32**:748–55.
- De Palma M, Venneri MA, Galli R *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005; **8**:211–26.
- Kreutz M, Krause SW, Hennemann B *et al.* Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. *Res Immunol* 1992; **143**:107–15.
- Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK *et al.* Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol* 1999; **34**:959–70.
- Schmid I, Baldwin GC, Jacobs EL *et al.* Alterations in phenotype and cell-surface antigen expression levels of human monocytes: differential response to in vivo administration of rhM-CSF or rhGM-CSF. *Cytometry* 1995; **22**:103–10.
- Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M *et al.* The novel subset of CD14⁺CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993; **23**:2053–8.
- Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM *et al.* CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 1995; **25**:3418–24.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B *et al.* The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993; **82**:3170–6.
- Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF *et al.* CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1995; **85**:2910–17.
- Pulliam L, Gascon R, Stubblebine M *et al.* Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet* 1997; **349**:692–5.
- Nockle WA, Scherberich JE. Expanded CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 1998; **66**:2782–90.
- Zhang R, Gascon R, Miller RG *et al.* Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* 2005; **159**:215–24.
- Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB *et al.* Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* 2002; **37**:806–13.
- Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; **24**:349–56.
- Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N *et al.* Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2004; **11**:175–83.
- Allavena P, Sica A, Garlanda C *et al.* The Yin–Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008; **222**:155–61.

- 32 Mantovani A, Allavena P, Sica A *et al.* Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; **454**:436–44.
- 33 Li G, Hangoc G, Broxmeyer HE. Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4 contributes to development of the rare population of CD14⁺CD16⁺⁺ cells derived from human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **322**:637–43.
- 34 Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ *et al.* Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology* 2001; **102**:331–7.
- 35 Sasaki M, Tsuneyama K, Ishikawa A *et al.* Intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhosis presents granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Hum Pathol* 2003; **34**:1337–44.
- 36 Arndt S, Melle C, Mondal K *et al.* Interactions of TANGO and leukocyte integrin CD11c/CD18 regulate the migration of human monocytes. *J Leukoc Biol* 2007; **82**:1466–72.
- 37 Georgakopoulos T, Moss ST, Kanagasundaram V. Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. *Mol Immunol* 2008; **45**:3671–81.
- 38 Wu H, Gower RM, Wang H *et al.* Functional role of CD11c⁺ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* 2009.
- 39 Subimerb C, Pinlaor S, Khuntikeo N *et al.* Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma. *Mol Med Rep* 2010; **3**:597–605.
- 40 Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M *et al.* Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 2007; **109**:5276–85.
- 41 Murdoch C, Tazzyman S, Webster S *et al.* Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 2007; **178**:7405–11.

**Transcriptional profiles of peripheral blood leukocytes identify patients with
Cholangiocarcinoma and predict outcome**

Running title: **Cholangiocarcinoma blood transcriptome**

Chutima Subimerb, PhD^{1,3}, Chaisiri Wongkham, PhD^{1,3}, Narong Khuntikeo, MD^{2,3}, Chanvit
Leelayuwat, PhD^{3,4}, Michael S McGrath, MD., PhD^{5*}, Sopit Wongkham, PhD^{1,3*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, THAILAND

²Department of Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, THAILAND

³Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen
University, THAILAND

⁴Department of Immunology, Faculty of Associated Medical Science, Khon Kaen University,
THAILAND

⁵Department of Laboratory Medicine, University of California San Francisco, 94110, USA

Correspondences:

Sopit Wongkham*

AND Michael S McGrath*

Department of Biochemistry
Faculty of Medicine, Khon Kaen University
Khon Kaen, 40002, THAILAND

Department of Laboratory Medicine,
University of California San
Francisco, 94110, USA

Telephone: +66-43-348-386

Telephone: +1-415 -206-8204

Fax: +66-43-348-375

Fax: +1-415 206-3765

e-mail: sopit@kku.ac.th

e-mail: mmcgrath@php.ucsf.edu

Text = 19 pages; Tables 3 ; Illustrations = 5

Summary

Cholangiocarcinoma (CCA), a slow growing but highly metastatic tumor, is highly prevalent in Northeast Thailand. CCA specific diagnostic tests that predict prognosis remain elusive. The present study was designed to investigate whether peripheral blood leukocytes (PBLs) transcriptional profiles might be of use as a prognostic test in CCA patients. Gene expression profiles of PBLs from 9 CCA and 8 healthy subjects were conducted using Affymetrix HG_U133 Plus 2.0 GeneChip. We indentified informative PBLs gene expression profiles that could reliably distinguish CCA patients from healthy subjects. Of 177 CCA specific genes, 117 were up regulated and 60 were down regulated. The molecular and cellular functions predicted for these CCA specific genes according to the Gene Ontology database indicated differential PBL expression of host immune response and tumor progression genes. (*EREG*, *TGF β 1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *IL-8*, and *VEGFA*). The expression levels of 9 differentially expressed genes were verified in 36 CCA vs. 20 healthy subjects. A set of three tumor invasion related genes (*PLAU*, *CTSL* and *SERPINB2*) computed as “prognostic index” was found to be an independent and statistically significant predictor for CCA patient survival. The present study shows that CCA PBLs may serve as disease predictive clinically accessible surrogates for indentifying expressed genes reflective of CCA disease severity.

Keywords cholangiocarcinoma, gene expression profiles, peripheral blood leukocytes, blood transcriptome, prognosis

Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA) is a relatively rare type of primary liver cancer worldwide; however, its incidence is extremely high in the Southeast Asia, especially in the northeast of Thailand [1-2]. Risk factors for the development of CCA include long standing inflammation and chronic injury of the biliary epithelium. The malignancy of CCA is normally difficult to diagnose until the disease becomes advanced or disseminated which makes CCA a tumor with extremely poor prognosis. At present, surgery after early detection is the only hope of cure. Prognostic markers that predict tumor behavior would help notify the patient and clinician during the decision-making process. The existing pre-operative radiology, pathology and laparoscopic staging strategies, however, do not allow the accurate determination of long-term prognosis in CCA patients. The identification of molecular markers associated with patient survival by a non-invasive approach, therefore, is essential for effective treatment of this cancer. Moreover, biomarkers associated with adverse outcome may themselves represent novel therapeutic targets.

It is now becoming clear that the tumor microenvironment, which is largely populated by leukocytes (the so-called inflammatory cells), is capable of promoting tumor cell invasion through expression of signaling molecules such as cytokines, chemokines, and growth factors. [3]. Peripheral blood leukocytes (PBLs) normally act as a comprehensive surveillance system that may change function in the face of inflammation, infection and other diseases, including cancer [4]. Recent studies have shown that PBLs have the ability to respond differentially to varying environmental, physiological or pathological conditions of the body. In addition, blood cells express genes that are responsive to physiological stimuli. Therefore, a PBL gene expression signature has the potential to be a disease specific marker. Disease specific signature genes have been shown to reflect the pathogenesis of autoimmune, cardiovascular, neurological diseases and cancers [5]. Moreover, the evaluation of PBLs

gene expression has been shown to be useful in identifying pathways relevant to disease and in diagnosis or predicting response to therapy of the diseases [6].

Tumor associated macrophages are known to be the major class of infiltrating leukocytes in solid tumors and are accepted as playing promotional roles in tumorigenesis [7-8]. The pro-tumorigenic functions of tumor associated macrophages in certain cancers are related to their differentiation state as M2-polarized macrophages that release various factors supporting tumor growth, metastasis, angiogenesis, tissue remodeling and suppress adaptive immunity [9-10]. We have recently shown that tissue macrophages through their proteolytic activities play important roles in CCA tumor progression. CCA patients with high levels of these infiltrating cells have significantly shortened survival [11].

Since circulating blood is easily accessible and has been suggested as an alternative to tissue samples for molecular profiling of human disease and disease risk [12-13] and previous studies have shown that blood expression profiles can be used as markers for cancer diagnosis or prognosis [14-16]. The present study tested whether the PBLs transcriptome of CCA patients could be used to predict clinical outcome. In this study, we show for the first time that a small set of three expressed PBL genes related to proteolytic function discriminated good from poor prognostic outcome in CCA patients.

Materials and Methods

Study subjects

CCA subjects were patients who were admitted to Srinagarind hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, for surgical treatment of CCA. Peripheral blood was collected prospectively in conjunction with a clinical visit or just before surgery. None of the case subjects had received any cancer therapy before blood collection. Only samples from patients with histologically proven CCA were included in the study. Tumor stage was defined according to the American Joint Committee on Cancer Staging Manual [17].

Survival of each CCA subject was recorded after surgery for an average of 8 months and 48.57% (17/35 cases) of the patients died during this follow-up period. Control subjects were blood donors with no known medical condition who had normal blood laboratory tests who were age and sex matched with CCA patients. All subjects provided written informed consent before entry into the study. The protocol for this study was approved by the Human Research Ethics Committee, Khon Kaen University (HE471214 and HE480312).

RNA extraction and one cycle eukaryotic expression sample processing

PBL gene expression profiles were performed with 9 CCA patients and 8 healthy subjects. Heparinized blood (0.5 ml) was added into 4.5 ml of TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was extracted using TRIzol[®] reagent with Purelink[™] Micro-to-Midi system kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The integrity and amount of RNA was determined by 2100 Bioanalyzer RNA LabChip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and Nano drop (ND-1000 spectrophotometer and ND1000 version 3.2.1 software), respectively. Total RNA was converted to cDNA and synthesized to Biotinylated cRNA which was then fragmented and hybridized into the Oligonucleotide microarray Human Genome_U133 Plus 2.0 array (approximately 54,675 probe or ~39,000 genes; Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) by GeneChip[®] Hybridization Oven 640. Array chips were stained with streptavidin phycoerythrin biotinylated anti-streptavidin antibody using GeneChip[®] Fluidics Station 450. RNA expression levels were quantitated by measuring the fluorescence intensity using GeneChip[®] scanner 3000.

Microarray analysis

Expression data was processed by Gene Chip Operating Software; GCOS (Affymetrix, Santa Clara, CA). Partek software (Agilent Technologies, Palo Alto Ca) was used for downstream analysis of GCOS processed data (Principle component analysis, Hierarchical

Clustering analysis, Venn diagram and Gene Ontology). Signals from all probe sets were normalized using Human Genome U133 Plus 2.0 Array Normalization Controls. Hierarchical cluster analysis was done on each comparison to assess correlations among samples for each identified gene set. The criteria for selecting differentially expressed genes between CCA and healthy subjects were (i) Mean fluorescence intensity in each probe set should be equal or more than 8 for all up or down regulated genes; (ii) it has significant expression at a $p < 0.05$; and (iii) the expression level compared to the control group was 1.5 fold different.

Real-time RT-PCR assay validation

Transcript copy number for specific genes of interest was measured using an adaptation of a two-step real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) method. Real time RT-PCR for specific genes of interest and internal control was performed using a SYBR green assay. The primers were designed using Integrated DNA technologies methods (IDT[®], <http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>). Approximately 200 ng of total RNA from each sample was converted to cDNA using the 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV] kit (Roche Applied Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed on a LightCycler (Roche Applied Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Applied Diagnostic, Indianapolis, IN, USA) and ~5 ng cDNA sample. Threshold cycles (Ct) for each amplification reaction were determined using LightCycler Software version 3.5 (Roche Applied Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). All samples were amplified with the human β -actin LightCycler–Primer Set (Roche Applied Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). The sequences of gene-specific primers employed are provided in Table 1. The gene-specific primers for individual samples (including CCA patients and healthy subjects) were normalized to signals obtained with β -

actin from the same sample. Relative change in CCA specific gene expression was quantified by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method where $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{actin}}})_{\text{patients}} - (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{actin}}})_{\text{healthy}}$. The relative change in gene expression of healthy subjects was indicated to be 1X expression of each target genes. Thus, relative change values more than 1X expression represented up-regulation, whereas those with less than 1X expression represented down-regulation.

Statistical analysis

Statistic analyses were done using SPSS statistical software version 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and STATA version 8 (Stata Corporation, College station, Texas, USA). The different expression of each candidate gene between groups was compared using Student-t-test. Cox regression was used to establish prognostic index from the expression levels of candidate genes and eventual patient outcome. Kaplan-Meier survival analysis was used to estimate the disease-specific survival and comparison between groups were done with a log-rank test. Cross tabulations were analyzed with chi-squared -test for the associations between prognostic index with clinicopathological features of CCA patients.

Results

Identification of differentially expressed genes through cDNA microarray

Peripheral blood cells from four intrahepatic and five extrahepatic CCA patients (mean age = 57.7 years, range: 45.7-69.7 years) and eight healthy individuals (mean age = 49.1 years, range: 45.54-52.6 years) were used for Affymetrix GeneChip system analysis. The mean age of these two groups was not significantly different. The principal component analysis (PCA) for determining expression trend within the dataset of CCA patients and healthy subjects demonstrated the system variance transcriptome of 49.2% difference (Figure 1a). Using a *P* value less than 0.05 and 1.5 fold change, there were 2,199 genes equally

expressed in the PBLs from both groups, whereas 117 genes were up regulated and 60 genes were down regulated in the PBLs from CCA patients (Figure 1b).

The differentially expressed genes between CCA and healthy subjects were arranged according to the similarities in gene expression patterns using Cluster analysis. The hierarchical clustering analysis of the up or down regulated genes resulted in a clear separation of the CCA patients from healthy controls (Figure 2). The molecular and cellular functions predicted for the differentially expressed genes were determined according to the Gene Ontology database. Genes that were differentially expressed in peripheral blood leukocytes of CCA patients more than two fold difference of healthy subjects are shown in Tables 2. The over-expressed genes related to protease, peptidase and invasion; growth factor/angiogenic/cell adhesion; M2 related immune response, cytokine /chemokine; whereas the down-regulated genes were associated with M1 related immune response, cytokine/chemokine; protein biosynthesis and regulatory proteins. The top significant biological functions using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software was predicted to be antigen presentation, cell death, cellular movement, cell to cell signaling and interaction, and cellular growth and proliferation (Figure 3).

Selection of candidate genes and verification

Tissue macrophages are derived from peripheral blood monocytes. Recent studies of CCA tumor associated macrophages showed them to have proteolytic function and elevated levels were associated with poor CCA patient¹¹. Therefore we evaluated monocytic genes associated with tumor proliferation, angiogenesis and metastasis and identified a set of 11 genes which were differentially expressed in CCA vs. healthy subjects. The initially identified candidate genes of the nine up-regulated genes (*PLAU*, *SERPINB2*, *VEGFA*, *EREG*, *MMP9*, *IL-8*, *PTGS*, *CTSL*, and *CXCL3*) and the two down-regulated genes (*CXCL10* and *TLR8*) were investigated by quantitative reverse transcription (RT)-PCR. Using the

same set of specimens as for the microarray analysis, the expression level of each gene obtained from the quantitative RT-PCR was comparable with those identified in the microarray analysis (Figure 4).

Construction and validation of classification models for predicting the outcome of CCA patients

The nine up-regulated genes were evaluated for the potential of being a prognostic signature for CCA in a training set of 35 CCA patients and 20 controls using quantitative RT-PCR. The expression level of each gene was evaluated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{CCA}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{Healthy}}$, and the expression of β -actin was used as reference. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the nine up-regulating genes from the training data set was used to obtain the regression coefficient and hazard ratio which were then used to define the “prognostic index” by the Cox regression model. The combination equation to obtain the best prognostic discrimination power was from three invasion related genes -PLAU, SERPINB2 and CTSL. The final equation for predicting the survival outcome of CCA patients (prognostic index) was $1.020 \text{ PLAU} + 1.214 \text{ CTSL} - 0.882 \text{ SERPINB2}$.

To determine if the prognostic index was related to patient prognosis, the Kaplan-Meier curve analysis and log rank test based on the levels of prognostic index were tested. Using the prognostic index at 50th Percentile of the training set (= 4.21) as the cutoff point, the CCA patients were stratified into two groups: patients with low (< 4.21) and those with high (\geq 4.21) prognostic index. The overall survival of CCA patients who had a high prognostic index (mean survival 239 days; 95% CI, 167-311 days) was significantly reduced when compared with those who had a low prognostic index (mean survival 403 days; 95% CI, 320-485 days) ($P = 0.021$, Figure 5). Since several clinical parameters have been shown to correlate with prognosis of CCA patients, we further determined whether the prognostic index was a confounding factor underlying the clinical condition by performing univariate

and multivariate Cox proportional hazard regression analysis. A univariate analysis of various clinical variables demonstrated that only staging and “prognostic index” were significant predictors of patient survival ($P < 0.05$) (Table 3). The multivariate Cox regression model for survival which controlled for age, sex, staging and “prognostic index” of the patients indicated that both staging and “prognostic index” were independent predictors of survival for CCA with hazard ratio of 3.85 (95% CI, 0.64 – 23.05; between stage III versus I-II), 7.35 (95% CI, 1.40 – 40.31; between stage IV versus I-II) and 3.61 (95% CI, 0.95 – 13.72; between high versus low score), respectively (Table 3).

Discussion

Differential gene expression signature profiling between primary tumor and normal tissues has been used in various cancers for diagnostic and prognostic purposes [18-20]. In this study, we report the feasibility of using PBL gene expression profiling to predict the overall survival of CCA patients.

The principal component and hierarchical clustering analysis of the expression profiles from PBLs obtained from CCA patients and healthy subjects indicated a distinct set of 177 genes which were differentially expressed in the PBLs of CCA patients. Convincingly, the biological functions of the differentially expressed genes in PBLs of CCA patients suggest the pro-tumorigenesis role and suppression of immune response in CCA patients. Growth and cell cycle regulatory genes, e.g., epiregulin (EREG), vascular endothelial growth factor (VEGF), and transforming growth factor, beta 1 (TGFB1) were 1.5-4 fold up-regulated in PBLs of CCA patients. The PBL signature of CCA patients was also associated with tumor progression. For example, expression of angiogenic chemokines (CXCL2, CXCL3 and CXCL8/IL8) that are potent promoters of angiogenic activity were up-regulated whereas CXCL10 (an interferon-inducible chemokine), a potent inhibitor of angiogenesis was

suppressed. The contribution of CXCL1, 2, and 3 to angiogenesis and tumor progression has been shown in immortalized murine melanocytes [21]. On the other hand, when CXCL1, 2, or 3 were depleted, there was a marked reduction in tumor-associated angiogenesis with tumor growth inhibition [22]. Elevation of tumor associated CXCL8/IL8 within tumors correlates with neovascularization and is inversely correlated with survival in patients with ovarian carcinoma and non-small-lung cell carcinoma [23-24]. CXCL10 mediates its angiostatic activity via CXCR3 on endothelium [25]. Taken together, the previous studies suggest that the up-regulation of angiogenic CXC chemokines (CXCL2, 3 and 8) and down-regulation of angiostatic CXC chemokine (CXCL10) observed in CCA-PBLs may be reflective of the tumor angiogenic environment in CCA.

A recent limited genetic study of CCA patient blood showed that a minor blood monocyte subpopulation ($CD14^+CD16^+$) expressed elevated levels of growth and angiogenic factor related genes, e.g., epiregulin, VEGF-A, and CXCL3, as compared to normal and biliary disease patients [11]. Although the current study reports the CCA PBL transcriptome this previously described $CD14^+CD16^+$ monocyte subset within the PBL population may be responsible for the disease specific genes identified under this study. The use of PBLs for genetic analysis in CCA allows for the development of a simple test not requiring separation into cellular subsets prior to analysis.

Certain chemokines are differentially expressed in polarized macrophages (e.g., CXCL10 for classically activated macrophages or M1; CCL17 for alternatively activated macrophages or M2 [26]. In the present study, the down regulation of CXCL10 in CCA-PBLs may have been associated with a Th2 response known to promote monocytes/macrophage into a M2 phenotype. These M2 type macrophages are well known for supporting tumor progression and suppression of immune responses.

Seven genes involved in proteolytic degradation of extracellular matrix, a process which supports tumor invasion, were differentially expressed in CCA-PBLs. These genes included plasminogen activator urokinase (PLAU), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), serpin peptidase inhibitor clade B member 2, cathepsin L (CTSL), ADAM metallopeptidase domain 9 (ADAM9), and TIMP metallopeptidase inhibitor 1 (TIMP1). This information supports our recent report that tumor associated macrophages (TAMs) in CCA tissues, especially at leading edge of the tumor, expressed PLAU and MMP9 proteins. In addition, the patients with high density MMP9 and PLAU expressing TAMs had a reduced overall survival after surgical resection [11]. These data suggest that through evaluation of PBL gene expression, genes encoding molecules present in TAMs and critical for tumor cell invasion directly associated with CCA patient survival may be identified.

Recently, a small set of genes from differential expression profiles of several cancers has been used as a molecular signature for tumor diagnosis and prognosis in patients with urinary bladder cancer, breast cancer [15, 27-29], and adrenocortical tumor and intrahepatic CCA [30]. From the typical expression profile found in PBLs of CCA patients, we identified a set of three proteolytic related genes (*PLAU*, *SERPINB2*, *CTSL*) that when computed into “prognostic index”, had significant power to predict the prognosis of CCA patients. CCA patients who have PBLs with high expression of *PLAU*, *SERPINB2*, and *CTSL* (high prognostic index) have shorter survival than patients who have PBLs with low expression of these genes (low prognostic index). This association corresponds and supports our previous finding that CCA patients with high density of MMP9 and PLAU expressing TAMs in tumor tissues had shorter survival than those with low density of MMP9 and PLAU expressing TAMs [11]. In addition, the multivariate Cox regression model for survival indicated that the prognostic index was an independent predictor of survival for CCA. In summary, this

study supports the idea of using PBL transcriptome analysis as an accessible surrogate monitor of a tissue and system that are not easily obtained by standard approaches.

From a technical point of view, one can argue that the PBLs from CCA patients may be contaminated with circulating tumor cells which may have affected gene expression patterns in the present study, since tumor cells a low frequency are known to circulate in the blood [31-32]. To test whether the results from the current study were influenced by the presence of blood borne tumor cells, three databases containing gene expression profiles from primary tissues of CCA [33-35] were checked for similarities with the profile from the PBL transcriptome. No highly expressed transcripts present in primary tumor CCA tissues were found in our database and *vice versa*. In addition, differentially expressed genes in CCA-PBLs did not include any epithelial cell related genes. Therefore the data presented in this study reflect the expression of PBL genes without any significant contribution of genes expressed in CCA tissue.

In conclusion, informative gene expression profiles of PBLs that could reliably distinguish CCA patients from healthy subjects were indentified. On the basis of this data, a small set of candidate genes differentially expressed in CCA-PBLs has the potential of being developed into a test that could be a predictor for survival of CCA patients. However, the potential of this approach will need to be evaluated more extensively in a larger sample size for a better discrimination power before being applied to clinical practice.

Acknowledgments: This works were co-supported by the Office of the Higher Education Commission, National Research Council of Thailand, and National Research University Program of Khon Kaen University (SHeP-GMS), the Basic Research Grant, Thailand Research Fund (BRG-4980015) for S. Wongkham, and the Royal golden Jubilee-PhD Program for S Wongkham and C Subimerb; US National Cancer Institute AIDS and Cancer Specimen resource funding (U01CA 066529-14) for M. McGrath.

References

1. Vatanasapt V, Tangvoraphonkchai V, Titapant V, Pipitgool V, Viriyapap D, Sriamporn S. A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990; 21: 489-494.
2. Green A, Uttaravichien T, Bhudhisawasdi V, et al. Cholangiocarcinoma in north east Thailand. A hospital-based study. *Trop Geogr Med*. 1991; 43: 193-198.
3. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-7.
4. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 1896-1901.
5. Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. *Trends Mol Med*. 2007; 13: 422-432.
6. Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, et al. Transcription-based prediction of response to IFNbeta using supervised computational methods. *PLoS Biol*. 2005; 3: e2.
7. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: 539-545.
8. Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumor-associated macrophage as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumor progression. *European Journal of Cancer*. 2004; 1660-1667.
9. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002; 196: 254-265.
10. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 71-8.
11. Subimerb C, Pinlaor S, Khuntikeo N, et al. Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 2010; 3: 597-605.

12. Liew CC. Method for the detection of gene transcripts in blood and uses thereof. United State patent US200400140592004 Jan 22 2004.
13. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006; 147: 126-132.
14. Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, et al. Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1181-1189.
15. Osman I, Bajorin DF, Sun TT, et al. Novel blood biomarkers of human urinary bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 3374-3380.
16. Sharma P, Sahni NS, Tibshirani R, et al. Early detection of breast cancer based on gene-expression patterns in peripheral blood cells. *Breast Cancer Res.* 2005; 7: R634-644.
17. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, eds. American Joint Committee on Cancer Staging Manual. 6th ed. Philadelphia: Springer, 2002.
18. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2002; 8: 816-824.
19. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003; 5: 57-58.
20. Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res.* 2002; 62: 3005-3008.
21. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, et al. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol.* 1997; 62: 588-597.

22. Owen JD, Strieter R, Burdick M, et al. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int J Cancer*. 1997; 73: 94-103.
23. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med*. 1994; 179: 1409-1415.
24. Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 447-454.
25. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 768-778.
26. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006; 177: 7303-7311.
27. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1108-1115.
28. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 2601-2608.
29. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, et al. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 4611-4619.
30. Nishino R, Honda M, Yamashita T, et al. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2008; 49: 207-216.
31. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13: 1033-1067.

32. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* 2007; 253: 180-204.
33. Jinawath N, Chamgramol Y, Furukawa Y, et al. Comparison of gene expression profiles between *Opisthorchis viverrini* and non-*Opisthorchis viverrini* associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2006; 44: 1025-1038.
34. Obama K, Ura K, Li M, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2005; 41: 1339-1348.
35. Wang AG, Yoon SY, Oh JH, et al. Identification of intrahepatic cholangiocarcinoma related genes by comparison with normal liver tissues using expressed sequence tags. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345: 1022-1032.

Figure legends

Figure 1 Principle component analysis for expression trend between CCA patients and healthy subjects. (a) The Ellipsoid view showed that specimens were grouped by disease. The result showed 49.2 % of the system variance between the expression of PBLs from 9 CCA patients (red dots) and 8 healthy subjects (blue dots). (b) Of the 177 genes, 117 genes were up regulated and 60 genes were down regulated in the PBLs from CCA patients.

Figure 2 Hierarchical clustering analysis of up or down regulated genes in the expression profiles of PBLs from CCA patients and healthy controls. (a) the hierarchical clustering of 117 up regulated genes; (b) 60 down regulated genes.

Figure 3 Gene Ontology of differentially expressed genes of PBLs from CCA subjects according to the ingenuity pathway analysis (IPA).

Figure 4 Comparison of the expression levels of 9 up- and 2 down-regulated genes of PBLs from CCA patients obtained from cDNA array chip and quantitative real time RT-PCR. Gray bar = cDNA array; black bar = real time PCR.

Figure 5 Kaplan-Meier survival curves of CCA patients according to high or low prognostic index. The mean survivals of patients with high and low prognostic index are 239 days and 403 days, respectively ($P < 0.05$). Prognostic index = $1.020 \text{ PLA} + 1.214 \text{ CTSL} - 0.882 \text{ SERPINB2}$.

ภาคผนวก

Figure 1

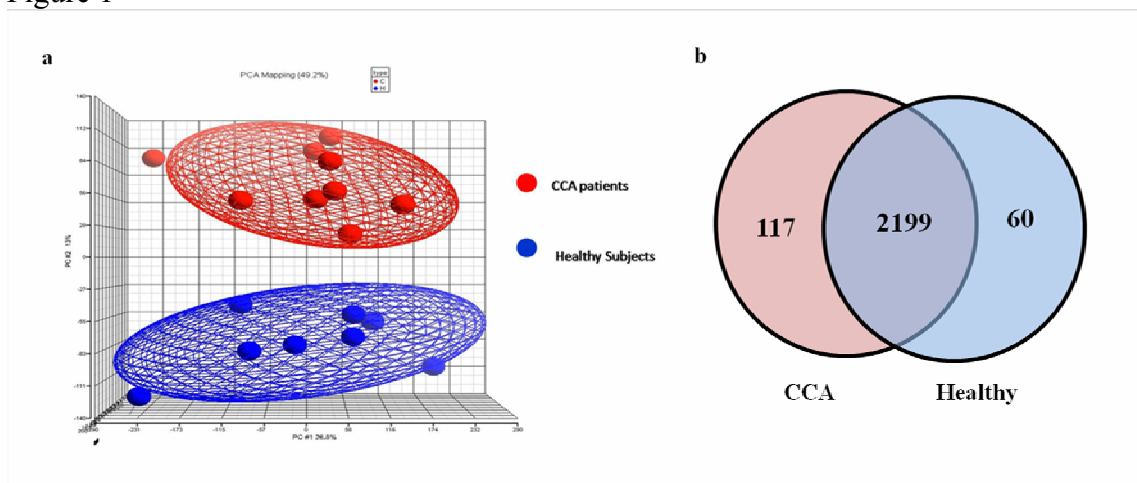


Figure 2

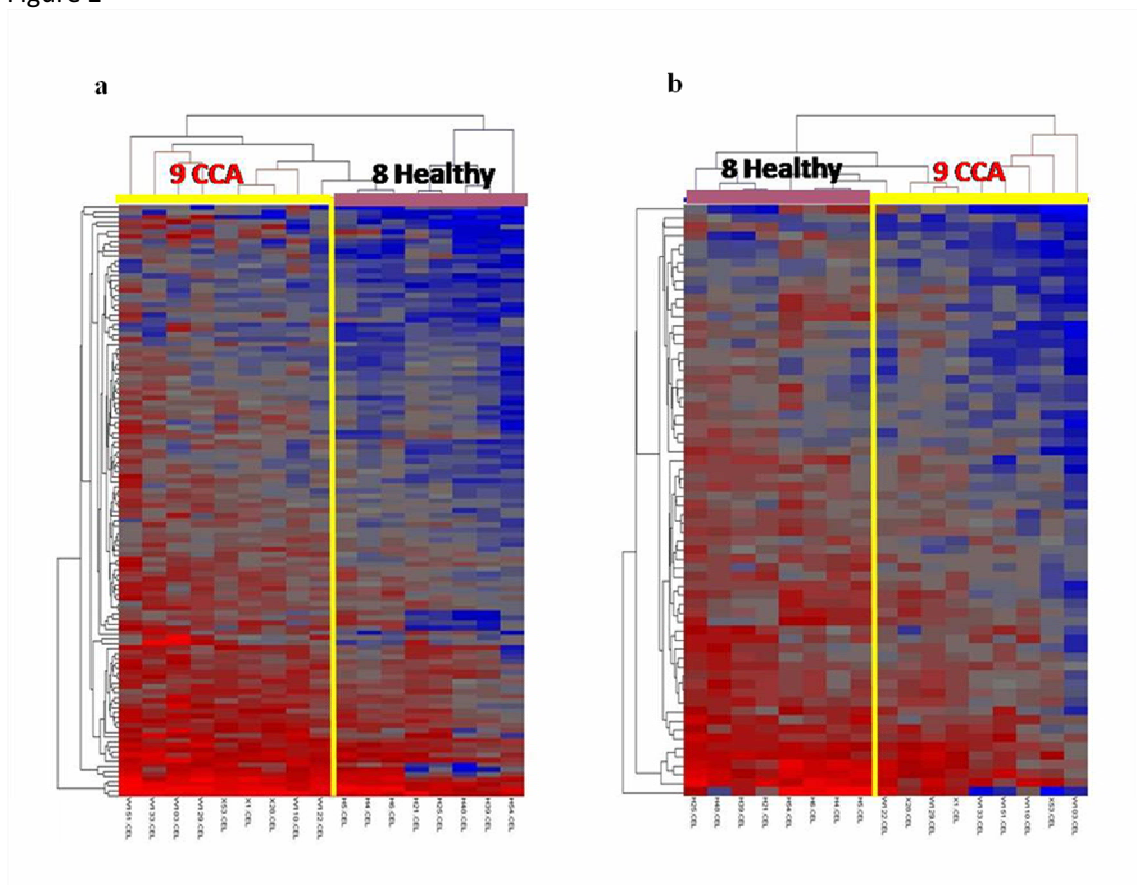


Figure 3

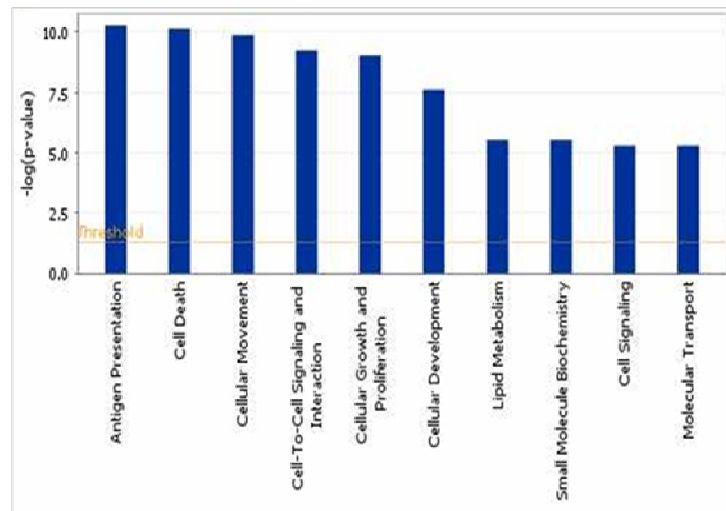


Figure 4

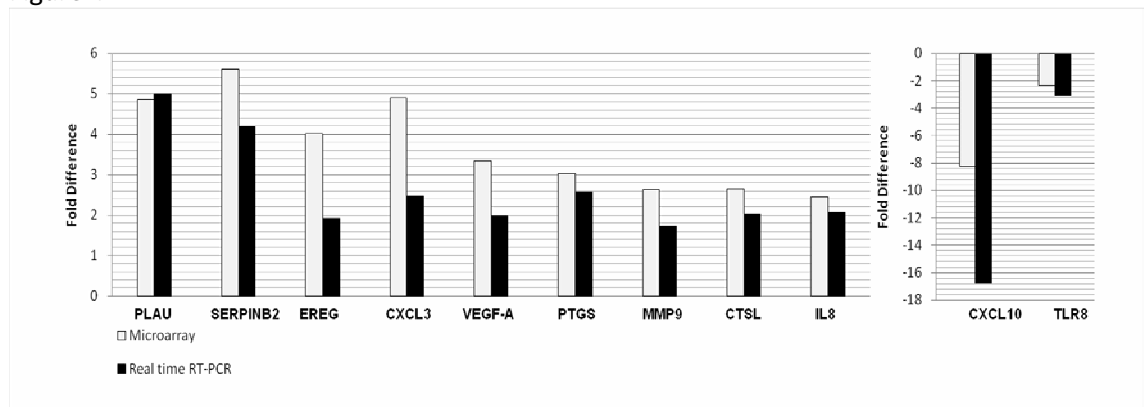


Figure 5

