**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

**โครงการ**

# ชนิดและคุณลักษณ์ของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้

# Identification/characterization of cholangiocarcinoma associated macrophages and its applications

**โดย รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ และคณะ**

ตุลาคม พ.ศ. 2553

สัญญาเลขที่ BRG498005

**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# โครงการ “ชนิดและคุณลักษณ์ของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้”


| คณะผู้วิจัย | สังกัด |
|---|---|
| 1. รศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ | ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. รศ.นพ.วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์ | ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. รศ.ดร.ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์ | ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 4. รศ.ดร.วีรพงศ์ ลุลิตานนท์ | 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 และนางสาวชุติมา ทรัพย์อิ่มเอิบ และ Prof. Michael S McGrath, Pathology and Medicine UCSF, San Francisco, USA ที่ร่วมเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของนางสาวชุติมา ทรัพย์อิ่มเอิบ ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่นที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยด้านสถานที่ ครุภัณฑ์และอุปกรณ์การวิจัย และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีที่สนับสนุนตัวอย่างชีวภาพของอาสาสมัครในโครงการ

รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ และคณะผู้วิจัย

# บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ: BRG4980015**

**ชื่อโครงการ: ชนิดและคุณลักษณ์ของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้**

**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 ที่พบสูงในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตัดก้อนมะเร็งออก ($P < 0.05$) แสดงว่าปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเป็น activated monocytes และสัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีชนิด non-papillary

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

การศึกษาการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวโดยใช้ 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 phenotyes 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. วิจารณ์และสรุป | 28 |
| 6. ผลการตีพิมพ์เผยแพร่ (รายละเอียดในภาคผนวก) | |
| 6.1 การวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่อยู่ในฐานะ 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 เมื่อวิเคาระห์ผลในวันเดียวกันเทียบกับการวิเคราะห์ผลในวันรุ่งขึ้น | 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 | เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณซลล์ $CD14^{+}/16^{+}$ 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 ของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากกลุ่มยีนในเม็ดเลือดขาวของคนปกติ | 13 |
| 13 | Hierarchical clustering analysis แสดงระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในเม็ดเลือดขาวของ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเม็ดเลือดขาวของคนปกติ | 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


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ CD14/16 เมื่อย้อมเซลล์และวิเคราะห์ภายในวันเดียว (within day) กับการวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้น (overnight) | 2 |
| 2 | เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครแต่ละกลุ่มในการศึกษา | 8 |
| 3 | ค่าเฉลี่ยปริมาณ % $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม | 8 |
| 4 | ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ในเลือดกับคุณลักษณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี | 11 |
| 5 | กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ | 14 |
| 6 | กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกต่ำในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ | 15 |
| 7 | การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าคนปกติตามบทบาทหน้าที่ | 16 |
| 8 | ผลการวิเคราะห์บทบาทของเม็ดเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis | 17 |
| 9 | ความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ Mac387 กับพยาธิวิทยาคลินิกของผู้ป่วย | 27 |

## Executive Summary

Tissue macrophage เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ โดยเฉพาะภาวะมะเร็ง การศึกษาในมะเร็งหลายชนิดแสดงว่า tissue macrophage ทำหน้าที่สนับสนุนการเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็ง โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาบทบาทของ tissue macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ในเลือดซึ่งมีหลักฐานแสดงว่าเป็นเซลล์ตัวอ่อนของ tissue macrophage นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยในผู้ป่วยโรคต่าง ๆแสดงว่าในเลือดผู้ป่วยมี 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 ที่พบสูงในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตัดก้อนมะเร็งออก ($P < 0.05$) แสดงว่าปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็ง นอกจากนี้ปริมาณ HLA-DR ซึ่งแสดงถึงภาวะ activated monocytes ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เช่นกัน การศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงว่า $CD14^+/CD16^+$ monocytes ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและมีความสัมพันธ์กับภาวการณ์เป็นมะเร็ง โดยพบว่าปริมาณ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิด non-papillary กับ papillary อย่างมีนัยสำคัญ

เพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่าง monocytes ในเลือดผู้ป่วยกับ tissue macrophage ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกื้อหนุนการดำรงชีวิตและการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็ง ได้ทำการติดตาม activated tissue macrophage ที่แปลงสภาพจากเม็ดเลือดกลุ่ม monocytes โดยใช้ Mac387 เป็นตัวติดตาม พบกลุ่มเซลล์ดังกล่าวหนาแน่นบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อปกติและบริเวณรอบเส้นเลือดในเนื้อเยื่อตับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีการแสดงออกของ MMP9 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์สำคัญในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์กลุ่ม Mac387 ที่มีการแสดงออกของ MMP9 จำนวนมากมีระยะรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีกลุ่มเซลล์ดังกล่าวในปริมาณต่ำ ผลการวิจัยเหล่านี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า activated tissue macrophage ที่แปลงสภาพจาก monocytes แสดงบทบาทเป็นเซลล์ที่เกื้อหนุนการดำรงชีวิตและการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็ง

การศึกษาการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับกลุ่มกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี และกลุ่มคนปกติ โดยใช้ microarray พบว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี และของกลุ่มคนปกติ โดยกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็งและภาวะ inflammation ในขณะที่กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของกลุ่มคนปกติเกี่ยวข้องกับ immune response การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เลือกมาศึกษาจำนวน 11 ยีนโดยวิธี real time PCR ให้ผลสอดคล้องกับผลของ microarray การศึกษายีนทั้ง 11 ชนิดในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 35 ราย และคนปกติ 21 ราย และวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนทั้ง 11 ชนิดในเม็ดเลือดขาวเป็นรายบุคคล พบว่ามีแบบแผนการแสดงออกทั้งที่เป็นปัจเจกบุคคลและที่สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ และเมื่อเลือกกลุ่มจีนที่เกี่ยวข้องกับ 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 นอกจากนี้โครงการนี้ยังได้สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาโครงการปริญญาเอกกาญาจนาภิเษก สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ คือ นางสาว ชุติมา ทรัพย์อิ่มเอิบ ซึ่งสำเร็จการศึกษาแล้วในปีการศึกษา 2552

**โครงการ ชนิดและคุณลักษณ์ของแมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้**

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

## 1. ความสำคัญและแนวทางวิจัย

ก้อนมะเร็งประกอบด้วยเซลล์มะเร็งและเซลล์อื่น ๆที่ประกอบกันเป็นภาวะแวดล้อมที่สนับสนุนการเกิด การเจริญและการแพร่รุกรานของเซลล์มะเร็ง เซลล์เหล่านี้ได้แก่ เซลล์ไขมัน ไฟโบรบลาส และเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในมะเร็งหลาย ๆชนิดเป็นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งถูกเหนียวนำให้มีพฤติกรรมและการแสดงออกในระดับโมเลกุลตาม cytokines ที่หลั่งจากเซลล์มะเร็งและองค์ประกอบของเซลล์ในก้อนมะเร็งนั้น การศึกษาทั้งในระดับปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองแสดงว่า เซลล์มะเร็งสามารถกำกับและเหนี่ยวนำให้แมคโครฟาจสร้างและหลั่งสารต่าง ๆที่สนับสนุนการอยู่รอด การพัฒนาและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ด้วยเหตุนี้จึงพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแมคโครฟาจในเนื้อเยื่อมะเร็ง (tumor associated macrophages, TAMs) กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งแทบทุกชนิด รวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี

แม้ว่านักวิทยาศาสตร์จะทราบมานานแล้วว่า เซลล์แมคโครฟาจที่พบในก้อนมะเร็งมีความหลาก หลาย แต่นักวิทยาศาสตร์เพิ่งตระหนักว่าเซลล์ monocyte ในเลือดซึ่งเป็นต้นกำเนิดของเซลล์แมคโครฟาจที่พบในก้อนมะเร็งก็มีความหลากหลายเช่นกัน การวิเคราะห์โมเลกุลบนผิวเซลล์โดยใช้ monoclonal antibody และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry ทำให้นักวิทยาศาสตร์พบเซลล์ monocyte อีกกลุ่มหนึ่งที่มีการแสดงออกของ $CD14^+/CD16^+$ และมีข้อบ่งชี้ว่าเซลล์เหล่านี้เป็นกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นแมคโครฟาจที่พบในเนื้อเยื่อ (circulating/activated/tissue macrophages) มีรายงานการตรวจพบเซลล์กลุ่ม $CD14^+/CD16^+$ monocytes สูงขึ้นมากกว่าปกติในเลือดของผู้ป่วยโรคต่าง ๆรวมทั้งผู้ป่วยโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ของระดับ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดกับภาวะความรุนแรงของโรคนั้น ๆเช่น HIV-associated dementia และ sporadic amyotrophic lateral sclerosis

รายงานวิจัยจัดทำขึ้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานที่เชื่อว่า เซลล์กลุ่ม circulating/activated/tissue macrophages หรือ $CD14^+/CD16^+$ monocytes ที่พบในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกที่จำเพาะต่อมะเร็งและมีความแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่พบในคนปกติและ/หรือผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี ความรู้ที่ได้จะทำให้เกิดความเข้าใจในบทบาทของเซลล์กลุ่มนี้ในกระบวนการก่อและแพร่รุกรานของมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้การแสดงออกที่จำเพาะที่พบในเซลล์กลุ่มดังกล่าวอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะและพยาธิสภาพของมะเร็งในผู้ป่วยได้

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อพิสูจน์ว่า

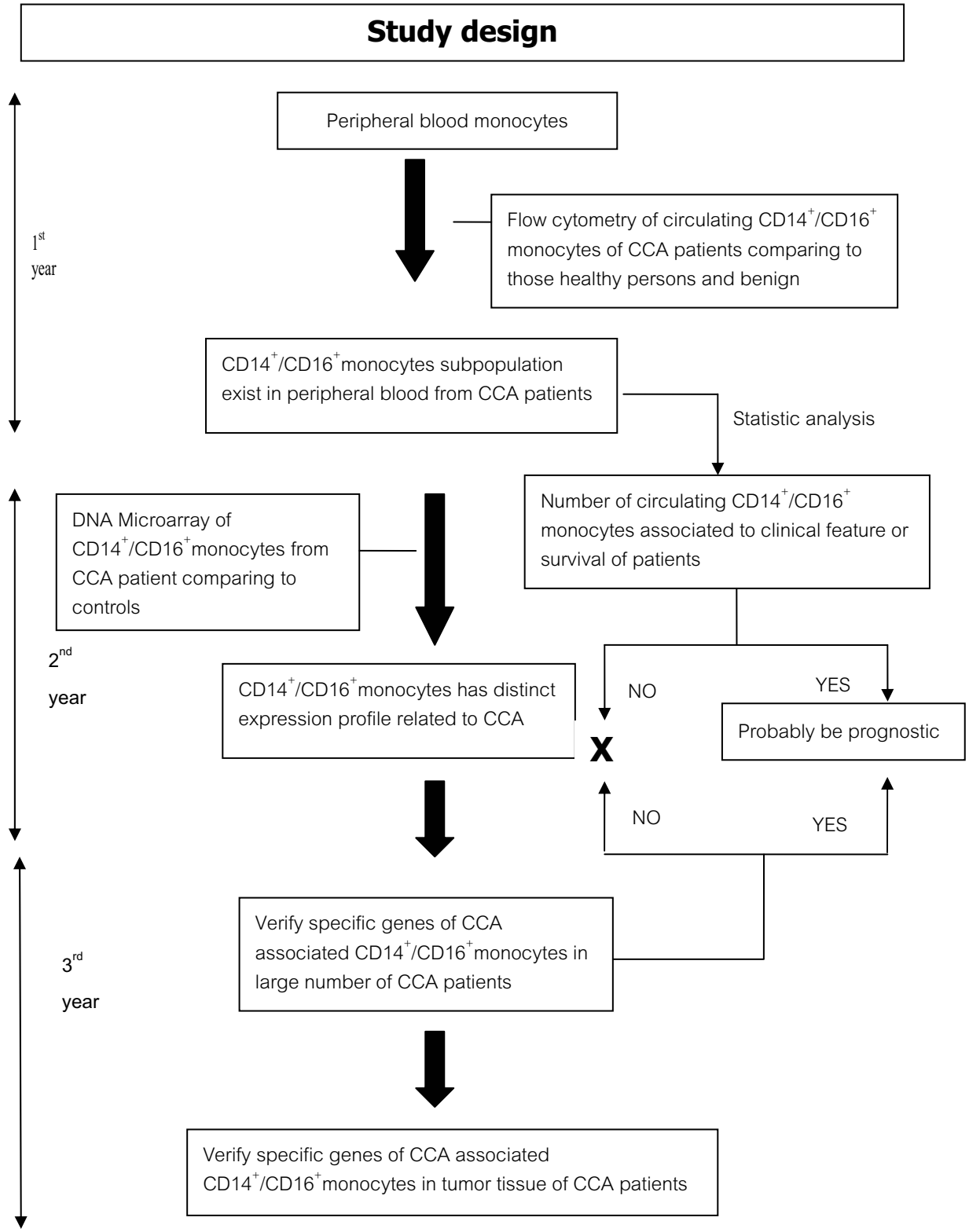
2.1 มีเซลล์กลุ่ม $CD14^+/CD16^+$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์กลุ่มนี้สัมพันธ์กับภาวะโรคและพยาธิสภาพของผู้ป่วย

2.2 circulating/activated/tissue macrophages ที่พบในเนื้อเยื่อผู้ป่วยเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของมะเร็ง

2.3 การแสดงออกของเซลล์กลุ่ม $CD14^+/CD16^+$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างจากคนปกติและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพในการวินิจฉัยหรือพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

**3. <u>แผนการทดลอง</u>**

ได้แบ่งการศึกษานี้เป็น 3 ขั้นตอนตามแผนภูมิ




โครงการนี้ได้รับการรับรองการดำเนินการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE471214

4. **ผลการวิจัย**

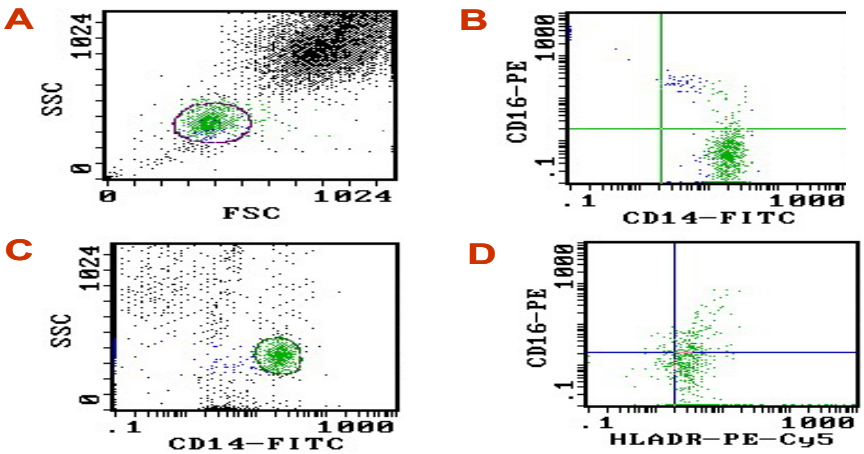
4.1 ศึกษา CD14/16 monocyte ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

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 สะดวกกว่าและไม่มีปัญหาเรื่องเซลล์สูญหายระหว่างการตรียม การวิจัยนี้จึงใช้ whole blood เป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไป

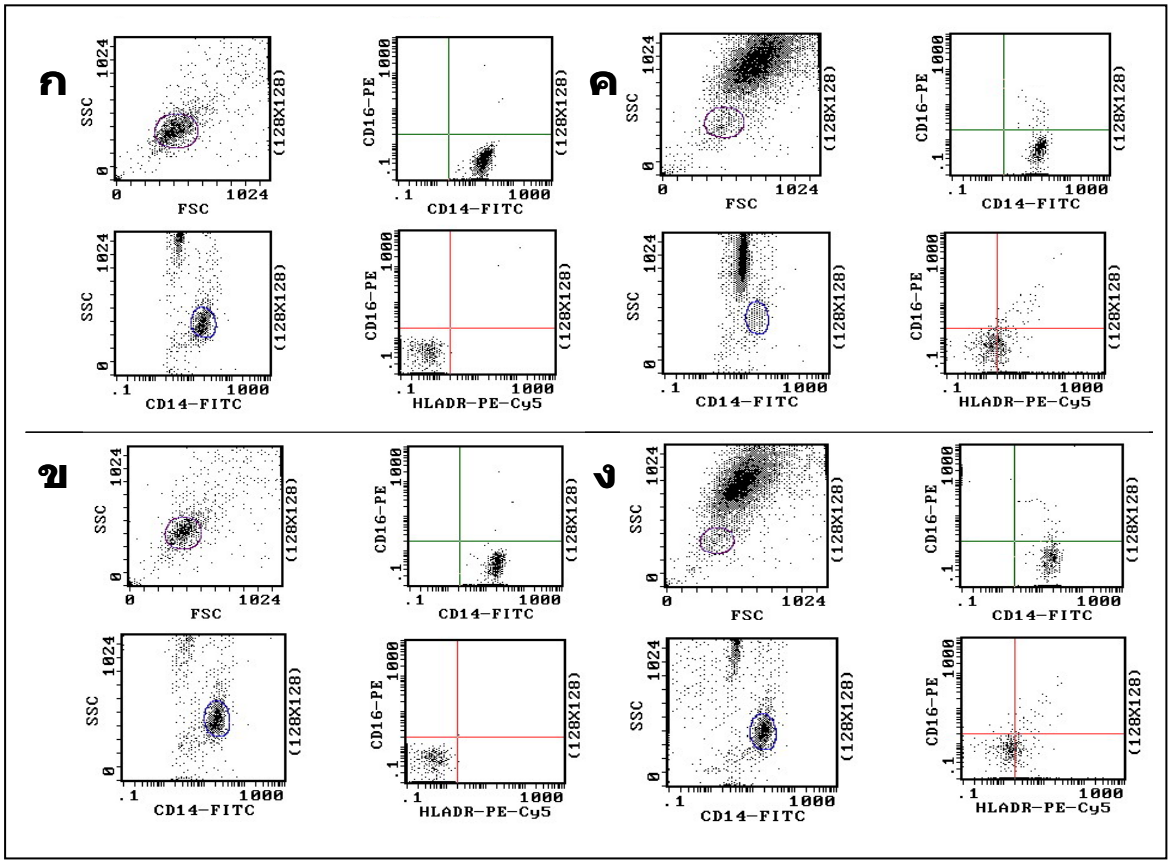
เนื่องจากความสมบูรณ์ในการทำลายเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดมีผลต่อการวิเคราะห์ $CD14^{+}/CD16^{+}$ monocytes โดยวิธี Flow cytometry จากการเปรียบเทียบการทำลายเม็ดเลือดแดงด้วย lysis solution พบว่าวิธีที่ให้ผลดีที่สุด คือ การใช้ lysis solution 2 ml ต่อ heparinized blood 0.1 ml ในเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C 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 เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีและสีที่ใช้ติดตาม สามารถปรับตัวแปรเพื่อให้อ่านค่าของแอนติบอดีแต่ละชนิดได้ดังแสดงในรูปที่ 1




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

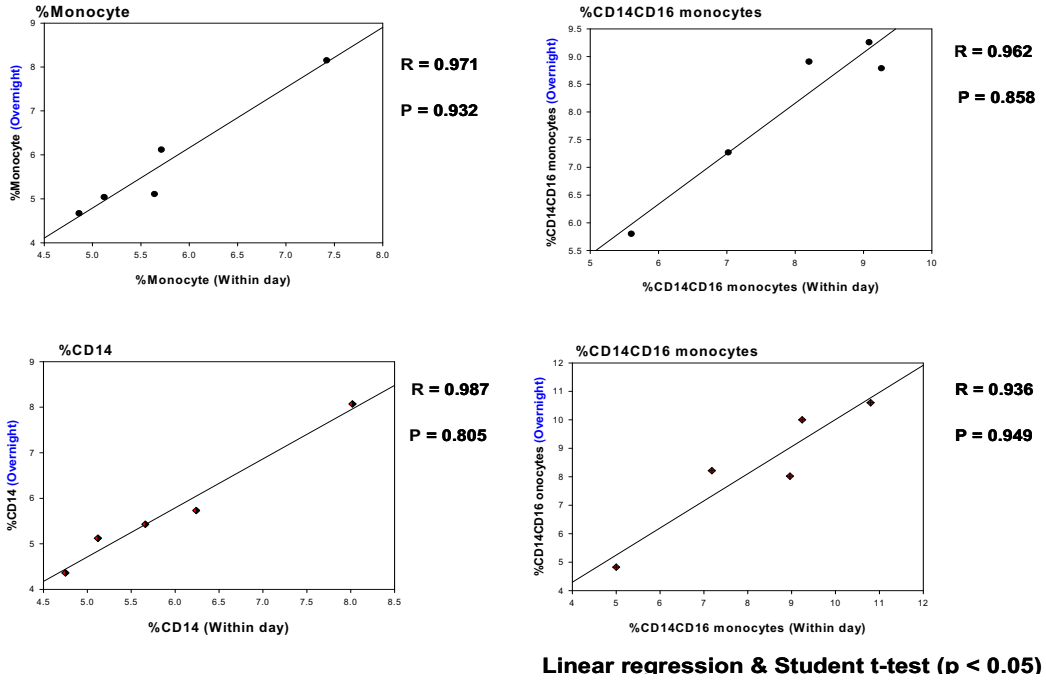
เปรียบเทียบการใช้ antibody ที่ความเข้มข้นต่าง ๆพบว่า การใช้ antibody ที่มีความเข้มข้นต่ำให้ผลดีกว่า สามารถลด false positive และ background ได้ (รูปที่ 2) จึงเลือกใช้ antibody ที่ความเข้มข้นต่ำในการย้อมเซลล์ลดความแปรปรวนของการทดสอบ และเนื่องจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้จากห้องผ่าตัดในแต่ละวันไม่แน่นอน แต่การย้อมเซลล์และวิเคราะห์ ต้องใช้เลือดสดและทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ซึ่งบางครั้งได้รับเลือดในเวลาเย็นทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ในวันนั้นได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบว่าการเตรียมตัวอย่าง-ย้อมเซลล์และวิเคราะห์โดย Flow cytometer ทันทีกับการเก็บเซลล์ที่ย้อมไว้แล้วและวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้นให้ผลแตกต่างกันหรือไม่ จากการเปรียบเทียบตัวอย่างเลือด 5 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสงในตารางที่ 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 fluoresence

**ตารางที่ 1** เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ CD14/16 เมื่อย้อมเซลล์และวิเคราะห์ภายในวันเดียว (within day) กับวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้น (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 |



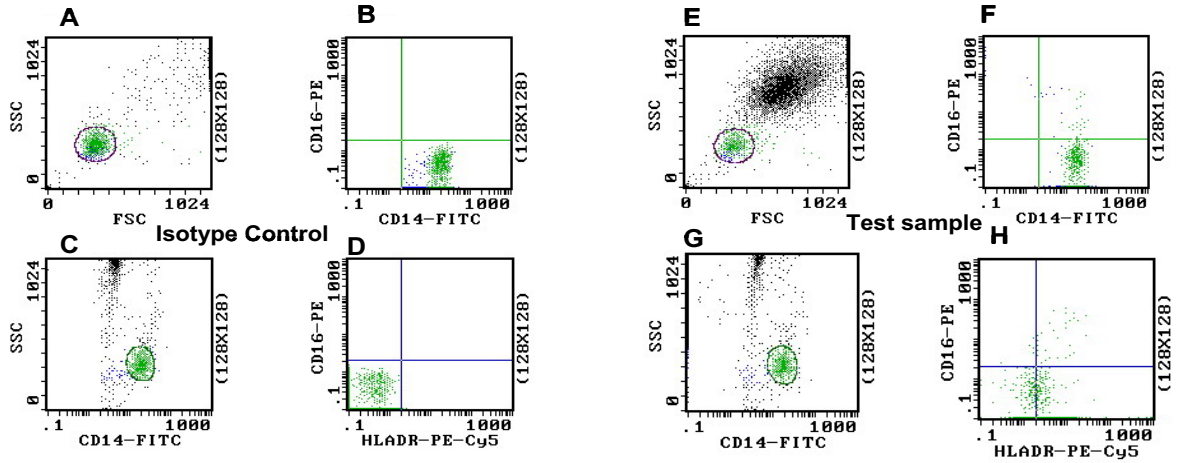

**<u>รูปที่ 3</u>** ความสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์ monocytes และ $CD14^{+}/16^{+}$ monocyte เมื่อวิเคราะห์ผลในวันเดียวกันเทียบกับการวิเคราะห์ผลในวันรุ่งขึ้น

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-FITCและ RPE พร้อมกันไม่ได้ด้วยเครื่อง Coulter Epic XL-MCL (Beckman Coulter) และการแก้ปัญหาโดยวิธีดังกล่าวให้ค่าที่ถูกต้องเชื่อถือได้

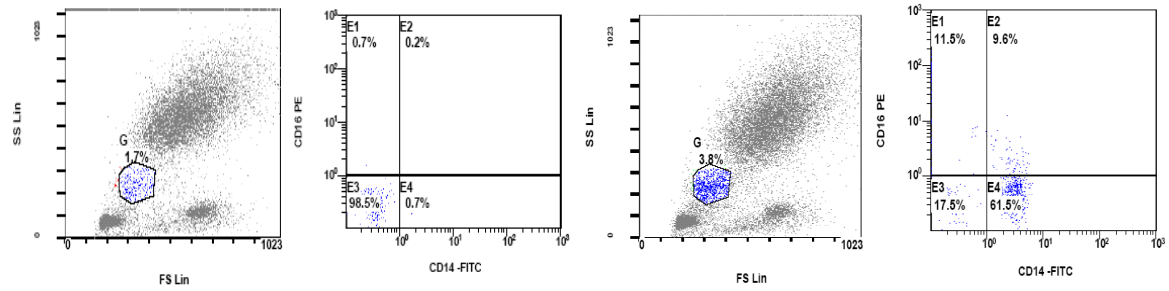
### 4.1.2 การรวบรวมอาสาสมัครในโครงการ

ในการศึกษานี้ต้องใช้เลือดจากอาสาสมัครที่เป็นคนปกติ ซึ่งได้จากกลุ่มคนปกติที่มารับการตรวจร่างกายที่คลินิกพิเศษ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จึงต้องทำการขอรับรองการศึกษาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เพิ่มเติม ซึ่งได้รับความเห็นชอบแล้วตามเลขที่ HE480312 และได้ศึกษาข้อมูลเพื่อวางเกณฑ์การคัดผู้ป่วยและคนปกติไว้เพื่อเลือกอาสาสมัคร

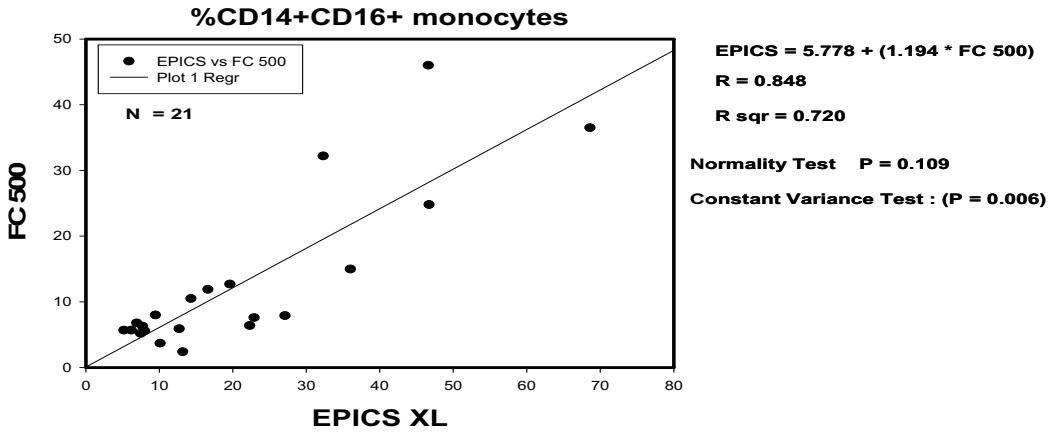
เนื่องจากการตรวจปริมาณ CD14/16/HLA-DR monocytes ในเลือดมีความจำเป็นต้องตรวจวัดภายใน 24 ชั่วโมง จึงต้องทำการเก็บเลือดตัวอย่างแบบ prospective study และกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมให้มีอายุเฉลี่ยและเพศในอัตราที่ไม่แตกต่างกัน และเกณฑ์เฉพาะกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 2




**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

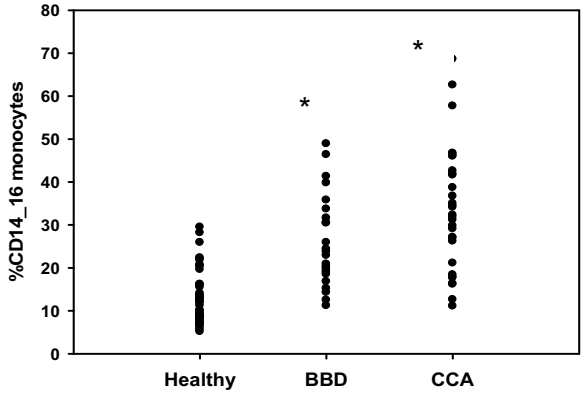
**ตารางที่ 2** เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครแต่ละกลุ่มในการศึกษา

| กลุ่มอาสาสมัคร | จำนวน (ราย) | เกณฑ์คัดเข้า | เกณฑ์คัดออก |
|---|---|---|---|
| ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี | 31 | ได้รับการผ่าตัดและผลชิ้นเนื้อแสดงว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี | ผู้ป่วยได้รับยาหรือการรักษาใด ๆก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด |
| คนปกติ | 47 | ผลการตรวจร่างกายปกติ ผล complete blood count, blood sugar และ liver function test อยู่ในเกณฑ์ปกติ | |
| ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี | 23 | ได้รับการผ่าตัดและผลชิ้นเนื้อแสดงว่ามีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีและไม่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี | ผู้ป่วยได้รับยาหรือการรักษาใด ๆก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด |

**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) จะมากน้อยแตกต่างกันตามสภาพของร่างกาย

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



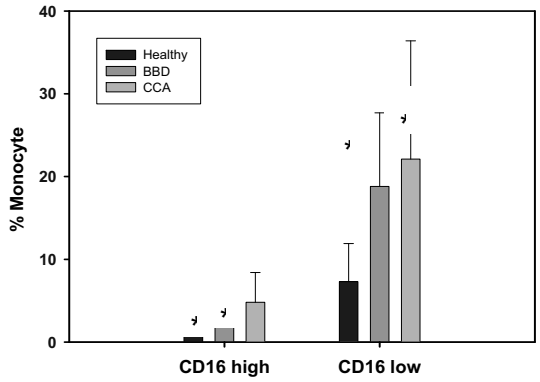

**รูปที่ 7** เปรียบเทียบปริมาณ CD14/16 monocyte ในเลือดของอาสาสมัครแต่ละรายในกลุ่มต่าง ๆ: Healthy = คนปกติ, BBD = ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี, CCA = ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

**ตารางที่ 3** ค่าเฉลี่ยปริมาณ % $CD14^+/16^+$ monocytes ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม

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

*แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ P< 0.05

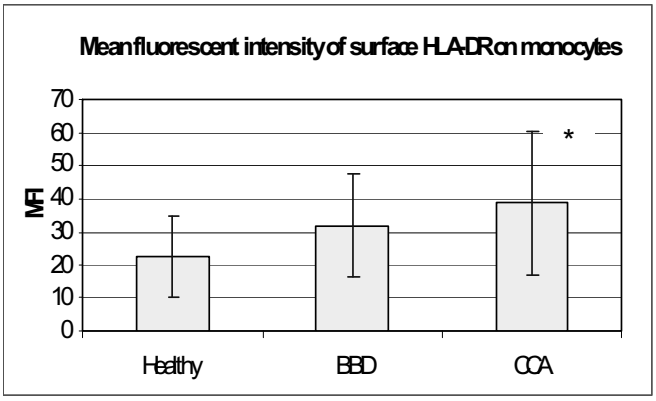
เมื่อจำแนกชนิดของ CD14/16 monocytes ที่พบในอาสาสมัครแต่ละกลุ่มเป็นชนิดที่มี CD16 สูง ($CD14^{+}/16^{++}$) และชนิดที่มี CD16 ต่ำ ($CD14^{+}/16^{+}$) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีมีระดับ $CD14^{+}/16^{++}$ monocytes และ $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes มากกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน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




**<u>รูปที่ 8</u>** เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes และ $CD14^{+}/16^{++}$ monocytes ในอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ $P < 0.05$

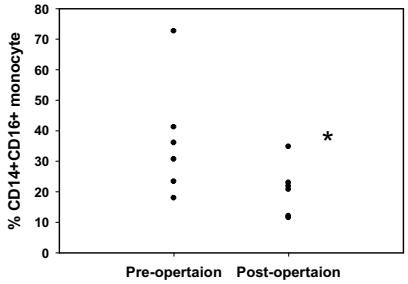
เพื่อให้ทราบว่า $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes อยู่ในภาวะถูกกระตุ้น (activated monocytes) หรือไม่ จึงได้ติดตามปริมาณของ HLA-DR ซึ่งเป็น marker ของเซลล์ที่ถูกระตุ้นใน $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ด้วย พบว่า $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีปริมาณ HLA-DR สูงกว่าเซลล์ในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 9) แสดงว่า $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอยู่ในภาวะ activated มากกว่ากลุ่มควบคุม




**<u>รูปที่ 9</u>** เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ HLADR ใน $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ของอาสาสมัครทั้งสามกลุ่ม Healthy = คนปกติ, BBD = ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดี, CCA = ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

*แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ $P < 0.05$

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



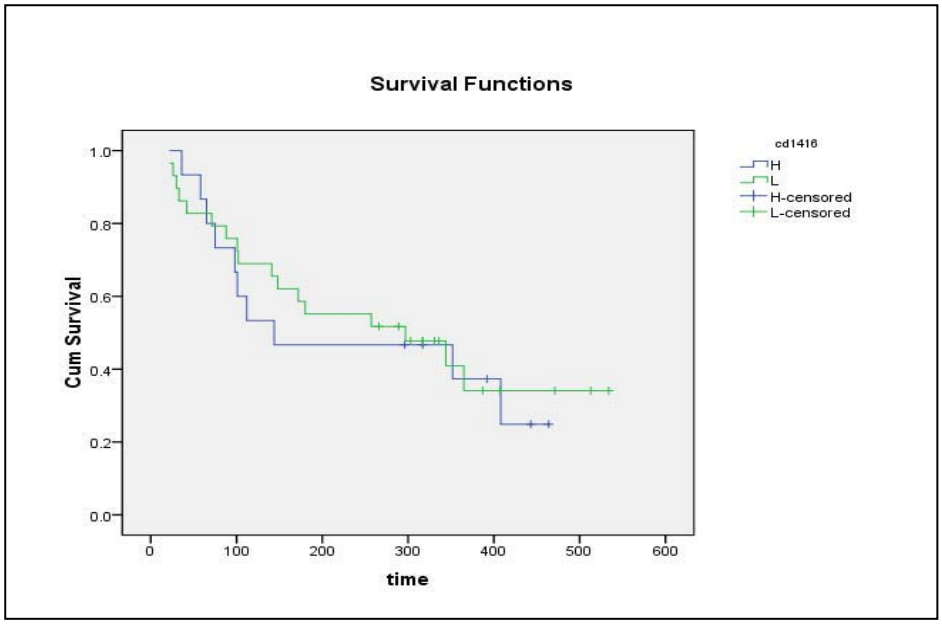

**<u>รูปที่ 10</u>** เปรียบเทียบปริมาณ $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ก่อนและหลังผ่าตัดในผู้ป่วยรายเดียวกัน

*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 กับคุณลักษณ์อื่น 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




**<u>รูปที่ 11</u>** เปรียบเทียบระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี $CD14^+/16^+$ monocyte ในเลือดสูง (-----) และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี $CD14^+/16^+$ monocyte ในเลือดต่ำ (-----)

**ตารางที่ 4** ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ $CD14^{+}CD16^{+}$ monocyte ในเลือดกับคุณลักษณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี

| 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 | | | |
| • Well differentiated | 22 | 198 ± 146 | 0.885 |
| • Moderately–Poorly differentiated | 7 | 218 ± 166 | |
| Macroscopic appearance | | | |
| • Mass formind type | 16 | 189 ± 154 | 0402 |
| • 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 | | | |
| • Low IHC index (<2) | 12 | 122 ± 70 | 0.047 |
| • 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 จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีตัวอย่างชิ้นเนื้อยืนยันจำนวน 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 (IzolnvitrogentPurelink 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 Affimetrix 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

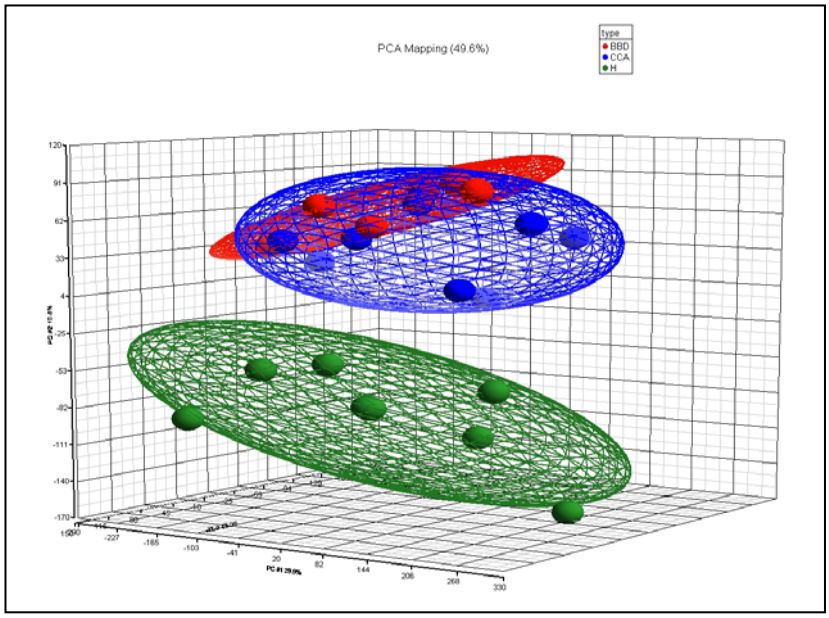
ได้วิเคราะห์ผลของ cDNA microarray และทดสอบนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA โดยกำหนดระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและคนปกติที่มีค่าต่างกันมากกว่า 1.5 เท่า และมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ ในการคัดเลือกยีนมาศึกษาต่อ (ตารางที่ 5 และ 6)

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวระหว่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดี และคนปกติ โดยโปรแกรม Principal Component Analysis (PCA) แสดงว่ากลุ่มยีน (49.2%) ที่แสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างจากกลุ่มยีนในเม็ดเลือดขาวของคนปกติและมียีนที่แสดงออกคาบเกี่ยวกับกลุ่มยีนในเม็ดเลือดของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดี (รูปที่ 12)

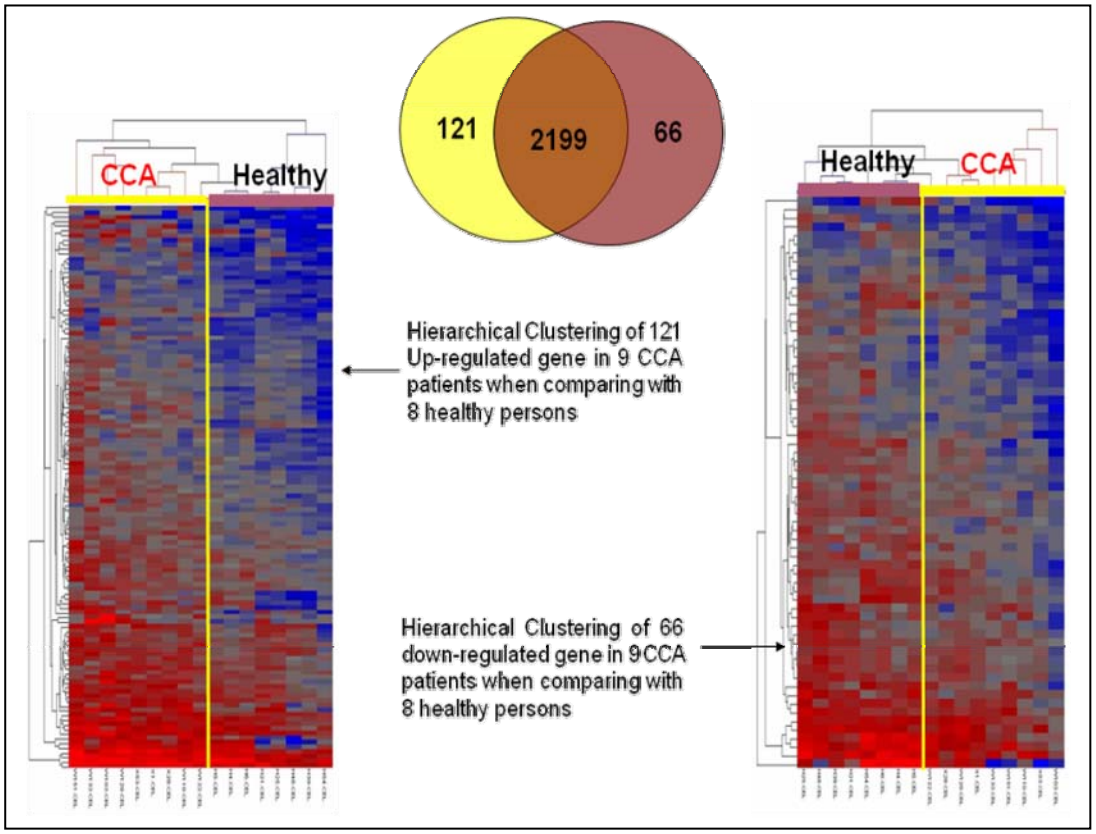
การวิเคราะห์และเปรียบเทียบยีนในเม็ดเลือดขาวระหว่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและคนปกติที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกัน โดยโปรแกรม Hierarchical Clustering พบว่า เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมียีนที่แสดงออกในระดับที่เท่ากันจำนวน 2,199 ยีน ยีนที่แสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าของคนปกติจำนวน 121 ยีน และยีนที่แสดงออกในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่ำกว่าของคนปกติจำนวน 66 ยีน (รูปที่ 13)

การทำนายภาพรวมในการทำงานของเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับคนปกติ จากข้อมูลยีนที่มีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี สามารถจัดกลุ่มยีนตามบทบาทหน้าที่ดังแสดงในตารางที่ 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 metallopeptidase 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**

| Gene Symbol | Fold Change |
|---|---|
| LTF | 3.22778 |
| SLC16A3 | 1.86919 |
| NDRG1 | 1.76206 |
| GNA15 | 1.70535 |
| M F1 | 1.63618 |
| RIT1 | 1.60813 |
| ATP6V1C1 | 1.55422 |
| RAC2 | 1.53564 |
| NPC1 | 1.51838 |
| TLOC1 | 1.50378 |
| SDC2 | 2.61611 |
| ETS2 | 1.85394 |
| CKAP4 | 1.6506 |
| TUBB | 1.52426 |
| SQSTM1 | 1.65663 |
| TNFRSF1B | 1.6219 |

**Metabolism related genes**

| Gene Symbol | Fold Change |
|---|---|
| PTGES | 3.04231 |
| ABCA1 | 2.93605 |
| RNASE2 | 2.50164 |
| AMPD3 | 2.19578 |
| IRS2 | 1.98094 |
| UPP1 | 1.89277 |
| NP | 1.84771 |
| GALNACT-2 | 1.7398 |
| AGPAT6 | 1.71013 |
| GPI | 1.69501 |
| DGAT2 | 1.69009 |
| FAM108A1 | 1.68284 |
| SLC2A3 | 1.6591 |
| C20orf3 | 1.6462 |
| NTE | 1.61328 |
| PKM2 | 1.60132 |
| RP5-1022P6.2 | 1.57548 |
| ZUBR1 | 1.5551 |
| MAP1LC3B | 1.52752 |

**Regulatory/ Protein modification related genes**

| Gene Symbol | Fold Change |
|---|---|
| FOSL2 | 2.57995 |
| EXOSC4 | 2.21338 |
| FOS | 2.09213 |
| GPR97 | 1.99421 |
| GNG2 | 1.75065 |
| PDE4A | 1.73108 |
| RALGDS | 1.68044 |
| SLA2 | 1.6309 |
| SRPK1 | 1.62347 |
| SH3BP5 | 1.62004 |
| APLP2 | 1.58245 |
| ARRB2 | 1.52865 |
| PPIF | 2.62913 |
| HSPA1A /1B | 2.12322 |
| DNAJB1 | 1.85094 |
| TRIB1 | 1.82598 |
| HSPE1 | 1.7213 |
| DNAJC5 | 1.70657 |
| MAPK6 | 1.63669 |
| RANBP2 | 1.62085 |
| ST13 | 1.58644 |
| PTPRE | 1.58431 |
| HSP90AB1 | 1.57809 |
| B3GNT5 | 1.57809 |
| MAP4K4 | 1.56112 |
| PRKCD | 1.52045 |
| OXSR1 | 1.51416 |

**Protease, Peptidase and Invasion related genes**

| Gene Symbol | Fold Change |
|---|---|
| PLAU | 6.3388 |
| SERPINB2 | 5.60283 |
| THBD | 3.87076 |
| OLR1 | 2.67693 |
| CTSL | 2.64564 |
| MMP9 | 2.62559 |
| ADAM9 | 1.96734 |
| TIMP1 | 1.87811 |
| CPD | 1.82203 |
| TPP1 | 1.52183 |

**Growth factor/Angiogenic/ Cell growth genes**

| Gene Symbol | Fold Change |
|---|---|
| EREG | 4.01995 |
| VEGF | 3.33421 |
| IL8 | 2.46387 |
| ANPEP | 2.26976 |
| FLNA | 2.06052 |
| TFDP1 | 1.7254 |
| G0S2 | 1.70691 |
| INPP5A | 1.67145 |
| PTDSR | 1.6638 |
| ITGAX | 1.66255 |
| TGFB1 | 1.57519 |
| SIGLEC5 | 1.51549 |

**Inflammation, Immune response, Cytokine, /Chemokine related genes**

| Gene Symbol | Fold Change |
|---|---|
| CXCL3 | 4.90128 |
| CXCL2 | 2.88502 |
| IL1R1 | 2.77718 |
| IL1R2 | 2.08442 |
| FCAR | 2.03052 |
| CD93 | 1.96563 |
| CORO1C | 1.78989 |
| CXCL16 | 1.56218 |
| RABGEF1 | 1.54423 |
| CST7 | 1.51943 |

4.2.3 การวิเคราะห์บทบาทของเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

เมื่อนำยีนและระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวิเคราะห์บทบาทของเม็ดเลือดขาวในภาพรวมโดยใช้ Ingenuity pathway analysis พบว่าเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี มีการทำงานที่เกี่ยวข้องกับภาวะของโรคหรือความผิดปกติเรียงตามจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 4

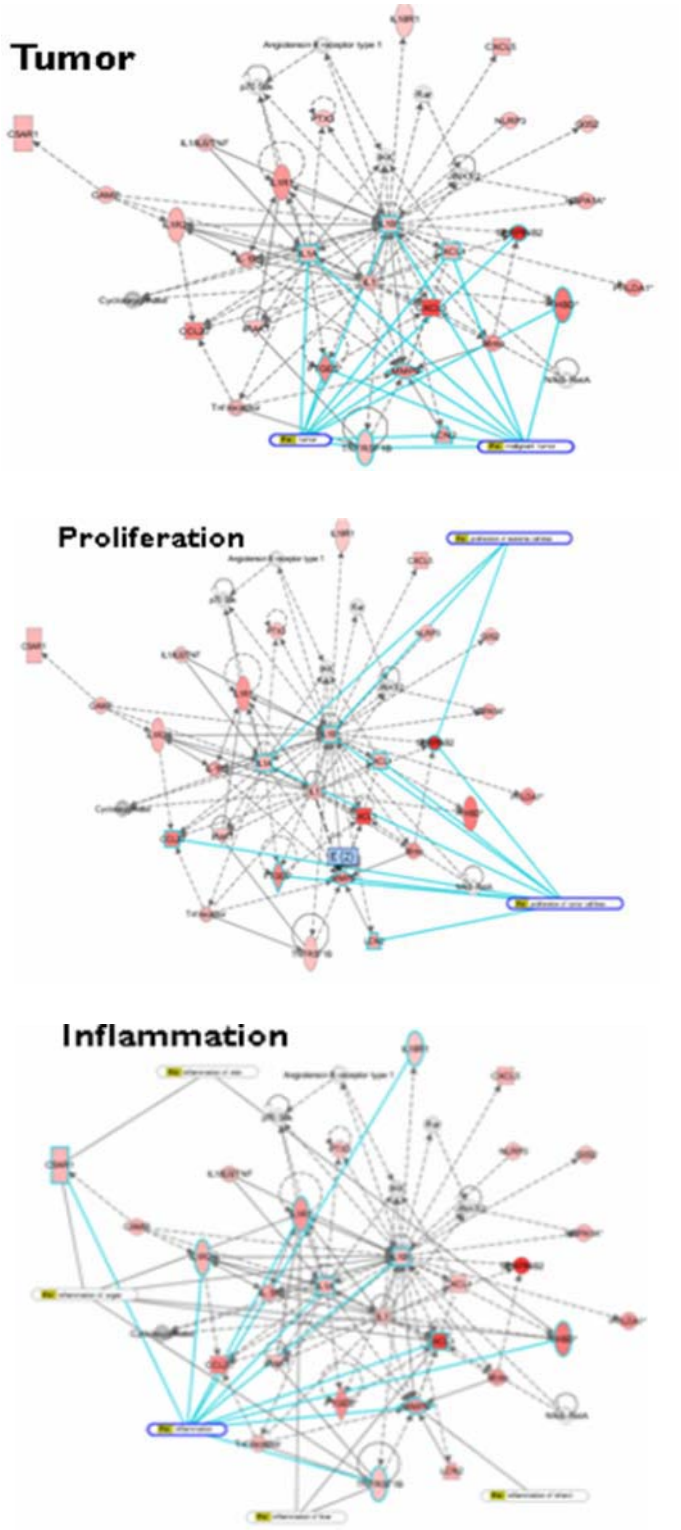
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์บทบาทของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis

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

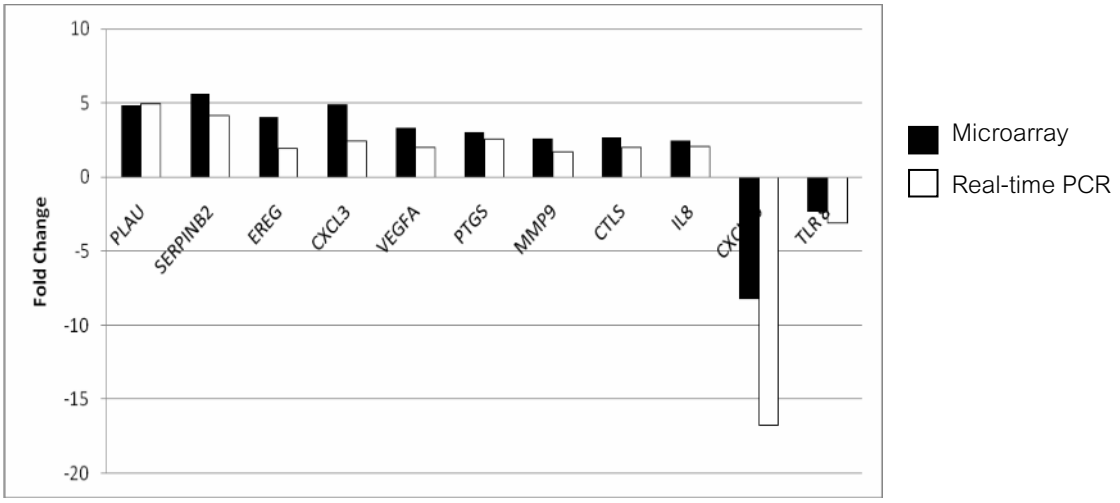
4.2.4 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกจากข้อมูล microarray โดยวิธี real time PCR

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 miroarray, 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




<u>รูปที่ 14</u> ความสัมพันธ์ของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ Ingenuity pathway analysis




รูปที่ 15 เปรียบเทียบระดับ mRNA ในตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี 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) จากภาพรวมเบื้องต้นที่ได้นี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกเฉพาะกลุ่มยีนที่มีรูแบบการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ ได้แก่กลุ่มยีนที่เกี่ยวกับ 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

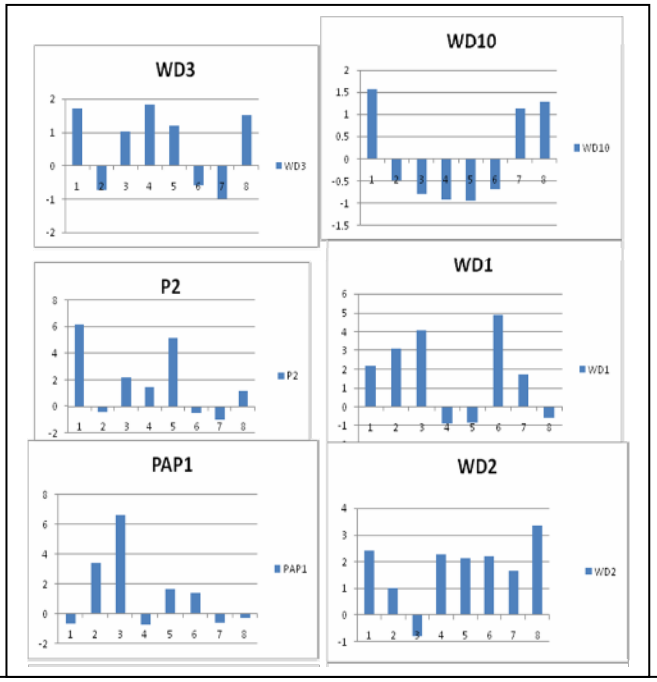
$$\text{Risk score} = 1.020\,\text{PLAU} + 1.214\,\text{CTSL} - 0.882\,\text{SERPINB2}$$

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

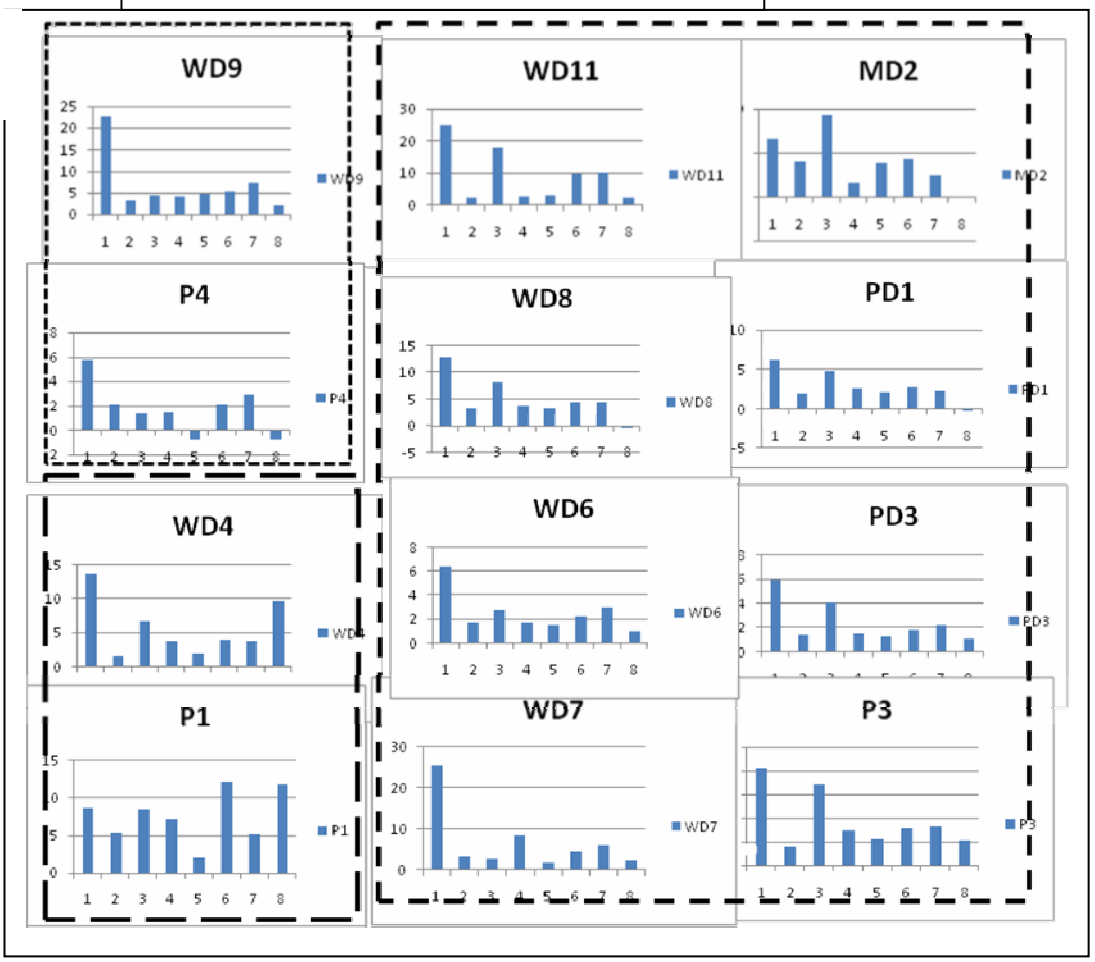
gene เป็นจุดตัด = 4.21 สามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk score สูงออกจากกลุ่มผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk score ต่ำ ซึ่งมีค่าระยะรอดชีพ (survival time) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Log rank, $P = 0.021$) ดังแสดงในรูปที่ 18 โดยผู้ป่วยที่เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ risk 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



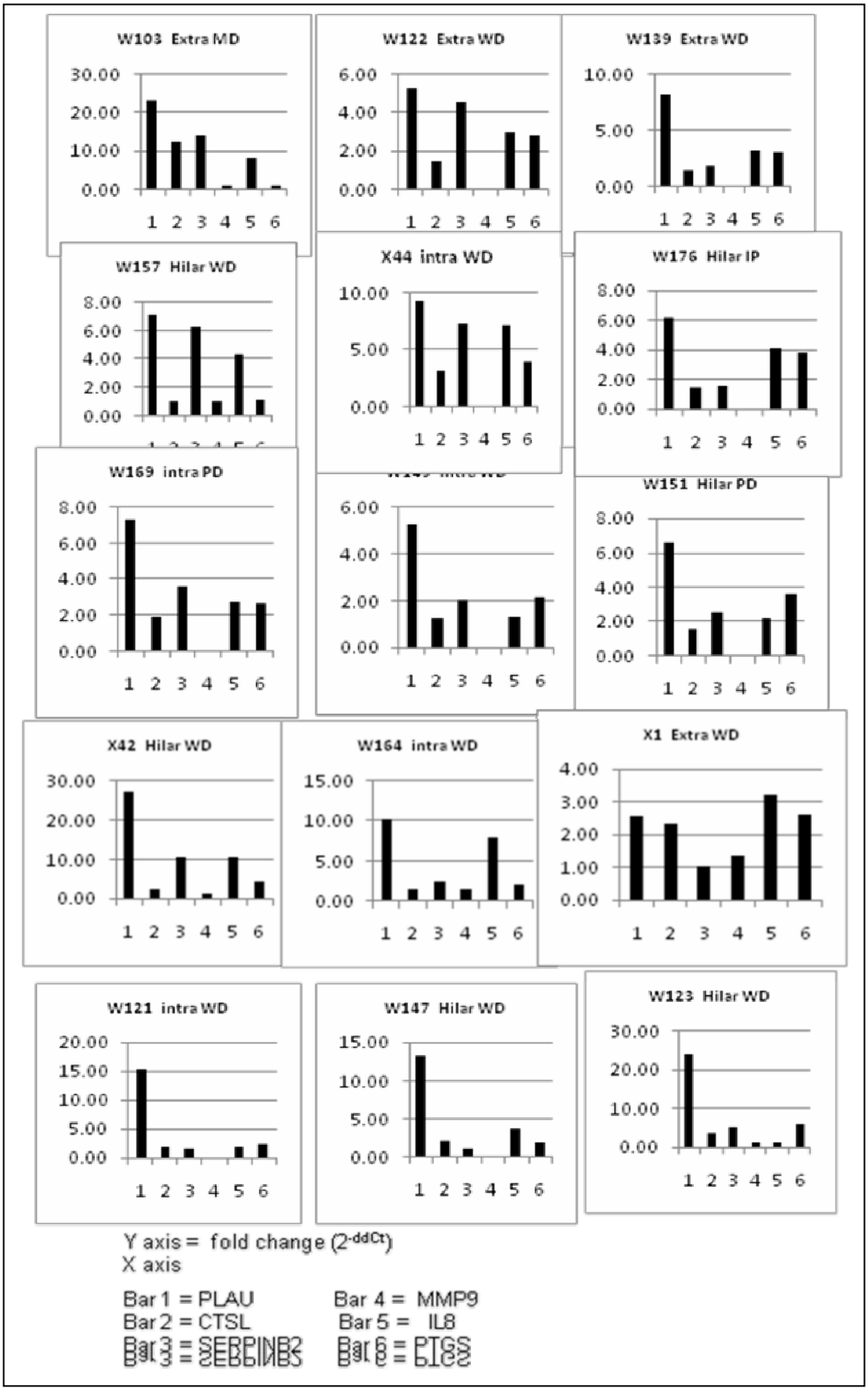

ข



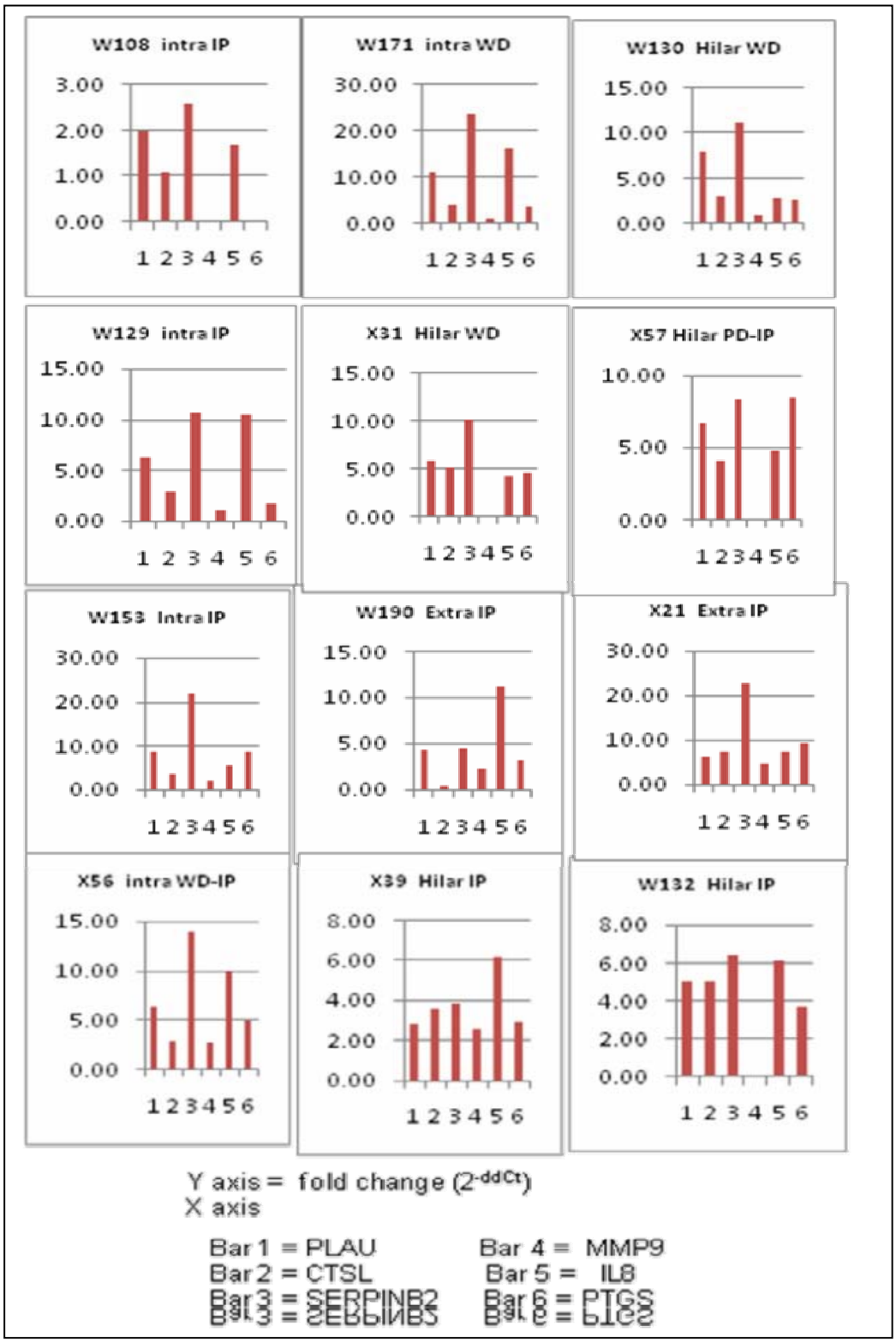

รูปที่ 16 แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ก. แผนภาพที่มีลักษณะเป็นปัจเจกบุคคล

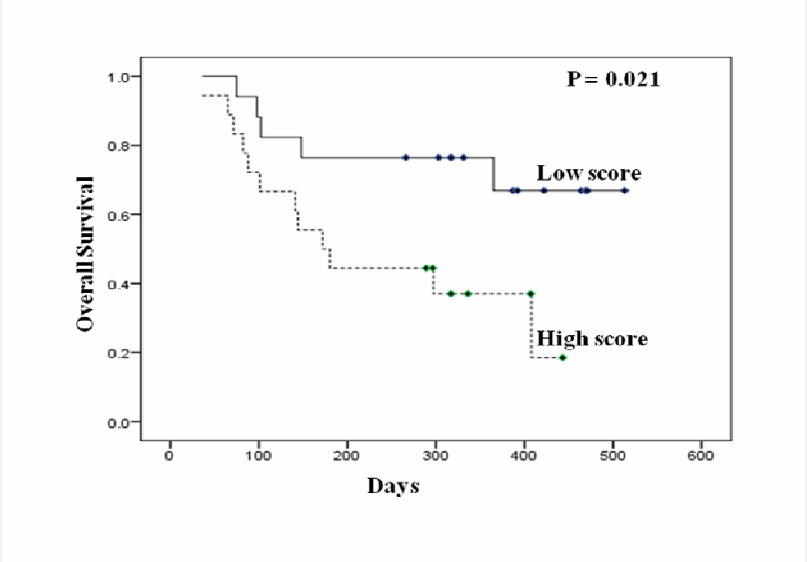
ข. แผนภาพที่สามารถจัดเป็นกลุ่มย่อย




รูปที่ 17 ก แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic สูง แต่ inflammation ต่ำในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี




รูปที่ 17 ข แผนภาพระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic ต่ำแต่ inflammation สูงในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี




รูปที่ 18 แผนภาพเปรียบเทียบระยะรอดชีพผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม proteolytic และ inflammation ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

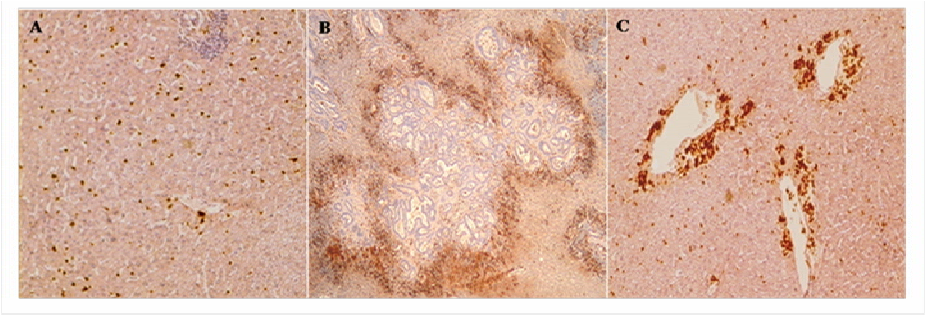
4.4 เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งสัมพันธ์กับระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาเม็ดเลือดขาวชนิด $CD14^{+}/16^{+}$ monocyte และการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับภาวะมะเร็งและระยะรอดชีพของผู้ป่วย แสดงว่าเม็ดเลือดขาวมีบทบาทสำคัญต่อมะเร็ง การทบทวนวรรณกรรมบ่งชี้ว่า เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ซึ่งเมื่อเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีและแปลงสภาพเป็น tissue macrophage มักทำงานร่วมกับเซลล์มะเร็งในการเกื้อหรือสนับสนุนประโยชน์ต่อการเจริญและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง เพื่อทดสอบสมมุติฐานดังกล่าว จึงได้ขยายการศึกษาเพื่อติดตาม tissue macrophage ที่เพิ่งแปลงสภาพจากเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte โดยใช้ Mac387 ซึ่งเป็น surface marker ของเซลล์ดังกล่าว และเพื่อแสดงว่า tissue macrophage เอื้อต่อการแพร่ลุกลามของมะเร็ง ได้เลือกยีน MMP9 ซึ่งพบในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตัวตรวจสอบ

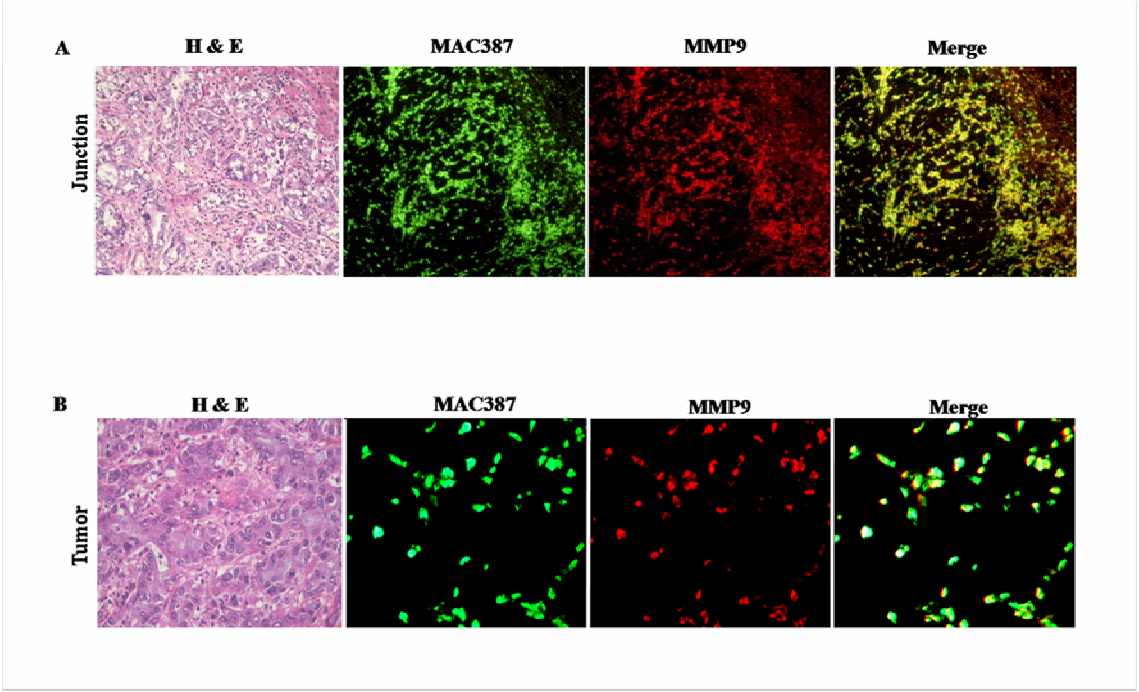
การศึกษาโดยวิธี immunohistochemistry ของ Mac387 และ MMP9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 50 ราย พบว่า เซลล์เม็ดเลือดที่ติด Mac387 พบกระจายในเนื้อเยื่อตับและบริเวณมะเร็งที่มีสภาพ necrosis แต่พบจำนวนมากบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อตับและบริเวณรอบเส้นเลือด (รูปที่ 19) 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 โดยdouble 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

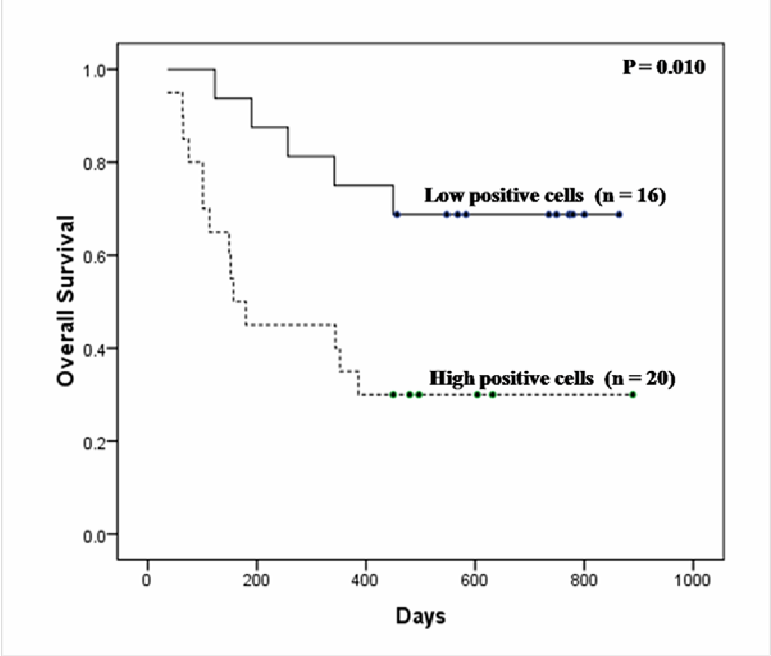
จำนวนมากที่มีระยะรอดชีพมากกว่า 1 ปีหลังรับการผ่าตัด ในขณะที่ 75% ของของผู้ป่วยกลุ่มที่เนื้อเยื่อมะเร็งมีเซลล์ที่ติด Mac387 จำนวนน้อยที่มีระยะรอดชีพมากกว่า 1 ปีหลังรับการผ่าตัด




รูปที่ 19 Immunohistochemistry ของ Mac387 ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
A เซลล์ tissue macrophage ที่ย้อมติด Mac387 ในเนื้อเยื่อตับที่ไม่พบมะเร็ง
B เซลล์ tissue macrophage ที่ย้อมติด Mac387 ซึ่งพบหนาแน่นบริเวณขอบเนื้อเยื่อมะเร็งติดเนื้อเยื่อตับ
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 มีการเปลี่ยนแปลงที่มีแนวโน้มเกื้อหนุนภาวะมะเร็ง เพราะพบเซลล์กลุ่ม $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes ในเลือดผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณของเซลล์ $CD14^{+}/16^{+}$ monocytes กลุ่มนี้ลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดก้อนมะเร็งออก 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 ๆเส้นเลือด ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทของเซลล์กลุ่มนี้ที่อาจเกี่ยวข้องกับการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง การตรวจพบการแสดงออกของ MMP9 ในเซลล์กลุ่มนี้แสดงว่าเซลล์เหล่านี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการช่วยให้เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังเนื้อเยื่อใกล้เคียง เพราะ MMP9 เป็นเอ็นไซม์สำคัญในการย่อยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเคลื่อนที่รุกรานออกนอกบริเวณต้นกำเนิดได้ ปริมาณของเซลล์ Mac387 ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อมะเร็งแปรผกผันกับระยะรอดชีพของผู้ป่วย สนับสนุนสมมุติฐานที่เชื่อว่าเซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่เกื้อหนุนมะเร็งมากกว่าทำลายเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดีและการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะแพร่ลุกลามจึงควรมุ่งเป้าในการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้ด้วย เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพและป้องกันการเกิดซ้ำของมะเร็ง

การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าแบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีความแตกต่างจากเม็ดเลือดขาวของคนปกติหรือผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี โดยที่แบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับภาวะมะเร็ง มีการแสดงออกของยีนที่กดภูมิคุ้มกันและยีนที่สนับสนุนการเจริญ การแบ่งตัวและการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเมื่อเลือกยีน 3 ยีนที่มีการแสดงออกจำเพาะในภาวะมะเร็งและเกี่ยวข้องกับการสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้แก่ PLAU, SERPINB2 และ CTSL คำนวณเป็นค่า 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. Mazzieri, 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 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. Sripa, 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 (FcgammaRIII) 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 holangiocarcinoma" 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 Pairojkul, 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, Naraesuan University, Pitsanulok, Thailand.

6.4.3 “Cholangiocarcinoma: Ongoing research in Thailand”. Sopit Wongkham, Mt. Zion Cabcer Reserch 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, การประชุมสัมมนาวิชาการเนื่องในวาระมหามงคลเฉลิมพระชนม์พรรษา 80 พรรษา คณะเทคนิคการแพทย์ 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 Nareauan, Pisanulok, Thailand.

7.4.6 “Diagnostic and prognostic significance of peripheral blood cells in cholangiocarcinoma.” Sopit Wongkham, Chutima Subimerb, 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 19-20$^{th}$, 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 Choglangiocarcinoma: 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, Vajarabhongsa 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, 25$^{th}$ March 2008, Thailand Science Park Convention Center, Bangkok, Thailand.

ลงนาม.....

( นางโสพิศ วงศ์คำ )

หัวหน้าโครงการ

21 ตุลาคม 2553