



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความผิดปกติของ villin ในผู้ป่วยเด็กโรคตับ ชนิด cholestasis

โดย รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณุช จงศรีสวัสดิ์
และคณะ

มีนาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความผิดปกติของ villin ในผู้ป่วยเด็กโรคตับ ชนิด cholestasis

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 1. รศ.พญ. วรนุช จงศรีสวัสดิ์ | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. รศ.พญ. นฤมล วิเศษโสภาส | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. รศ.นพ. ไพศาล เวชพิพัฒน์ | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 4. ศ.นพ. ยง ภู่วรรณ | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ศึกษาขอขอบคุณนางสาววรรดี ลือชาชัยวงศ์ และนางสาวกนกกาญจน์ บารมีชัย นักศึกษาโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ชั้นเนื้อตับในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณปริษา เรืองเวชวรชัย นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ 8 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการเตรียมชิ้นเนื้อตับในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการเก็บเลือดและชิ้นเนื้อตับในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ หัวหน้าศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ และอาจารย์ประจำหน่วยโรคทางเดินอาหารและโรคตับ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ให้คำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ The Thailand Research Fund (TRF, สกว.) ที่อนุมัติทุนเพื่อสนับสนุนการศึกษานี้

รหัสโครงการ : TRG4780007
ชื่อโครงการ : ความผิดปกติของ villin ในผู้ป่วยเด็กโรคตับชนิด cholestasis
ชื่อนักวิจัย : รศ.พญ. วรณัฐ จงศรีสวัสดิ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.พญ. นฤมล วิเศษโอภาส คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.นพ. ไพศาล เวชพิพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.นพ. ยง ภู่วรรณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อีเมล : voranush.c@chula.ac.th, nush_c@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม 2547 – มีนาคม 2550

บทคัดย่อ

บทนำ: โรคตับชนิด cholestasis (cholestatic liver disease) อาจมีสาเหตุจากความผิดปกติของการสร้างน้ำดี (bile formation) โดยเซลล์ตับหรือความผิดปกติของ bile flow ผ่านท่อน้ำดีทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกตับ วิลลินเป็นโปรตีนที่ใช้ในการรวมและตัดสาย actin ซึ่งจำเป็นในการ maintain structural integrity ของ canalicular microvilli ในตับ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความผิดปกติของวิลลินในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของวิลลินในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันกับความรุนแรงของโรค

วิธีทดลอง: ทำการตรวจชิ้นเนื้อตับจากผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะตัวเหลืองชนิดที่มีน้ำดีคั่งซึ่งแบ่งเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 20 คน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ จำนวน 11 คน (neonatal hepatitis 5 คนและ choledochal cyst 6 คน) และกลุ่มควบคุมที่ได้จากผู้บริจาคตับหรือผู้เสียชีวิตที่มีตับปกติจำนวน 10 คน โดยย้อมด้วย monoclonal antibody ของวิลลินและวิเคราะห์ปริมาณ villin mRNA/GAPDH ในชิ้นเนื้อตับด้วยวิธี real time PCR รวมทั้งทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์วิลลินกับความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ favorable outcome (ค่า total bilirubin < 2 mg/dl หลังจากผ่าตัดโดยวิธี Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปี) และ unfavorable outcome (ค่า total bilirubin $\geq$ 2 mg/dl หลังจากผ่าตัดโดยวิธี Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปี หรือเสียชีวิต) ปริมาณ villin mRNA/GAPDH แสดงเป็น median และ interquartile range

ผลการทดลอง: ผลการย้อมวิลลินจากชิ้นเนื้อตับพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้ง 20 คน ผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ทั้ง 11 คนและกลุ่มควบคุม 6 คนจาก 10 คน มีผลการย้อมติดวิลลินเป็นบวก ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ต่ำกว่าในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$ และ $p = 0.03$ ตามลำดับ) แต่ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่แตกต่างจากในกลุ่มควบคุม เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตันกับค่า villin mRNA ต่อ GAPDH พบว่ากลุ่มที่มี unfavorable outcome (จำนวน 10 คน) และ favorable outcome (จำนวน 10 คน) ไม่มีความแตกต่างกัน

สรุป: การย้อมวิลลินในชิ้นเนื้อตับไม่ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคท่อน้ำดีตีบตันจากโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมี villin expression มากกว่าผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ของ villin expression กับ prognostic outcome ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

คำหลัก : วิลลิน, โรคตับชนิด cholestasis

Project Code : TRG4780007

Project Title : Abnormalities of villin in children with cholestatic liver disease

Investigator : Voranush Chongsrisawat^a, Naruemon Wisedopas^b,
Paisarn Vejapipat^c, Yong Poovorawan^a
^aDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn
University
^bDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn
University
^cDepartment of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn
University

E-mail Address: voranush.c@chula.ac.th, nush_c@hotmail.com

Project Period: July 2004 – March 2007

Abstract

Introduction: Cholestatic liver disease may be caused by abnormality of bile formation by hepatocytes or of bile flow through both intrahepatic and extrahepatic bile ducts. Villin is an actin binding, bundling, and severing protein needed for maintenance of structural integrity of canalicular microvilli.

Objectives: To compare the abnormalities of villin in children with cholestatic liver diseases and to correlate the expression of villin with prognostic outcome of biliary atresia.

Methods: Stored liver specimens of 20 children with biliary atresia, 11 children with other cholestatic liver diseases (5 neonatal hepatitis and 6 choledochal cyst), and 10 donors of liver transplantation or persons with normal liver who underwent autopsy as the control group were stained with monoclonal antibody of villin. Villin mRNA analyses were undertaken on liver homogenates with real time PCR technique and were correlated with the severity of biliary atresia patients. The severity was classified into favorable outcome (total bilirubin < 2 mg/dl at 1 year post Kasai's operation) and unfavorable outcome (total bilirubin $\geq$ 2 mg/dl at 1 year post Kasai's operation or death at enrollment). Amounts of villin PCR product (villin mRNA relative to concentrations of GAPDH product) were expressed as median and interquartile range.

Results: Villin staining of 20/20 biliary atresia patients, 11/11 patients with other cholestatic liver diseases, and 6/10 normal controls were positive. Villin mRNA to GAPDH ratio in patients with other cholestatic liver diseases were significantly lower than those in biliary atresia patients and normal controls ($p < 0.0001$ and $p = 0.03$, respectively). However, villin mRNA to GAPDH ratio in biliary atresia patients were not different from those in normal controls. In addition, there was no difference of villin mRNA expression in biliary atresia patients with unfavorable outcome ($n = 10$) and favorable outcome ($n = 10$).

Conclusion: Villin staining in liver tissue is not helpful in the differential diagnosis of biliary atresia from other cholestatic liver diseases. Patients with biliary atresia have higher villin expression than patients with other cholestatic liver diseases. Expression of villin does not correlate with prognostic outcome of biliary atresia.

Keywords: Villin, cholestatic liver disease

บทนำ

โรคตับชนิด cholestasis (cholestatic liver disease) อาจมีสาเหตุจากความผิดปกติของการสร้างน้ำดี (bile formation) โดยเซลล์ตับหรือความผิดปกติของ bile flow ผ่านท่อน้ำดีทั้งที่อยู่ในภายในและภายนอกตับ ความผิดปกติเหล่านี้อาจเกิดในทารกก่อนหรือหลังคลอดก็ได้ ภาวะ cholestatic jaundice ที่พบในวัยทารกยังมีการศึกษาน้อยมากในประเทศไทย ข้อมูลส่วนใหญ่ต้องอาศัยการอ้างอิงจากต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากคนไทย ภาวะ cholestatic jaundice ที่พบในวัยทารกอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น

- การติดเชื้อของเซลล์ตับจากแบคทีเรีย ไวรัสหรือโปรโตซัว
- โรคทางเมตาบอลิซึมเช่น galactosemia, tyrosinemia, α -1 antitrypsin deficiency
- ความผิดปกติของท่อน้ำดีเช่น ท่อน้ำดีตีบตัน (extrahepatic biliary atresia), ท่อน้ำดีโป่งพอง (choledochal cyst), ท่อน้ำดีในตับลดจำนวนลง (paucity of intralobular bile duct)
- Parenteral nutrition หรือยาบางชนิด
- Idiopathic neonatal hepatitis

กุมารแพทย์ในประเทศไทยมีประสบการณ์การดูแลรักษาผู้ป่วย neonatal cholestasis ที่ไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดเป็นจำนวนมาก ซึ่งผู้ป่วยในกลุ่มนี้บางรายมีการดำเนินโรคกลายเป็นตับแข็งและโรคตับระยะสุดท้าย เมื่อเกิดภาวะ cholestasis การ excrete สารต่างๆจากตับจะเสียไป ผู้ป่วยจะมีอาการตัวเหลือง, คัน, xanthoma, ระดับ cholesterol, alkaline phosphatase, total bilirubin และ bile acids ในเลือดสูงขึ้น

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นสาเหตุของ neonatal cholestasis ที่พบบ่อยที่สุดและยังเป็นข้อบ่งชี้ในการทำผ่าตัดปลูกถ่ายตับในเด็กที่พบบ่อยที่สุด⁽¹⁾ อุบัติการณ์ของโรคประมาณ 1:10,000 ของเด็กเกิดมีชีวิต ไม่ทราบอุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทย ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีผู้ป่วยโรคนี้ประมาณปีละ 10-15 ราย⁽²⁾ โรคนี้ทำให้มีการตีบตันของท่อน้ำดีภายนอกตับและทำให้เกิด biliary cirrhosis และเสียชีวิตภายในอายุ 2 ปีเป็นส่วนใหญ่ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม การรักษาใช้การผ่าตัด hepatoportoenterostomy (Kasai's operation) เพื่อระบายน้ำดีลงสู่ลำไส้เล็ก แต่ถึงแม้ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแล้ว ประมาณร้อยละ 80 ยังมีการดำเนินโรคไปสู่ end-stage liver failure ซึ่งต้องรักษาด้วยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ⁽³⁾

ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่แน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อ ความผิดปกติแต่กำเนิด สารพิษหรือความผิดปกติทาง immune⁽⁴⁾ มีการศึกษาพบว่ามีความผิดปกติของยีนที่ควบคุม cell signaling, transcription regulation, hepatic development, morphogenesis และ fibrogenesis ในโรคท่อน้ำดีตีบตัน^(5,6) cytokines และ growth factors ที่หลั่งในภาวะที่มี inflammation สามารถ induce ให้เกิด remodeling ของ bile duct epithelium มี

การศึกษาสนับสนุนว่าภาวะ bile duct obliteration และ subsequent loss of bile ducts ที่พบในโรคท่อน้ำดีตีบตันอาจเกิดจาก biliary epithelium remodeling ผิดปกติ⁽⁷⁾

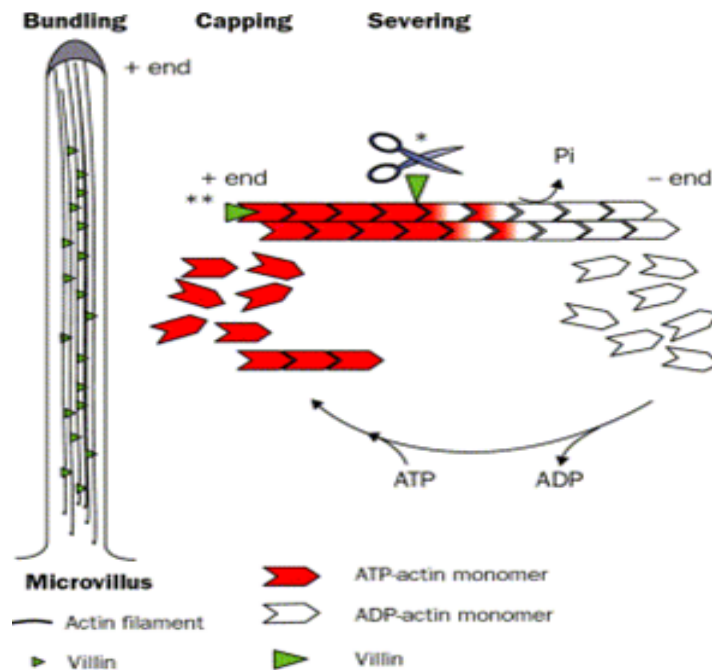
ยังเป็นที่ถกเถียงกันถึง onset ของโรคท่อน้ำดีตีบตันว่าเกิดขึ้นตั้งแต่เมื่อใด ผู้ป่วยบางคนซึ่งเป็นส่วนน้อยมีอาการตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด (ชนิด embryogenic หรือ fetal) และอาจพบร่วมกับ congenital anomalies อื่นๆ เช่น โรคหัวใจ, situs inversus, intestinal malrotation, asplenia หรือ polysplenia ทำให้เชื่อว่า onset เกิดระหว่าง embryogenesis โดยมีความผิดปกติของ epithelial deletion และ mesenchymal proliferation ที่จำเป็นสำหรับการ form ท่อน้ำดีปกติ^(8,9) แต่ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันส่วนใหญ่ (65-90%)⁽¹⁰⁾ มีอาการตัวเหลืองหลังอายุ 2 สัปดาห์ (ชนิด classic) ซึ่งเชื่อว่า onset เกิดภายหลังคลอด ยง ภูววรรณและคณะทำการศึกษาในเด็กที่เป็น dizygotic twin 1 คู่และ monozygotic twin 7 คู่พบว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเพียงคนเดียวทุกคู่⁽²⁾ ซึ่งช่วยสนับสนุนทฤษฎีของ onset ที่เกิดภายหลังคลอด

ความหลากหลายของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทำให้สันนิษฐานว่าโรคนี้น่าจะเป็น heterogeneous disorder และ common phenotype ของความผิดปกติของ inflammatory, fibrogenic และ morphogenetic factors ประกอบกัน⁽¹¹⁾

เซลล์ตับ (hepatocyte) มีลักษณะเป็น polarized epithelial cells ซึ่งล้อมรอบโดย membrane 3 ชนิดคือ⁽¹²⁻¹⁴⁾

- (1) Sinusoidal หรือ basolateral membrane เป็นผนังของ sinusoidal space
- (2) Apical หรือ canalicular membrane อยู่รอบๆ bile canaliculi ซึ่งมี microvilli เป็นแหล่งของโปรตีนที่มีความสำคัญต่อ bile secretion (membrane transporters) ได้แก่ bile-salt export-pump BSEP, phospholipid translocator MDR3 และ organic-anion-transporting protein MRP2 ดังนั้นถ้ามี disruption ของ microvilli จะทำให้เกิดภาวะ cholestasis
- (3) Lateral hepatic membrane อยู่ระหว่างเซลล์ตับ โดยมี tight junction complexes แบ่งแยก sinusoidal space ออกจาก bile canaliculi นอกจากนี้ยังมี nonparenchymal cells ในตับทำหน้าที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ hepatic response ต่อ injury และ inflammation เช่น
 - Macrophage-derived Kupffer cells อยู่ใน sinusoidal space ทำหน้าที่เป็น phagocytic cells และหลั่ง mediators ตอบสนองต่อภาวะ inflammation ของตับ
 - Stellate cell (lipocyte, fat storage cell, Ito cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต extracellular collagen และ fibrogenic response ต่อ liver injury การ activate stellate cells โดย cytokines ให้กลายเป็น myofibroblast-like state มีความสัมพันธ์กับ collagen gene expression, การลดลงของ intracellular vitamin A content, และ profound morphologic changes ในตับ การควบคุมการ activate stellate cell เป็นปัจจัยเริ่มแรกในการเกิด hepatic fibrosis และตับแข็ง (cirrhosis)

Villin, fimbrin และ actin เป็นส่วนประกอบของ microvilli ที่ canalicular membrane ของ เซลล์ตับ, brush border ของ enterocytes, renal proximal tubule และตับอ่อน^(15,16) villin (วิลลิน) เป็น calcium-dependent actin-binding protein ขนาด 95 kDa ในภาวะที่มีแคลเซียมต่ำ วิลลินทำหน้าที่ในการ bundling ของ actin filament ส่วนในภาวะที่มีแคลเซียมสูง วิลลินจะทำหน้าที่กระตุ้นการ severing ของ actin filament หน้าที่ของวิลลินดังแสดงในรูปที่ 1⁽¹⁷⁾ โปรตีนวิลลินช่วยในการ maintain structural integrity ของ canalicular microvilli ในตับ การศึกษาของ Athman และคณะพบว่าวิลลินเป็นส่วนประกอบของ hepatic-growth-factor-dependent cytoskeleton-remodelling pathway ซึ่งเป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญในขั้น morphogenesis ของอวัยวะต่างๆรวมทั้งตับและท่อน้ำดี⁽¹⁸⁾ ยีนวิลลินของมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 2q35-36⁽¹⁹⁾ ประกอบด้วย DNA ขนาด 25 kb และมี 19 exons



รูปที่ 1. หน้าที่ของวิลลิน⁽¹⁷⁾

Phillips และคณะได้รายงานผู้ป่วยที่เป็น neonatal cholestatic disease และมีท่อน้ำดีนอกตับตีบตันในภายหลังจำนวน 3 คนพบว่าผู้ป่วยไม่มีโปรตีนวิลลินและ mRNA⁽²⁰⁾ ผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่ได้เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด classic (ไม่เกิดอาการตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด) เนื่องจากผล liver biopsy พบลักษณะ giant cell transformation, mild cholestasis, portal inflammation, mild fibrosis และท่อน้ำดีลดจำนวนลง ส่วนในโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด classic ผล liver biopsy จะพบเป็น

portal fibrosis, bile duct proliferation, cholangitis และ cholestasis จากการศึกษาที่สรุปว่าความผิดปกติของ villin gene expression ทำให้เกิด severe malformation ของ canalicular microvillus structure, รบกวนการทำงานของ transport proteins ที่จำเป็นสำหรับ bile formation ที่ canalicular membranes เป็นกลไกสำคัญทำให้เกิด cholestasis สิ่งที่น่าสนใจคือยังไม่ทราบว่าเป็น villin gene defect ที่พบในผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นโรคทางพันธุกรรมหรือเกิดจากการติดเชื้อระหว่าง embryogenesis เนื่องจากมีรายงานพบว่าการติดเชื้ออาจทำให้มี disruption ของ villin expression⁽²¹⁾

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นช่วยสนับสนุนว่า structure และ function ของ microvilli น่าจะมีความสำคัญต่อ bile canalicular biology เนื่องจากโรคท่อน้ำดีตีบตันมี onset ของโรคและผลการรักษาด้วยการผ่าตัด Kasai's operation ที่แตกต่างกัน ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจว่าปัจจัยอะไรบางอย่างที่ทำให้โรคมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคน มีความเป็นไปได้ที่ยีนที่มีผลต่อ bile secretion เช่นยีนวิลลินผิดปกติทำให้เกิดตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด ทำให้มี prolonged cholestasis และนำไปสู่ biliary cirrhosis ในที่สุดผู้วิจัยตั้งสมมติฐานไว้ว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันอาจมี villin gene expression แตกต่างไปจากผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่น นอกจากนี้ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มี villin gene expression ผิดปกติอาจมีความรุนแรงของโรคมมากกว่ารายที่มียีนปกติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาคือ ทำให้เข้าใจโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ได้ดีขึ้น ถ้าสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มี villin gene expression ผิดปกติจะมีความรุนแรงของโรคมมากกว่ารายที่มียีนปกติเป็นจริง อาจนำความรู้นี้มาใช้ในการพยากรณ์โรคและใช้ในการคัดกรองทารกในครรภ์ ช่วยลดอุบัติการณ์ของ biliary cirrhosis ที่ต้องรักษาด้วยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความผิดปกติของวิลลินในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่ง (cholestasis) จากสาเหตุอื่นๆ

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ villin mRNA expression ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันกับความรุนแรงของโรค

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ประชากรที่ศึกษา

กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดย operative cholangiography และแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

- กลุ่ม favorable outcome คือ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่หลังจากการทำผ่าตัด Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปีแล้วไม่มีภาวะตัวเหลืองหรือ total bilirubin < 2 mg/dl

- กลุ่ม unfavorable outcome คือ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่หลังจากการทำผ่าตัด Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปีแล้วยังมีภาวะตัวเหลืองหรือ total bilirubin $\geq$ 2 mg/dl หรือเสียชีวิต

กลุ่มที่ 2 ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมซึ่งได้จากผู้บริจาคตับหรือผู้เสียชีวิตที่มีชิ้นเนื้อตับ (liver tissue) ปกติ ผู้วิจัยได้เปลี่ยนแปลงการเก็บชิ้นเนื้อของกลุ่มนี้จากเดิมที่ได้เสนอว่าจะเก็บจากผู้บริจาคตับเท่านั้น เนื่องจากคือไม่สามารถเก็บชิ้นเนื้อตับจากผู้บริจาคตับเมื่อมีการปลูกถ่ายตับได้เพียงพอ การแก้ไขคือได้ดำเนินการติดต่อภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อขออนุญาตใช้ชิ้นเนื้อตับจากการตรวจศพที่ไม่มีโรคตับหรือโรคอื่นๆ ที่มีตับผิดปกติ เพื่อใช้เป็นชิ้นเนื้อตับสำหรับสกัด RNA ของกลุ่มควบคุม

2. วัตถุและวิธีการ

2.1 การเก็บชิ้นเนื้อตับ

ทำการเก็บจากผู้ป่วยที่มีภาวะตัวเหลืองทั้งจากโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ โดยศัลยแพทย์จะเก็บชิ้นเนื้อตับในขณะที่ทำ operative cholangiography ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะต้องทำการก่อนการทำ Kasai's operation หรือจากการทำ percutaneous liver biopsy โดยผู้วิจัยหลัก

2.2 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry

- Slide preparation

ทำการอบชิ้นเนื้อตับ (formalin-fixed, paraffin-embedded section) บน slide ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการ deparaffinize slides ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้น rehydrate slides ด้วย 95% ethyl alcohol และน้ำกลั่นตามลำดับ

- Epitope retrieval

แช่ slides ที่มี specimen ลงใน citrate buffer pH 6 (citric acid 2.1 g+น้ำ 1 L+2M NaOH 13 cc) ใน pressure cooker ตั้งไฟรอจนเดือดจนได้ pressure ที่ต้องการทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วทำให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว

- Block endogenous peroxidase activity

วางรอบ section ด้วย DAKO PEN หยด 3% H₂O₂ in distilled water 200 μ L แล้ว incubate 5 นาที ล้างด้วย PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.4 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

- Block nonspecific background

หยด 3% normal horse serum 200 μ L ทำการ incubate 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- Antibody application

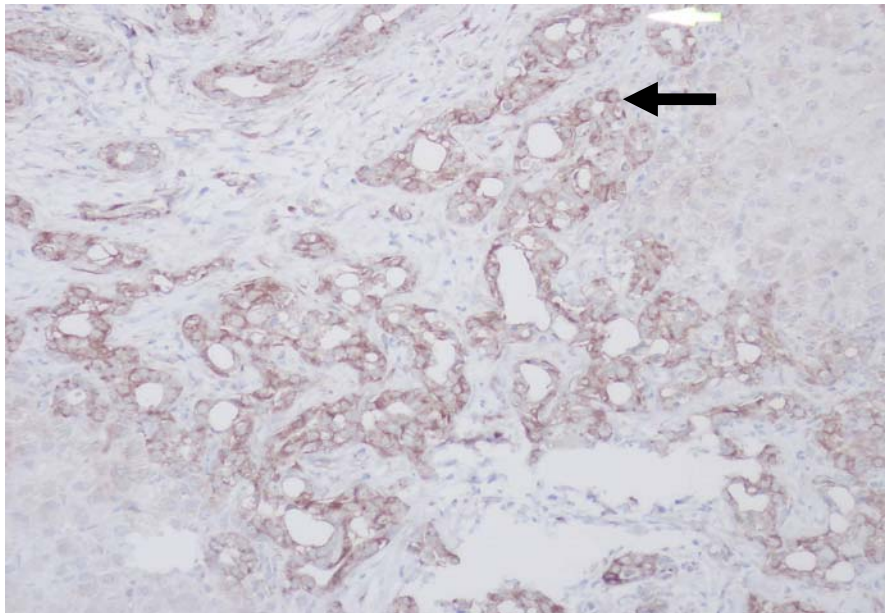
drain excess 3% normal horse serum หยด villin (Cell Marque, Hot Springs, AR) dilution 1:100 incubate 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS, pH 7.4 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที หยด detection kit DAKO (Envision system), HRP (DAB) 1392 200 μ L incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS, pH 7.4 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

- Colour development

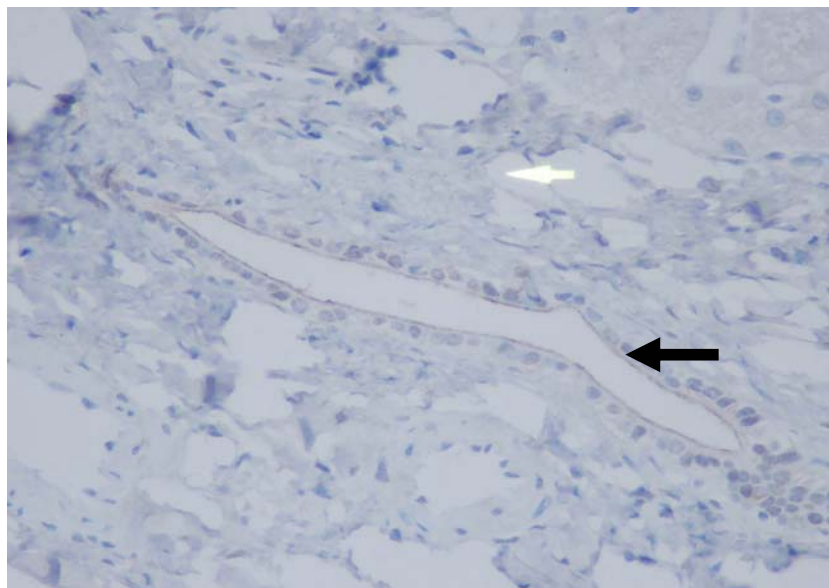
หยด DAB (3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride) 200 μ L incubate 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง, monitor under microscope ล้างด้วยน้ำกลั่น counterstain ด้วย Hematoxylin mount slide

- การอ่านผลย้อมวิลลิน

การอ่านผลย้อม monoclonal antibody ของวิลลินทำโดยรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงนฤมล วิเศษโอภาส อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นผู้ร่วมวิจัย ผู้อ่านสไลด์จะไม่ทราบการวินิจฉัยโรคทางคลินิก ลักษณะผลการย้อมที่เป็นบวกคือย้อม villin ติดเป็นสีน้ำตาลบริเวณ bile canaliculi หรือ apical membrane ของ bile ductular cell ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3



รูปที่ 2. ลักษณะผลการย้อมติดวิลลินในชั้นเนื้อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งย้อมติดวิลลินเป็นสีน้ำตาลที่ส่วน apical และ รอบ cell membrane ของ bile ductular cell (ลูกศรสีดำ)



รูปที่ 3. ลักษณะการย้อมติดวิลลินในชั้นเนื้อตับของกลุ่มควบคุม (ผู้บริจาคตับ) ซึ่งย้อมติดวิลลินเป็นสีน้ำตาลที่บริเวณส่วน apical membrane ของ bile ductular cell (ลูกศรสีดํา)

2.3 การตรวจ villin mRNA ในชั้นเนื้อตับด้วย primers จากส่วน exon ของ human villin gene

- RNA extraction, first-strand cDNA synthesis และ amplification⁽²⁰⁾

ทำการสกัด RNA จากชั้นเนื้อตับที่เก็บ freeze ไว้ในไนโตรเจนเหลว ด้วย QIAGEN kit first-strand cDNA ถูกสังเคราะห์ด้วย total cellular RNA 1 µg, random primers 6 µg, superscript II RNase H⁻ reverse transcriptase preamplification system และ RNasin ribonuclease inhibitor (Promega) ใน total reaction volume 50 µL จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนโดยการโคลน ซึ่งใช้ PGEM-T easy vector ตรวจสอบการโคลนโดยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (direct sequencing method) เมื่อตรวจสอบแน่ชัดแล้วจึงนำมาทำ serial dilution เพื่อใช้เป็น standard ในการหาปริมาณของ villin gene ใน sample ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ด้วย real time PCR ด้วย villin specific primers และ GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) โดยใช้ villin primer ดังนี้

Exon 2 forward primer – 5'TGTTCCCTTCCAGCACCTTTG 3'

Exon 5 reverse primer – 5' CCTGAGTCTCTCCATACGGG 3'

- PCR amplification ของ villin

โดยใช้ real time PCR ใน reaction volume 25 μL ซึ่งประกอบด้วย 1x Eppendorf MasterMix 10 μL (Magnesium 1.5 mM, dNTPs 200 μM , Taq DNA polymerase 1.25 U), forward primer 0.5 μM และ reverse primer 0.5 μM โดย reaction เริ่มที่ 95°C นาน 15 วินาที จากนั้นทำขั้นตอน denaturation ถึง extension นาน 40 cycles, denaturation ที่ 95°C นาน 15 วินาที, annealing ที่ 58°C นาน 15 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 20 วินาที ซึ่งการทำ real time PCR ของ sample นี้จะทำการควบคู่ไปกับ serial dilution ของ standard ที่ได้มีการโคลนไว้

- PCR amplification ของ GAPDH

การทำ amplification ของ GAPDH (house keeping gene) โดยต้องมีการทำเป็น standard ไว้โดยการโคลนและทำเป็น serial dilution เช่นเดียวกับที่ใช้กับ villin gene เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของ RNA ที่สกัดได้ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็น cDNA แล้ว โดยใช้ GAPDH primers ในส่วน exon ดังนี้

Exon 2 forward primer -F85 -5' GTGAAGGTCGGAGTCAACGG 3'

Exon 3 reverse primer -R191- 5' TCAATGAAGGGGTCATTGATGG 3'

PCR amplification ใช้เหมือนในขั้นตอนการทำด้วย villin primer โดย reaction เริ่มที่ 95°C นาน 15 วินาที จากนั้นทำขั้นตอน denaturation ถึง extension นาน 40 cycles, denaturation ที่ 94°C นาน 15 วินาที, annealing และ extension ที่ 60°C นาน 30 วินาที และจะทำการควบคู่กับ serial dilution ของ standard ที่ได้มีการโคลนไว้

ทำการวิเคราะห์ผลของ real time PCR ที่เกิดขึ้นเพื่อดูการแสดงออกของ villin gene โดยดูอัตราส่วนระหว่างปริมาณของ villin gene และ GAPDH

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลแสดงเป็น median และ interquartile range ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดี ตีบตัน โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ และกลุ่มควบคุม ใช้ Mann-Whitney test และ Kruskal-Wallis test การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม SPSS 13 โดยค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

- การศึกษาวิลลินด้วยวิธี immunohistochemistry

นำชิ้นเนื้อตับ (paraffin embedded) มาทำการตรวจย้อมด้วย monoclonal antibody ของ วิลลินซึ่งแบ่งเป็น โรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 20 คน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ จำนวน 11 คน (neonatal hepatitis 5 คน, choledochal cyst 6 คน) และกลุ่มควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคตับ หรือผู้เสียชีวิตที่มีตับปกติจำนวน 10 คน พบว่าชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน 20/20 คน (ร้อยละ 100), ผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ 11/11 คน (ร้อยละ 100) และกลุ่ม ควบคุม 6/10 คน (ร้อยละ 60) มีผลการย้อมวิลลินเป็นบวก

- การศึกษา villin expression ด้วย real time PCR

การเปรียบเทียบ villin mRNA/GAPDH expression ในผู้ป่วยทั้งสามกลุ่มแสดงในรูปที่ 4 และตารางที่ 1 ผู้ที่ตรวจไม่พบ villin mRNA มีจำนวน 5 คนแบ่งเป็น neonatal hepatitis 1 คน, choledochal cyst 2 คนและกลุ่มควบคุม 2 คน

ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่าในผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มี น้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญคือเท่ากับ 13.06 (2.13-93.66) และ 0.002 (0-0.006) ตามลำดับ, $p < 0.0001$

ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือเท่ากับ 13.06 (2.13-93.66) และ 0.75 (0.004-91.07) ตามลำดับ, $p = 0.2$

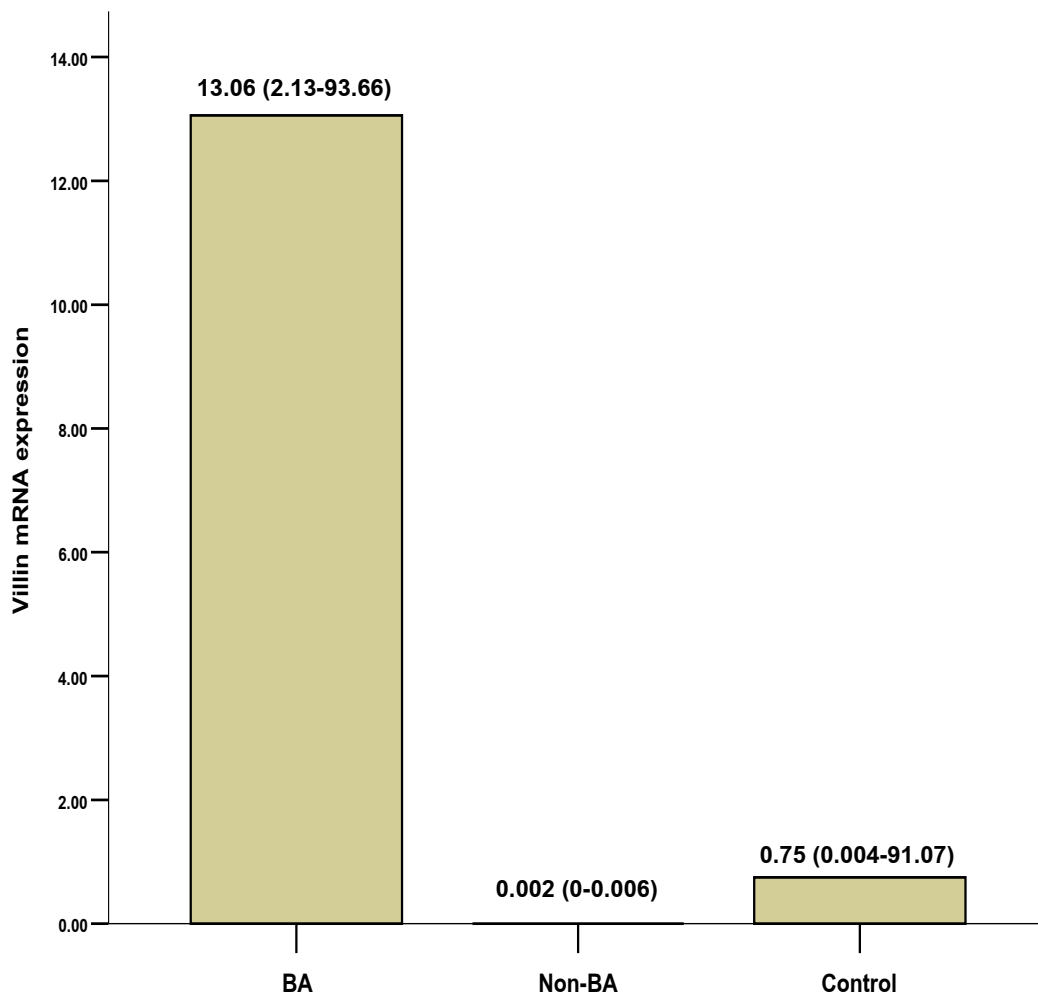
ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ต่ำกว่าใน กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญคือเท่ากับ 0.002 (0-0.006) และ 0.75 (0.004-91.07) ตามลำดับ, $p = 0.03$

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตันกับค่า villin mRNA ต่อ GAPDH พบว่ากลุ่มที่มี unfavorable outcome (จำนวน 10 คน) และ favorable outcome (จำนวน 10 คน) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือเท่ากับ 9.68 (0.19-326.24) และ 18.89 (6.14-63.50) ตามลำดับ, $p = 0.6$

ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยกลุ่มที่มี unfavorable outcome และกลุ่มควบคุมไม่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือเท่ากับ 9.68 (0.19-326.24) และ 0.75 (0.004- 91.07) ตามลำดับ, $p = 0.41$

ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยกลุ่มที่มี favorable outcome และกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือเท่ากับ 18.89 (6.14-63.50) และ 0.75 (0.004-91.07) ตามลำดับ, $p = 0.17$

ค่า villin mRNA ต่อ GAPDH ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีผลการย้อมวิลลินเป็นบวกและลบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือเท่ากับ 2.85 (0.003-35.09) และ 0.37 (0.004-0.76) ตามลำดับ, $p=0.25$



รูปที่ 4. การเปรียบเทียบ villin mRNA/GAPDH expression ในผู้ป่วยทั้งสามกลุ่ม (ข้อมูลแสดงเป็น median และ interquartile range; BA=โรคท่อน้ำดีตีบตัน; non-BA=โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ; control=กลุ่มควบคุม)

ตารางที่ 1. แสดงผลการตรวจ villin mRNA และผลการย้อมวิลลิน

Subject	Diagnosis	Villin	GAPDH	Villin/GAPDH	Villin staining
1	BA	70900.00	652.00	108.74	Positive
2	BA	432000.00	1610.00	268.32	Positive
3	BA	22400.00	1020.00	21.96	Positive
4	BA	171000.00	10800.00	15.83	Positive
5	BA	18600.00	6530.00	2.85	Positive
6	BA	35300.00	729.00	48.42	Positive
7	BA	251000.00	1780.00	141.01	Positive
8	BA	6280.00	175.80	35.72	Positive
9	BA	9670.00	940.30	10.28	Positive
10	BA	18900.00	2612.00	7.24	Positive
11	BA	14100.00	1486.00	9.49	Positive
12	BA	39500.00	1146.00	34.47	Positive
13	BA	6390.00	703.40	9.08	Positive
14	BA	789000.00	1578.00	500.00	Positive
15	BA	37700000.00	4760.00	7920.17	Positive
16	BA	1560.00	6253.00	0.25	Positive
17	BA	1.38	7095.00	0.00	Positive
18	BA	20300.00	31550.00	0.64	Positive
19	BA	366.00	15120.00	0.02	Positive
20	BA	60000.00	31770.00	1.89	Positive
21	Neonatal hepatitis	4.04	1646.00	0.00	Positive
22	Neonatal hepatitis	180.00	942.00	0.19	Positive
23	Choledochal cyst	5.63	3489.00	0.00	Positive
24	Neonatal hepatitis	4.50	43800.00	0.00	Positive
25	Choledochal cyst	229.00	38400.00	0.01	Positive
26	Choledochal cyst	25.50	723.00	0.04	Positive
27	Neonatal hepatitis	233.00	39500.00	0.01	Positive

ตารางที่ 1. แสดงผลการตรวจ villin mRNA และผลการย้อมวิลลิน (ต่อ)

Subject	Diagnosis	Villin	GAPDH	Villin/GAPDH	Villin staining
28	Neonatal hepatitis	0.00	8740.00	0.00	Positive
29	Choledochal cyst	0.00	21800.00	0.00	Positive
30	Choledochal cyst	0.00	13100.00	0.00	Positive
31	Choledochal cyst	8.69	24400.00	0.00	Positive
32	CONTROL	634000.00	2380.00	266.39	Positive
33	CONTROL	7880.00	11000.00	0.72	Negative
34	CONTROL	3600.00	4626.00	0.78	Negative
35	CONTROL	19300.00	591.40	32.63	Positive
36	CONTROL	110000.00	4942.00	22.26	Positive
37	CONTROL	79.20	4961.00	0.02	Negative
38	CONTROL	0.00	3120.00	0.00	Negative
39	CONTROL	36.60	7800.00	0.00	Positive
40	CONTROL	0.00	7590.00	0.00	Positive
41	CONTROL	61100000000.00	30700.00	1990228.01	Positive

วิจารณ์ผลการทดลอง

การวินิจฉัยหาสาเหตุในผู้ป่วยเด็กทารกโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่ง (cholestatic liver disease) มีความสำคัญมาก เนื่องจากต้องการความเร่งด่วนในการรักษาต่างกัน กล่าวคือผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำเป็นต้องรับการผ่าตัด Kasai's operation เพื่อระบายน้ำดีที่คั่งค้างในตับให้ไหลลงสู่ลำไส้เล็กภายในอายุ 60 วัน ซึ่งจะช่วยป้องกันการทำลายตับอย่างถาวรจนกลายเป็นตับแข็ง ส่วนผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ไม่จำเป็นต้องรับการผ่าตัดอย่างรวดเร็วและส่วนใหญ่เป็นการรักษาด้วยยา จากผลการศึกษาเมื่อไม่นานนี้เมื่อนำชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ มาทำการย้อม monoclonal antibody ของวิลลินพบว่าทั้งผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ จะมีผลการย้อมเป็นบวกทุกราย ดังนั้น การย้อมวิลลินในชิ้นเนื้อตับไม่สามารถใช้เป็น diagnostic test ในการวินิจฉัยแยกโรคระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ อย่างไรก็ตามในกลุ่มควบคุมที่มีชิ้นเนื้อตับปกติจำนวนหนึ่งกลับมีผลการย้อมวิลลินเป็นลบ สันนิษฐานว่าอาจเป็นจากขั้นตอนในการเก็บถนอมชิ้นเนื้อตับไม่เหมาะสมจึงทำให้วิลลินถูกทำลายไป

การศึกษาของ Phillips และคณะ⁽²⁰⁾ ซึ่งศึกษาความผิดปกติของ villin gene ในผู้ป่วยเด็ก progressive cholestatic liver disease จำนวน 2 รายที่มีอาการแสดงเหมือนโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยตรวจชิ้นเนื้อตับด้วยการย้อม immunohistochemistry ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน, ผู้ป่วยโรค progressive cholestasis and liver failure, ผู้ป่วยโรคตับจากสาเหตุอื่นๆ (primary sclerosing cholangitis, Alagille's syndrome, total parenteral nutrition induced cholestasis) และกลุ่มควบคุม (normal liver tissue) พบว่ากลุ่มควบคุม, ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน และผู้ป่วยโรคตับจากสาเหตุอื่นๆ มีผลการย้อมติดวิลลินที่บริเวณ bile canaliculi เป็นลักษณะ chicken-wire network of fine channels แต่ในผู้ป่วยโรค progressive cholestasis and liver failure จะย้อมวิลลินไม่ติด จึงสันนิษฐานว่าอาจเป็นกลุ่มโรคใหม่ซึ่งไม่มีวิลลินที่ canalicular microvilli ทำให้เกิดความผิดปกติของ bile secretion จึงเกิด cholestasis และตับแข็งในวัยทารกเหมือนโรคท่อน้ำดีตีบตัน ยังเป็นที่ถกเถียงกันว่าผู้ป่วยที่ villin expression ลดลงหรือไม่มีเลยเป็นจาก primary genetic defect ในการสังเคราะห์วิลลินหรือเป็น acquired defect ที่เกิดจาก environmental factor (เช่นการติดเชื้อไวรัส) หรือเป็น consequence ของ cholestasis เอง⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาไม่พบผู้ป่วยที่ย้อมวิลลินไม่ติดเลย อาจเป็นเพราะทำการศึกษาในประชากรจำนวนน้อย รวมทั้งการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง villin expression กับ outcome ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน กล่าวคือผู้ป่วยที่ยังคงมี cholestatic jaundice ไม่ได้มี villin expression ลดลง จึงไม่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าภาวะ cholestasis อาจทำให้มี villin expression ลดลง

เนื่องจากโปรตีนที่สำคัญหลักๆ ใน microvilli ประกอบด้วย actin และ actin-binding proteins อีก 3 ชนิดคือ villin, fimbrin และสารประกอบ calmodulin-brush border myosin I ถึงแม้

วิลลินจะมีบทบาทสำคัญต่อ morphogenesis และการ growth ของ microvilli แต่ใน villin^{-/-} knockout mice ยังพบว่า ultrastructure ของวิลลินในลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ไตและ bile canaliculi เป็นปกติ^(16,22) แสดงว่าถึงแม้จะไม่มีวิลลิน การ bundling ของ actin filament น่าจะมีโปรตีนอื่นที่อยู่ใน gelsolin family เช่น fimbrin ทำหน้าที่แทนวิลลินได้ สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วย neonatal hepatitis รายที่ตรวจไม่พบ villin mRNA หายจากอาการตัวเหลืองและมีผลการทำงานตับเป็นปกติเมื่ออายุ 6 เดือน ส่วนผู้ป่วย choledochal cyst 2 รายที่ตรวจไม่พบ villin mRNA มีผลการทำงานตับเป็นปกติหลังผ่าตัด นอกจากนี้ยังมีกลุ่มควบคุม 2 รายที่ตรวจไม่พบ villin mRNA ด้วย

จากการศึกษาพบว่า villin mRNA expression ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่าในผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำคั่งจากสาเหตุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ วิลลินเป็นส่วนประกอบของ hepatocyte-growth-factor-dependent cytoskeleton-remodeling pathway ซึ่งเป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญในขั้น morphogenesis ของอวัยวะต่างๆรวมทั้งตับและท่อน้ำดี⁽¹⁷⁾ วิลลินเป็นส่วนประกอบสำคัญของ microvilli ใน bile canaliculi จากผลพยาธิวิทยาของโรคท่อน้ำดีตีบตันนั้นพบว่าบริเวณ portal tract มีลักษณะเด่น คือ fibrosis, edema, inflammatory cell infiltration และ ductular proliferation ดังนั้นเมื่อเกิด ductular proliferation ปริมาณของ microvilli ย่อมมากขึ้น จึงพบ villin mRNA expression ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงขึ้น ส่วนผลพยาธิวิทยาของโรคตับชนิดที่มีน้ำคั่งจากสาเหตุอื่นๆ มักพบ giant cell และ inflammatory cell infiltration โดยไม่มี ductular proliferation จึงพบ villin mRNA expression ต่ำกว่าโรคท่อน้ำดีตีบตัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Chung และคณะ⁽²³⁾ ที่พบว่าผู้ป่วย cholestatic liver diseases ทั้งจากโรคตับและโรคท่อน้ำดีอุดตันจากนิ้ว จะมี microvilli ลดลงหรือลักษณะผิดปกติ (distortion) จากการตรวจชิ้นเนื้อตับด้วย electron microscopy การอุดตันของท่อน้ำดีในโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะแตกต่างจากการอุดตันของท่อน้ำดีในโรคอื่นเช่นนิ้วในท่อน้ำดี มีการศึกษาในหนูที่ถูก ligate ท่อน้ำดีเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมงจะพบ dilatation ของ bile canaliculi และมี partial loss ของ microvilli⁽²⁴⁾ แต่การศึกษานี้กลับพบว่ามีการ express villin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ microvilli เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

สรุป

การย้อมวิลลินในชิ้นเนื้อตับไม่ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคท่อน้ำดีตีบตันจากโรคตับชนิดที่มีน้ำคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมี villin expression มากกว่าผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำคั่งจากสาเหตุอื่นๆ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ของ villin expression กับ prognostic outcome ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

เอกสารอ้างอิง

1. Ryckman FC, Alonso MH, Bucuvalas JC, Balistreri W. Biliary atresia – surgical management and treatment options as they relate to outcome. *Liver Transplant Surg* 1998;4(suppl):S24-S33.
2. Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Tanunyitawongse C, Norapaksunthorn T, Mutirangura A, Chandrakamol B. Extrahepatic biliary atresia in twins: zygosity determination by short tandem repeat loci. *J Med Ass Thai* 1996;79: S119-S124.
3. Laurent J, Gauthier F, Bernard O, et al. Long-term outcome after surgery for biliary atresia: study of 40 patients surviving for more than 10 years. *Gastroenterology* 1990;99:1793-7.
4. Perlmutter DH, Shepherd RW. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype? *Hepatology* 2002;35:1297-304.
5. Chen L, Goryachev A, Sun J, et al. Altered expression of genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia. *Hepatology* 2003;38:567-76.
6. Choe BH, Kim KM, Kwon S, et al. The pattern of differentially expressed genes in biliary atresia. *J Korean Med Sci* 2003;18:392-6.
7. Desmet VJ. Congenital disease of intrahepatic bile ducts: variations on the theme “ductal plate malformation.” *Hepatology* 1992;16:1069-83.
8. Vijayan V, Tan CE. Development of human intrahepatic biliary system. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:105-8.
9. Funaki N, Sasano H, Shizawa S, et al. Apoptosis and cell proliferation in biliary atresia. *J Pathol* 1998;186:429-33.
10. Bates MD, Bucuvalas JC, Alonso MH, Ryckman FC. Biliary atresia: pathogenesis and treatment. *Semin Liver Dis* 1998;18:281-93.
11. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. *Hepatology* 1996;23:1682-92.
12. Petzinger E. Transport of organic anions in the liver: An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994;123:47-211.
13. LeBlanc GA. Hepatic vectorial transport of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 1994;90:101-20.

14. Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991;14:551-66.
15. Friederich E, Vancompernelle K, Louvard D, Vanderkerckhove J. Villin function in the organization of the actin cytoskeleton: correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. *J Biol Chem* 1999;274:26751-60.
16. Ferrary E, Cohen-Tannoudji M, Pehau-Arnaudet G, et al. In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J Cell Biol* 1999;146:819-30.
17. Jansen PL, Sturm E. Pediatric cholestasis: Is villin the villain? *Lancet* 2003;362:1090-1.
18. Athman R, Louvard D, Robine S. Villin enhances HGF-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. *Mol Biol Cell* Aug 22, 2003. DOI: 10.1091/mbc.E03-02-0091.
19. Pringault E, Robine S, Louvard D. Structure of the human villin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10811-5.
20. Phillips MJ, Azuma T, Meredith SM, et al. Abnormalities in villin gene expression and canalicular microvillus structure in progressive cholestatic liver disease of childhood. *Lancet* 2003;362:1112-9.
21. Lauwaet T, Oliveira MJ, Callewaert B, et al. Proteolysis of enteric cell villin by *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases. *J Biol Chem* 2003;278:22650-56.
22. Pinson KI, Dunbar L, Samuelson L, Gumucio DL. Targeted disruption of the mouse villin gene does not impair the morphogenesis of microvilli. *Dev Dyn* 1998;211:109-21.
23. Chung KW, Han NI, Choi SW, Ahn BM, Yoon SK, Nam SW, Lee YS, Han JY, Sun HS. Increased microfilaments in hepatocytes and biliary ductular cells in cholestatic liver diseases. *J Korean Med Sci* 2002;17:795-800.
24. Takakuwa Y, Kokai Y, Sasaki K, Chiba H, Tobioka H, Mor M, Sawada N. Bile canalicular barrier function and expression of tight-junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation. *Cell Tissue Res* 2002;307:181-9.

ภาคผนวก

เนื่องจากไม่มีชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการตรวจวิลลินใน serum ได้ สามารถตรวจวิลลินได้เฉพาะใน tissues โดยวิธี blotting หรือ immunohistochemistry เท่านั้น เนื่องจาก serum villin อาจต่ำมากหรือโมเลกุลของวิลลินใน serum อาจต่างจากใน tissues เนื่องจากเมื่อโปรตีนถูกหลั่งเข้ามาในกระแสเลือด อาจมีการเปลี่ยนแปลงโดยขบวนการ proteolytic cleavage หรือ glycosylation การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจทำให้ monoclonal antibody ไม่สามารถ recognize แอนติเจนได้ ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนแผนงานในการตรวจ serum villin เป็น serum vascular endothelial growth factor (VEGF) แทน

หลักการและเหตุผลของการตรวจ serum VEGF

เซลล์ตับ (hepatocyte) มีลักษณะเป็น polarized epithelial cells ซึ่งล้อมรอบโดย membrane 3 ชนิดคือ

(1) Sinusoidal หรือ basolateral membrane เป็นผนังของ sinusoidal space ซึ่งเป็น capillaries บุด้วย endothelium ที่มี open fenestrae, ไม่มี diaphragm และไม่มีชั้น basal lamina

(2) Apical หรือ canalicular membrane อยู่รอบๆ bile canaliculi ซึ่งมี microvilli เป็นแหล่งของโปรตีนที่มีความสำคัญต่อ bile secretion (membrane transporters) ได้แก่ bile-salt export-pump BSEP, phospholipid translocator MDR3 และ organic-anion-transporting protein MRP2 ดังนั้นถ้ามี disruption ของ microvilli จะทำให้เกิดภาวะ cholestasis

(3) Lateral hepatic membrane อยู่ระหว่างเซลล์ตับ โดยมี tight junction complexes แบ่งแยก sinusoidal space ออกจาก bile canaliculi นอกจากนี้ยังมี nonparenchymal cells ในตับ ทำหน้าที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ hepatic response ต่อ injury และ inflammation เช่น

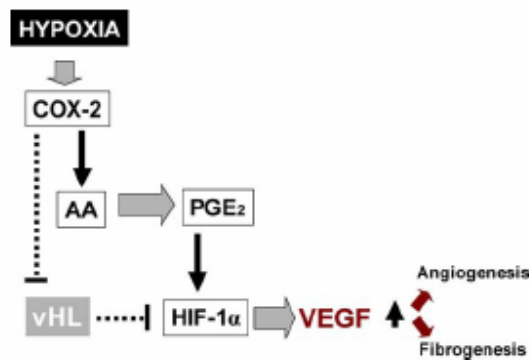
- Macrophage-derived Kupffer cells อยู่ใน sinusoidal space ทำหน้าที่เป็น phagocytic cells และหลั่ง mediators ตอบสนองต่อภาวะ inflammation ของตับ

- Stellate cell (lipocyte, fat storage cell, Ito cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต extracellular collagen และ fibrogenic response ต่อ liver injury การ activate stellate cells โดย cytokines ให้กลายเป็น myofibroblast-like state มีความสัมพันธ์กับ collagen gene expression, การลดลงของ intracellular vitamin A content, และ profound morphologic changes ในตับ การควบคุมการ activate hepatic stellate cells (HSCs) เป็นปัจจัยเริ่มแรกในการเกิด hepatic fibrosis และตับแข็ง (cirrhosis) HSCs ที่ถูกกระตุ้นนี้สามารถผลิตโปรตีน cyclooxygenase-2 (COX-2) และชักนำให้ผลิต vascular endothelial growth factor (VEGF)

ในช่วงแรกพบว่า VEGF เป็น vascular permeability factor ที่หลั่งโดยเซลล์มะเร็ง ในช่วงหลังพบว่ามีคุณสมบัติเป็น endothelial growth factor ด้วย โปรตีน VEGF ที่สร้างโดย activated

HSCs มีบทบาทสำคัญในขบวนการ angiogenesis และ fibrogenesis ในตับที่มี injury^(1,2) มีการศึกษาพบว่า VEGF สามารถชักนำให้เกิดการสูญเสีย bile canaliculi ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง⁽³⁾ มีรายงานพบว่าโปรตีน VEGF ที่ผลิตจาก HSCs มีบทบาททำให้มี proliferation ของ sinusoidal endothelial cells^(4,5) ภาวะ hepatocellular hypoxia และ angiogenesis มีความสัมพันธ์กับการเกิด fibrogenesis ใน experimental cirrhosis^(6,7)

ในสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิด hypoxic atmosphere เลียนแบบ microenvironment ของตับที่มี injury พบว่า HSCs จะถูกกระตุ้นให้ผลิตโปรตีน VEGF ซึ่งมีบทบาทในขบวนการ hepatic angiogenesis และ fibrogenesis^(1,2,7,8) โดยภาวะ hypoxia ทำให้ up-regulated ระดับ COX-2 และ hypoxia-inducible factor-1- α (HIF-1 α) รวมทั้งลดขบวนการ degradation ของโปรตีน von Hippel-Lindau (vHL) ส่งผลให้การ expression ของ VEGF ใน HSCs เพิ่มขึ้นอย่างมาก⁽⁹⁾ (รูปที่ 1)



HIF-1 α = hypoxia-inducible factor-1- α ; vHL = von Hippel-Lindau protein

รูปที่ 1. แสดงถึง COX-2-mediated VEGF production pathway ใน hepatic stellate cells ที่มีภาวะ hypoxia

มีการศึกษาพบว่า การให้ specific neutralizing monoclonal antibodies (R-1mAb and R-2mAb) ซึ่งยับยั้ง VEGF receptor-1 and VEGF receptor-2 ช่วยลดการเกิด fibrosis และ neovascularization ในตับที่มี injury⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า COX-2 inhibitors สามารถลดการเกิด hepatic fibrosis โดยลดการสร้างโปรตีน VEGF จาก activated HSCs ซึ่งเชื่อว่าผ่านทาง COX-2/PGE₂ pathway^(1,2,11) จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นช่วยสนับสนุนว่า VEGF มีบทบาทสำคัญในขบวนการ fibrogenesis ในตับ จุดประสงค์ของการศึกษาคือเพื่อดูบทบาทของ VEGF ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน รวมทั้งเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ serum VEGF กับภาวะ portal hypertension และภาวะ jaundice ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ผลงานวิจัยนี้ได้เขียนในรูปแบบพร้อมส่งตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติตามแนบข้างท้าย

เอกสารอ้างอิง

1. Olaso E, Salado C, Egilegor E, et al. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 2003;37:674–85.
2. Yamamoto H, Kondo N, Nakamori S, et al. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* 2003;125:556–71.
3. Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, Frilling A, Häussinger D. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol* 2004;41:274–83.
4. Mochida S, Ishikawa K, Toshima K, et al. The mechanisms of hepatic sinusoidal endothelial cell regeneration: a possible communication system associated with vascular endothelial growth factor in liver cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13 Suppl:S1–S5.
5. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, et al. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:587–93.
6. Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS. von Hippel-Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J* 2002;16:264–6.
7. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1010–2.
8. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:141–8.
9. Wang YQ, Luk JM, Ikeda K, et al. Regulatory role of vHL/HIF-1(in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:358–62.
10. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003;52: 1347–54.
11. Graupera M, Carlia-pagan JC, Abrales JG, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003;37:172–81.

Serum vascular endothelial growth factor per platelet count in patients with biliary atresia

Chongsrisawat V¹, Vejchapipat P², Poovorawan Y¹

¹Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

²Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Abstract

Aim: To investigate the level of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and serum VEGF per platelet count in patients with biliary atresia (BA) and its relation to clinical characteristics.

Methods: Peripheral blood samples were taken from 70 BA patients and 15 healthy control children. Serum VEGF was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. We compared serum VEGF and serum VEGF per platelet count in BA patients with the respective results obtained in healthy control children. The relation of serum VEGF per platelet count with clinical variables of BA patients was investigated.

Results: Serum VEGF levels and serum VEGF per platelet count in BA patients were not significantly different from those in normal controls (289.64 ± 27.49 vs 312.36 ± 48.81 pg/ml; $p=0.72$ and 1.72 ± 0.15 vs $1.57 \pm 0.25 \times 10^6$, $p=0.66$). Significant differences were observed when VEGF per platelet count was categorized by the presence of esophageal varice ($p=0.006$). Only in BA patients was the serum level of VEGF correlated with the number of platelets ($r = 0.526$, $p < 0.001$).

Conclusion: A high serum VEGF per platelet count is a useful marker for the development of portal hypertension in BA patients, especially for esophageal varice. Serum VEGF per platelet count may be useful for monitoring disease course in BA after hepatic portoenterostomy.

Introduction

Biliary atresia (BA) is a progressive, scleroing, inflammatory process resulting in complete obliteration of the extrahepatic bile ducts. The obstruction of bile flow engenders worsening cholestasis, hepatic fibrosis, and cirrhosis, which lead to portal hypertension and a decline in hepatic synthetic function. Successful restoration of bile flow by hepatoportoenterostomy can be achieved in 60 to 90% of patients, although 75% of them will progress to cirrhosis and eventually end-stage liver disease requiring liver transplantation.¹ The etiology of BA has so far remained unknown. Several hypotheses refer to infections, congenital factors, toxic agents, and immune-related causes.² Various genes involved in cell signaling, transcription regulation, hepatic development, morphogenesis, and fibrogenesis are altered in BA.³ Previous reports on BA patients who had undergone hepatic portoenterostomy revealed that a number of cytokines, such as endothelin-1, hyaluronan, hepatocyte growth factor, interleukin-8, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, were significantly elevated in patients with persistent jaundice, abnormal transaminases and/or portal hypertension than in those free from those complications.⁴⁻⁸ These results suggest that numerous cytokines are involved in hepatic inflammation and fibrogenesis in BA.

Hepatic stellate cells (HSCs), located in Disse's space, have been strongly implicated in the generation of liver fibrogenesis. Activated HSCs produce transforming growth factor (TGF)- β and extracellular matrix (ECM) components, which induce fibrosis.^{9,10} Furthermore, increased ECM components impair blood flow and oxygen delivery, resulting in hypoxia.¹¹ Hepatic vascular cell proliferation or "vascular remodeling" is also closely associated with liver fibrosis.^{12,13} Progression of liver fibrosis has been linked with injuries associated with hypoxia and neovascularization.¹⁴ Neovascularization comprises angiogenesis, the formation of new blood vessels by sprouting of preexisting mature endothelial cells, and vasculogenesis, the formation of blood vessels by differentiation of endothelial progenitor cells.¹⁵⁻¹⁷ Activated HSCs are harmful due to unbalanced expression and secretion of growth factors that enhance fibrogenesis and neovascularization.¹⁸

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a well known, potent angiogenic factor which enhances vascular permeability, promoting the extravasation of protein to form a stromal matrix and tumor invasion.¹⁹ VEGF has proven a potent, diffusable and specific

endothelial growth factor. In recent years, several members of the VEGF family have been described, namely placenta growth factor (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D.²⁰ Serum VEGF can be influenced by VEGF released from platelets during clotting.^{21,22} In a recent study, serum VEGF per platelet count has been applied to correct variations of serum VEGF levels in patients with different platelet counts.²³ It has been shown that serum VEGF per platelet count correlates with advanced stage colorectal cancer, suggesting its role as a standard measure of circulating VEGF. DNA array analysis conducted on livers of patients with chronic hepatitis C, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and nonalcoholic steatohepatitis has demonstrated overexpression of genes essential for fibrogenesis and neovascularization including those encoding growth factors such as hepatocyte growth factor (HGF) and VEGF, their receptors, adhesion molecules, and matrix remodeling molecules.^{24,25} Nonetheless, data on the role of VEGF in patients with BA is still scarce. The aim of this study has been to determine the relationship of serum VEGF and serum VEGF per platelet count, calculated by dividing serum VEGF concentration by the platelet count, with clinical parameters in patients with BA.

Materials and methods

The study protocol has been approved by the ethical committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Likewise, the parents of all participating children have provided their consent to the study.

Subjects

The study included 70 patients with BA who attended the liver clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital. Fifteen healthy children served as controls.

Clinical data

Physical examination, liver function test, and complete blood count were performed on each patient. Splenomegaly was diagnosed based on physical examination whereas esophageal varice was recognized by endoscopy. Patients with total bilirubin ≥ 2 mg/dl were classified as jaundiced.

Blood sampling and enzyme immunoassay of serum VEGF concentration

Serum samples were stored at -70°C until tested. Serum VEGF was measured in duplicate by commercially available ELISA kits (Quantikine human VEGF, R&D System, Minneapolis, MN, USA). According to the manufacturer's specifications, the minimal detectable dose of VEGF was <5.0 pg/ml, the intra-assay and the inter-assay variables were 6.7-5.1% and 8.8-6.2%, respectively. Absorbance was determined using a microplate reader 3550 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 450 nm. Serum VEGF per platelet count was calculated by dividing serum VEGF concentration by the platelet count.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard error of mean (SEM). To investigate the relationships between serum levels of VEGF, VEGF per platelet count and other variables, t test, correlation coefficient (r) and Spearman's rank correlation were used when appropriate. $P<0.05$ based on a two-tailed test was considered statistically significant. All the statistical analyses were performed using a statistical software package (SPSS, Version 11.5, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Serum VEGF in patients with biliary atresia and healthy controls

The baseline characteristics of the patients with BA and healthy controls are shown in Table 1. There was no significant difference in serum VEGF levels between the patients with BA and healthy controls.

Correlation of serum VEGF level and platelet count

In the patients with BA, there was a statistically significant correlation between serum VEGF level and platelet count ($r=0.53$, $p<0.001$) (Figure 1). Increase in serum VEGF level was directly related to the increase in platelet count. On the other hand, there was no correlation between serum VEGF levels and platelet count in healthy controls ($p=0.06$).

Correlation between serum VEGF and serum VEGF per platelet count and clinical features in patients with biliary atresia

There was no significant association between serum VEGF levels and various clinical variables, including esophageal varice and jaundice except for splenomegaly (Table 2). Serum VEGF levels in BA patients with jaundice, splenomegaly, or esophageal varice were not different from those in the control group. Patients without splenomegaly had higher platelet counts than those with splenomegaly (268.17 ± 20.47 vs $138.43 \pm 11.80 \times 10^6/\text{ml}$, $p < 0.001$).

Serum VEGF per platelet count in patients with BA was not significantly different from that in healthy controls (1.72 ± 0.15 vs $1.57 \pm 0.25 \times 10^6$, $p = 0.66$). In patients with BA, the serum VEGF per platelet count was higher in the group with esophageal varice than in those without esophageal varice (1.98 ± 0.21 vs $1.29 \pm 0.16 \times 10^6$, $p = 0.036$) (Figure 2). However, there was no correlation between serum VEGF per platelet count and other clinical features including jaundice and splenomegaly (Table 2).

Discussion

Hepatic stellate cells (HSCs) are an important source of inflammatory mediators in the injured liver, assuring autocrine and paracrine regulation of proliferation and activation of neighboring cells and HSCs. Under a hypoxic atmosphere mimicking a microenvironment of injured liver, HSCs were activated to produce VEGF protein to participate in hepatic angiogenesis and fibrogenesis.²⁶⁻²⁸ VEGF is up-regulated by hypoxia and a number of cytokines including epidermal growth factor (EGF), TGF- β , IL-1 and IL-6.²⁹ Cellular hypoxia is known to occur in alcoholic liver injury, hepatic fibrosis and in tumors, three conditions in which HSCs play an important role. Activated HSCs produce cyclooxygenase-2 (COX-2) protein to induce VEGF production which is believed to play a key role in angiogenesis and fibrogenesis in the injured liver.²⁶ Previous reports have shown that VEGF protein derived from HSCs is involved in the proliferation of sinusoidal endothelial cells.^{30,31} Hepatocellular hypoxia and angiogenesis have been associated with fibrogenesis in experimental cirrhosis.^{27,32} Hypoxic tissue injury is frequently due to microvascular disruption, which causes cessation of blood flow while hypoxia simultaneously enhances the production of angiogenic factors such as VEGF protein.

Portal hypertension is a frequent and severe complication of chronic liver diseases including biliary atresia. It is characterized by a pathological increase in portal venous pressure, by the subsequent formation of an extensive network of portosystemic collateral vessels (PSC), including gastroesophageal varices, splenomegaly, and by the development of hyperdynamic circulatory syndrome.^{33,34} It has been recently demonstrated that the expression of VEGF is increased in experimental models of portal hypertension, and that the formation of PSC is, in part, a VEGF-dependent angiogenic process.^{35,36} Both circulating and tissue bound VEGF tend to increase in acute and chronic hepatitis and to decrease in cirrhosis.³⁷ However, in this study there has been no significant difference between serum VEGF levels of BA patients with portal hypertension (either splenomegaly or esophageal varice) and normal controls. According to this study, serum VEGF levels in BA patients did not correlate with the jaundice status, consistent with the study by Aw *et al* which has shown that there is no correlation between serum VEGF levels and aspartate aminotransferase or bilirubin in children with acute liver failure.³⁸

Principally, serum VEGF is a combination of both VEGF released from platelets on coagulation and the circulating plasma VEGF. Platelets may normally contain a certain amount of VEGF in their granules. Therefore, serum VEGF level can be influenced by platelet count. A direct correlation between platelet counts and serum VEGF has also been reported.³⁹⁻⁴¹ In addition, platelets have been reported to engulf and store various angiogenic factors such as VEGF and platelet-derived growth factor (PDGF) in their granules, and these molecules are secreted immediately after platelet activation.^{42,43} In this study, serum VEGF levels significantly correlated with platelet counts in BA patients ($r=0.526$, $p<0.01$), but there was no such correlation in healthy controls. These facts would imply increased amounts of VEGF in platelets of the BA patients.

Serum VEGF per platelet count is an indirect theoretical estimate of VEGF in platelets. In this study, serum VEGF levels and platelet counts were higher in BA patients without splenomegaly than in those with splenomegaly, but serum VEGF per platelet count was not different in those with or without splenomegaly. In contrast, BA patients with esophageal varice showed higher serum VEGF per platelet count than those without esophageal varice. Accordingly, serum VEGF per platelet count can predict the development of serious complications such as esophageal varice in patients with BA who undergo portoenterostomy.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates the possible role of serum VEGF per platelet count as an indicator of the development of esophageal varice in patients with BA. Therefore, serum VEGF per platelet count could be a useful clinical parameter for BA patients' follow-up. Further studies conducted on a larger patient population will be required in order to elucidate its value in clinical application.

Acknowledgement

The authors are grateful to all the staff of the Center of Excellence in Viral Hepatitis Research, at Chulalongkorn University, for their great assistance. This study received financial support from the Thailand Research Fund. We also thank Ms. Petra Hirsch for editing this manuscript.

Reference

1. Otte JB, de Ville de Goyet J, Reding R, Hausleithner V, Sokal E, Chardot C, Debande B. Sequential treatment of biliary atresia with Kasai portoenterostomy and liver transplantation: a review. *Hepatology* 1994;20:41S-48S.
2. Perlmutter DH, Shepherd RW. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype? *Hepatology* 2002;35:1297-304.
3. Chen L, Goryachev A, Sun J, Kim P, Zhang H, Phillips MJ, Macgregor P, Lebel S, Edwards AM, Cao Q, Furuya KN. Altered expression of genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia. *Hepatology* 2003;38:567-76.
4. Chongsrisawat V, Chatchatee P, Samransamruajkit R, Vanapongtipagorn P, Chottivittayatarakorn P, Poovorawan Y. Plasma endothelin-1 levels in patients with biliary atresia: possible role in development of portal hypertension. *Pediatr Surg Int* 2003;19:478-81.
5. Chongsrisawat V, Kongtawelert P, Tongsoongnoen W, Tangkijvanich P, Vejchapipat P, Poovorawan Y. Serum hyaluronan as a marker reflecting the severity of cirrhosis and portal hypertension in postoperative biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2004;20:773-7.
6. Vejchapipat P, Theamboonlers A, Chaokhonchai R, Chongsrisawat V, Chittmittrapap S, Poovorawan Y. Serum hepatocyte growth factor and clinical outcome in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2004;39:1045-9.
7. Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk N, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Serum interleukin-8 in children with biliary atresia: relationship with disease stage and biochemical parameters. *Pediatr Surg Int* 2005;21:73-7.
8. Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk N, Poovorawan Y. Association of serum levels of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 with clinical outcome in children with biliary atresia. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2006;24:161-6.
9. Friedman SL. Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 2004;40:1041-3.
10. Friedman SL, Maher JJ, Bissell DM. Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD Single Topic Basic Research Conference. *Hepatology* 2000;32:1403-8.

11. Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, Garcia-Arroyo A, Garcia-Sanchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108:231-41.
12. Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; 39:1185-95.
13. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998;27:1554-62.
14. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1010-21.
15. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-6.
16. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
17. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
18. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, Poupon R. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999;155:1065-73.
19. Dvorak HF, Brown IF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
20. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
21. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956-64.

22. Webb NJA, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PEC. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci* 1998;94:395-404.
23. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: Clinical evidence of platelet scavenging? *Clin Cancer Res* 2000;6:3147-52.
24. Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut* 2001;49:565-76.
25. Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression. *Am J Pathol* 2002; 160:641-54.
26. Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* 2003;125:556-71.
27. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1010-2.
28. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:141-8.
29. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527-43.
30. Mochida S, Ishikawa K, Toshima K, Inao M, Ikeda H, Matsui A, Shibuya M, Fujiwara K. The mechanisms of hepatic sinusoidal endothelial cell regeneration: a possible communication system associated with vascular endothelial growth factor in liver cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13 Suppl:S1-S5.
31. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:587-93.

32. Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS. von Hippel-Lindau tumor suppressor and HIF-1 α : new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J* 2002;16:264-6.
33. Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141-56.
34. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:1-14.
35. Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004;126:886-94.
36. Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005;43:98-103.
37. Shi B, Wang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factors and liver diseases. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1145-8.
38. Aw MM, Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Serum hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in children with acute liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:224-7.
39. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, et al. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 1999;80:892-7.
40. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: Clinical evidence of platelet scavenging? *Clin Cancer Res* 2000;6:3147-52.
41. Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1997;3:2187-90.
42. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie AS, Masse JM, Savidge GF, Cramer EM. Uptake of plasma fibrinogen into α granules of human megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest* 1989;84:1320-4.

43. Handagama PJ, George JN, Shuman MA, McEver RP, Bainton DF. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:861-5.

Table 1. The characteristics and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level of the patients with biliary atresia and healthy controls

	Healthy controls	Biliary atresia
Number	15	70
Gender (M/F)	11/4	35/35
Age (year)	10.88 $\pm$ 0.92	6.08 $\pm$ 0.54
Serum VEGF (pg/ml)*	312.36 $\pm$ 48.81	289.64 $\pm$ 27.49

Data expressed as mean $\pm$ SEM

* $p = 0.72$

Table 2. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level of the patients with biliary atresia

	Serum VEGF level (pg/ml)	<i>P</i> value	VEGF/platelet ($\times 10^6$)	<i>P</i> value
Jaundice		0.50		0.18
Yes (n=28)	266.90 $\pm$ 46.98		1.97 $\pm$ 0.26	
No (n=42)	304.80 $\pm$ 33.72		1.56 $\pm$ 0.17	
Splenomegaly		0.045		0.17
Yes (n=47)	251.30 $\pm$ 31.35		1.86 $\pm$ 0.19	
No (n= 23)	367.99 $\pm$ 50.99		1.43 $\pm$ 0.23	
Esophageal varice		0.27		0.036
Yes (n=42)	258.49 $\pm$ 36.15		1.98 $\pm$ 0.21	
No (n=22)	323.60 $\pm$ 41.26		1.29 $\pm$ 0.16	

Data expressed as mean $\pm$ SEM

Figure 1. Scatter plot shows the correlation between serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level and platelet count in the patients with biliary atresia ($r=0.53$, $p<0.001$)

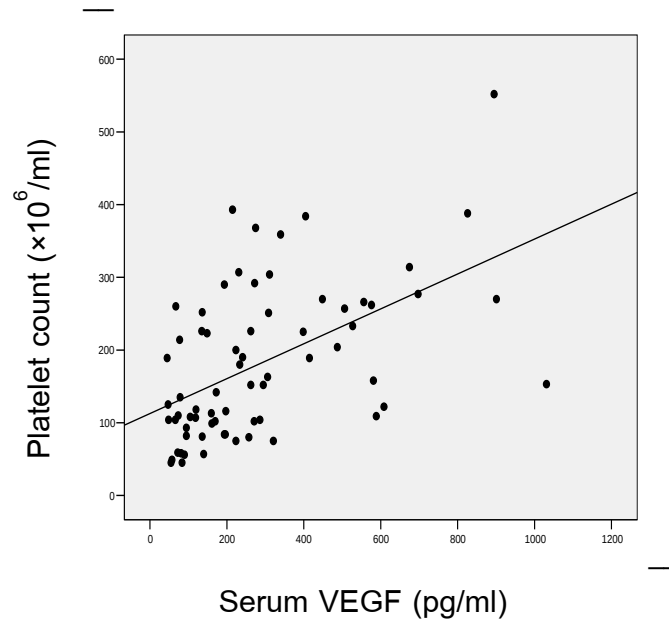


Figure 2. Mean serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with biliary atresia with and without esophageal varice. Data represent mean $\pm$ SEM.

