



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทหน้าที่ของไคตินเอสรีไลท์วันและไซโตไคน์  
กับการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ vasculogenic mimicry ใน  
มะเร็งปากมดลูก

(Roles of CHI3L1 and cytokines on vasculogenic  
mimicry in cervical cancer)

โดย ดร. นิภาพร เงินยวง

เดือนกรกฎาคม ปี 2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทหน้าที่ของไคตินเนสรีไลท์วันและไซโตไคน์  
กับการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ vasculogenic mimicry ใน  
มะเร็งปากมดลูก

(Roles of CHI3L1 and cytokines on vasculogenic  
mimicry in cervical cancer)

ผู้วิจัย ดร. นิภาพร เงินยวง  
สังกัดวิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์  
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ  
ต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย  
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

**Project Code (รหัสโครงการ) : TRG5880156**

**Project Title (ชื่อโครงการ) : บทบาทหน้าที่ของไคตินเอสรีไลทีนและไซโตไคน์กับการสร้างหลอดเลือด**

**เลือดใหม่แบบ vasculogenic mimicry ในมะเร็งปากมดลูก**

**Roles of CHI3L1 and cytokines on vasculogenic mimicry in cervical cancer**

**Investigator (ชื่อนักวิจัย) : ดร. นิภาพร เงินยวง**

**สังกัดวิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์**

**E-mail Address : nngernyuang@gmail.com**

**Project Period (ระยะเวลาโครงการ) : 2 ปี**

---

### **Abstract**

**Introduction:** Vasculogenic mimicry (VM) is the formation of fluid-conducting channels mediated by aggressive tumor cells. It provides a pathway for perfusion that is independent of angiogenesis. VM is associated with tumor growth, metastasis, and short survival time of several cancers. Our previous study showed that the expression of chitinase 3 like 1 (CHI3L1) is associated with VM and metastasis in invasive cervical cancer.

**Objectives:** 1. To address whether CHI3L1 was associated with VM in cervical cancer.  
2. To confirm whether CHI3L1 played a key role in VM formation.

**Methods:** We examined CHI3L1 expression and VM formation using immunohistochemistry and CD34 - Periodic acid-schiff (PAS) dual staining in 66 tissue samples of cervical cancer and the tube-like structure formation assay was performed in cervical cancer cell lines.

**Results:** The significant association between CHI3L1 expression and VM formation was observed ( $P=0.031$ ). Moreover, VM negative were positively correlated with non-metastasis ( $P=0.035$ ) in cervical cancer patients. Moreover, we found that the recombinant CHI3L1 enhanced cervical cancer cell lines to form tube-like structures.

**Conclusion:** Our present data reveals the crucial role of CHI3L1 on promoting VM formation which may contribute to tumor aggressiveness and suggests that targeted CHI3L1 may be a valuable strategy for the reduction of cervical cancer progression and metastasis.

## บทคัดย่อ

**บทนำ:** Vasculogenic mimicry (VM) เป็นรูปแบบการสร้างหลอดเลือดใหม่ซึ่งพบมากในก้อนมะเร็งที่อยู่ในระยะรุกราน โดยเป็นรูปแบบการสร้างหลอดเลือดที่ไม่เกี่ยวข้องกับรูปแบบการสร้างหลอดเลือดปกติแบบ angiogenesis และพบว่าการสร้างหลอดเลือดแบบ VM มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง การรุกรานของมะเร็ง และการมีชีวิตรอดสั้นของผู้ป่วยโรคมะเร็ง

**วัตถุประสงค์:** ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการแสดงออกของโปรตีน chitinase 3 like 1 (CHI3L1) และการเกิดรูปแบบการสร้างหลอดเลือดแบบ VM ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกและดูความสัมพันธ์กับการเกิดการรุกรานของมะเร็ง

**วิธีการศึกษา:** ทำการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยเพื่อดูความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 และการเกิดหลอดเลือดแบบ VM (CD34 - Periodic acid-schiff (PAS) dual staining และทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงโดยการทรีทเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยโปรตีน CHI3L1 เพื่อดูการสร้างโครงสร้างของหลอดเลือดใหม่

**ผลการศึกษา:** พบว่าการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับการเกิดหลอดเลือดแบบ VM โดยหากมีการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 มากขึ้นจะพบการเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ VM เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P=0.031$ ) และเมื่อทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกพบว่าโปรตีน CHI3L1 มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเกิดการสร้างโครงสร้างคล้ายหลอดเลือดที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

**สรุปผลการทดลอง:** ความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำ CHI3L1 ใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากระยะก่อนมะเร็งไปเป็นระยะมะเร็งปากมดลูก และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดหลอดเลือดใหม่ทั้งแบบ angiogenesis และแบบ VM ซึ่งอาจจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาตัวรับที่จำเพาะกับ CHI3L1 ในอนาคตเพื่อให้เกิดประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกอย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นรวมทั้งอัตราการรอดชีวิตที่ยาวขึ้น

## รายงานผลการดำเนินงาน

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย/ความสอดคล้องกับยุทธศาสตร์หรือประเด็นการวิจัยหลักของมหาวิทยาลัย

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer; CxCa) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับสาม และเป็นมะเร็งที่มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงเป็นอันดับที่สี่ในผู้หญิงทั่วโลก นอกจากนั้นยังพบว่าอุบัติการณ์เกิดมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงทั่วโลกมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น (1) โดยสาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิดมะเร็งปากมดลูกคือการติดเชื้อไวรัส human papillomavirus (HPV) ชนิดเสี่ยงสูง เช่น HPV 16 และ 18 (2) การวินิจฉัยระยะของมะเร็งปากมดลูกถูกกำหนดให้ใช้ตามแบบแผนของ International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) เพื่อเป็นเกณฑ์ในการรักษาและการติดตามผลการรักษา ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกประกอบด้วย การผ่าตัด รังสีรักษาและการให้ยาเคมีบำบัดหรือการรักษาโดยใช้วิธีการรักษาร่วมกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะของโรค (3) อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยบางรายมีการกลับมาเป็นโรคซ้ำหลังจากได้รับการรักษาในขั้นต้น หรือไม่ตอบสนองต่อการรักษา (4) ซึ่งส่วนใหญ่มักจะพบในผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะลุกลาม นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการกลับมาเป็นโรคซ้ำ เช่น ขนาดของก้อนมะเร็ง ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง สภาพของตัวผู้ป่วยเอง ตลอดจนวิธีการรักษาที่ไม่เหมาะสมกับผู้ป่วย (5, 6) นอกจากนั้นแล้วปัจจัยที่สำคัญอีกสิ่งหนึ่งคือ การเกิดหลอดเลือดใหม่ของก้อนมะเร็ง ซึ่งหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่นี้มีหน้าที่ลำเลียงน้ำและสารอาหารให้เซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ก้อนมะเร็งเติบโต มีการดำเนินโรคและระยะลุกลามที่รวดเร็วขึ้น โดยปกติแล้ว ก้อนมะเร็งจะเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่เรียกว่า angiogenesis ซึ่งเป็นการสร้างหลอดเลือดใหม่จากเซลล์ endothelial และมีการศึกษาพบว่า การเกิดหลอดเลือดใหม่เหล่านี้มีผลต่อการดำเนินโรคที่ไม่ดีและอัตราการรอดชีวิตต่ำในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก (7)

ในปัจจุบันนี้มีการศึกษาพบว่านอกจากการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ angiogenesis ที่มีความสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็ง (metastatic cancers) แล้วนั้น ยังมีการสร้างหลอดเลือดแบบใหม่โดยเป็นการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่ไม่เกี่ยวข้องกับ endothelial ซึ่งเป็นการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยการรวมตัวกันของเซลล์มะเร็งเอง ปรากฏการณ์การสร้างหลอดเลือดใหม่ที่แตกต่างจาก traditional tumor angiogenesis นี้เรียกว่า vasculogenic mimicry (VM) ซึ่งพบในมะเร็งหลายชนิด (8-15) นอกจากนั้นแล้วยังมีการศึกษาพบว่าการเกิดหลอดเลือดแบบใหม่นี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดการลุกลามของมะเร็งและการดำเนินโรคที่ไม่ดีในมะเร็งอีกด้วย (16)

การศึกษาก่อนหน้านี้ Sakunja และคณะ (17) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างในระดับการแสดงออกของยีน (gene differential expression profiling) โดยวิธีไมโครอาร์เรย์ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีความผิดปกติ กลุ่มผู้ป่วยก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (precancerous lesion; low-grade intraepithelial lesions (LSIL) และ high-grade intraepithelial lesions (HSIL)) และผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก พบว่ายีนหลายชนิดมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก และหนึ่งในนั้นคือยีน chitinase 3 like 1 (CHI3L1) ซึ่งการแสดงออกของยีน CHI3L1 มีระดับเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็ง และผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ แสดงให้เห็นถึงหน้าที่สำคัญของยีน CHI3L1 ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคมะเร็งปากมดลูก (17) และเมื่อผู้วิจัยและคณะได้ทำการศึกษายาทาบทนาหน้าที่การทำงานของ CHI3L1 พบว่ามีบทบาทเป็นปัจจัยที่ชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ angiogenesis โดยชักนำให้เซลล์ endothelial มีการเคลื่อนที่และชักนำให้เกิดการสร้างโครงสร้างของหลอดเลือดในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก (18) นอกจากนั้นแล้วระดับการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 ยังมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ angiogenesis และระดับการแสดงออกของโปรตีนยังมีความสัมพันธ์กับจำนวนหลอดเลือดใหม่ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก (18)

ดังนั้นในการศึกษานี้เรามีสมมติฐานเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ใหม่ของ CHI3L1 ซึ่งอาจจะเป็นโปรตีนสำคัญที่กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิดการสร้างหลอดเลือดแบบ VM ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกมีการดำเนินโรคที่ไม่ดี เพื่อการพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว การศึกษานี้คณะผู้วิจัยทำการศึกษารoles บทบาทหน้าที่การทำงานรวมทั้งกลไกการทำงานของ CHI3L1 ในการชักนำให้เกิดการสร้างโครงสร้างลักษณะคล้ายหลอดเลือดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ CHI3L1 และการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM ในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

ความรู้ที่ได้จากผลการศึกษานี้อาจจะใช้เป็นซึ่งเป็นองค์ความรู้ด้านข้อมูลพื้นฐานว่า CHI3L1 อาจสามารถพัฒนาไปเป็นยีนเป้าหมายในการรักษาโรคแบบยีนบำบัด (targeted therapy) ในอนาคต เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกอย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตที่ยาวขึ้น

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษารoles บทบาทหน้าที่ของ CHI3L1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  ในด้านการเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกให้เกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM
- 2.2 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ CHI3L1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  และข้อมูลทางคลินิก รวมทั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก
- 2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของ CHI3L1 และการแสดงออกของ inflammatory cytokines (IL6 และ TNF- $\alpha$ )
- 2.4 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของ CHI3L1 และการแสดงออกของ inflammatory cytokines (IL6 และ TNF- $\alpha$ ) ในการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

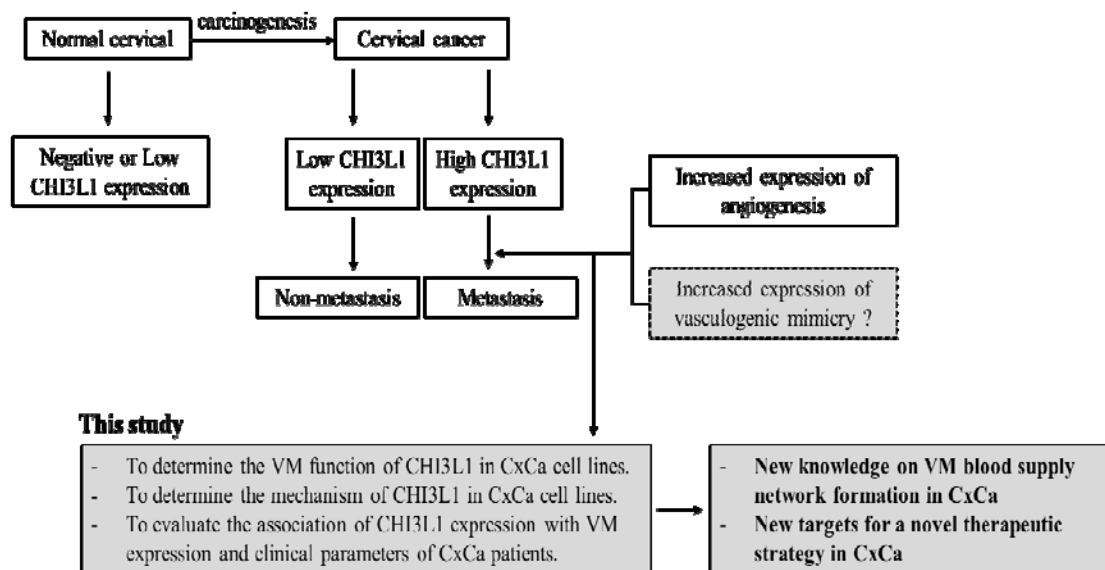
## 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษารoles บทบาทหน้าที่ของ CHI3L1 ในการชักนำเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ VM และศึกษาการแสดงออกของ CHI3L1 และการเกิดโครงสร้างหลอดเลือดแบบ VM ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิก

## 4. ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยและคณะ แสดงให้เห็นถึงบทบาทหน้าที่การทำงานของ CHI3L1 ในการชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ angiogenesis โดยชักนำให้เซลล์ endothelial มีการเคลื่อนที่และชักนำให้เกิดการสร้างโครงสร้างของหลอดเลือด และยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดการลุกลามของมะเร็ง (metastasis) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก (18) ดังนั้นในการศึกษานี้เรามีสมมติฐานเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ใหม่ของ CHI3L1 ว่าอาจจะเป็นตัวการสำคัญที่ชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการสร้างหลอดเลือดแบบ VM ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าความรู้ที่ได้จากผลการศึกษานี้อาจจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานว่า CHI3L1 อาจสามารถพัฒนาไปเป็นยีนเป้าหมายในการรักษาโรคแบบยีนบำบัด (targeted therapy) ในอนาคต ดังกรอบแนวความคิดด้านล่าง

## กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



## 5. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

### 5.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ทำการสอบหน้าที่ของโปรตีน CHI3L1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  โดยการทรานส์เฟกต์โปรตีนเหล่านี้ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก และตรวจสอบการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกให้เกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM รวมทั้งตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM (VE-cadherin และ N-cadherin)

ส่วนที่ 2 ทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 และแสดงออกของไซโตไคน์ IL-6 และ TNF- $\alpha$  และแสดงออกของหลอดเลือดใหม่แบบ VM ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (IHC) ในชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกของผู้ป่วย

ส่วนที่ 3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  ในการชักนำให้เกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM รวมทั้งข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

### 5.2 ระเบียบวิธีทำวิจัย

#### 5.2.1 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูก

ในการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ซึ่งกำลังเตรียมหนังสือเพื่อยื่นขอจริยธรรมในมนุษย์ โดยคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ได้โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$N = (Z\alpha/2)^2 \times P(1-p)/d^2$$

N = sample size

$$Z\alpha/2 = 95\% \text{ confidence interval} = 1.96$$

P\* = prevalence of abnormality = 13%

D = error in estimating P =  $\pm 0.1$  (2 direction)

$$N = 1.962 \times 0.13(1-0.13)/0.12 = 43 \text{ cases}$$

\* คาดคะเนปฏิบัติการการแสดงผลของ VM ที่ได้จากการศึกษามะเร็งสมองของ Liu XM, et al., 2011 (40)

#### 5.2.2 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด คือ เซลล์ CaSki และเซลล์ HeLa จะถูกเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร DMEM high-glucose (DMEM-HG) ที่ประกอบด้วย 10% ของ fetal bovine serum (FBS) และ 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA).

#### 5.2.3 การศึกษาการเกิดการสร้างโครงสร้างของหลอดเลือดใหม่ในจานเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (tube formation assay)

นำ growth factor-reduced Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate หลังจากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกจำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ ใส่ลงในเพลตดังกล่าว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่เติมอาหารที่ไม่ใส่รีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 และกลุ่มที่สองคือกลุ่มทดลองโดยเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพโครงสร้างหลอดเลือดใหม่ที่เกิดขึ้น

#### 5.2.4 การศึกษาการแสดงผลของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR)

ทำการทรีตเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกทั้ง 2 ชนิด ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ผลิตได้จากข้อ 6.2.3 หลังจากนั้นทำการสกัด RNA ด้วย TRIzol reagent (Gibco, Grand Island, NY) และเปลี่ยนเป็น first strand complementary DNA (cDNA) ด้วยไพรเมอร์ oligo d(T) ในชุดการสังเคราะห์ Improm IITM Reverse Transcriptase System (Promega, Madison, WI) และทำการตรวจสอบการแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด VM เช่น VE-cadherin และ N-cadherin ด้วยวิธี PCR

#### 5.2.5 การศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry, IHC)

ตัดเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกที่ฝังในพาราฟินให้มีความหนา 4 ไมครอน วางบนสไลด์ แล้วนำไปผ่านกระบวนการละลายพาราฟิน (deparaffinization) ด้วย xylene และกระบวนการเอาน้ำกลับคืน (rehydrated) ด้วย ethanol หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ Antigen retrieval โดยการต้มใน 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) นาน 15 นาที และผ่านกระบวนการกำจัด endogenous peroxidase ด้วย 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นเวลา 30 นาที และทำการยับยั้ง nonspecific site ด้วยการหยด จากนั้นแช่ใน phosphate buffered saline (PBS) 10 นาที 20% FBS นาน 30 นาที ซึ่งจะทำให้ back ground ลดลง จากนั้นหยด primary antibody และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จึงเริ่มทำการทดสอบตามขั้นตอนของชุดทดสอบ EnVision<sup>TM</sup> system (DAKO corporation, Carpinteria, CA) ขั้นตอนสุดท้ายนำ 3,3'-diaminobenzidine DAB substrate (DAKO corporation) บ่ม 2-3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แห้ง ทับด้วยสี hematoxylin นาน 45 วินาที จากนั้น mount ด้วย glycergel (Dako Cytomation.; Carpinteria, CA, USA) ปิดด้วย cover glass นำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 5.2.6 การศึกษาการแสดงผลของ VM โดยการย้อม CD34-PAS dual staining

การสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ VM สามารถตรวจสอบได้ด้วยการย้อม CD34-PAS dual staining ซึ่งเมื่อทำการย้อม IHC ของ CD34 (primary antibody) ในเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกด้วยแล้ว เมื่อถึงขั้นตอนสุดท้ายคือการบ่มด้วย EnVision<sup>TM</sup> System (DAKO corporation, Carpinteria, CA) หลังจากนั้นให้นำไปแช่น้ำเป็นเวลา 5 นาที ให้นำไปบ่มด้วย periodic acid-Schiff (PAS) นาน 15 นาทีแล้วย้อมทับด้วย hematoxylin นาน



45 วินาที จากนั้น mount ด้วย glycergel (Dako Cytomation.; Carpinteria, CA, USA) ปิดด้วย cover glass นำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่แบบ VM จะมีการติดสีม่วง แต่ถ้าหากเกิดการสร้างหลอดเลือดแบบ angiogenesis จะติดสีน้ำตาลแดงของ CD34 เพียงอย่างเดียว

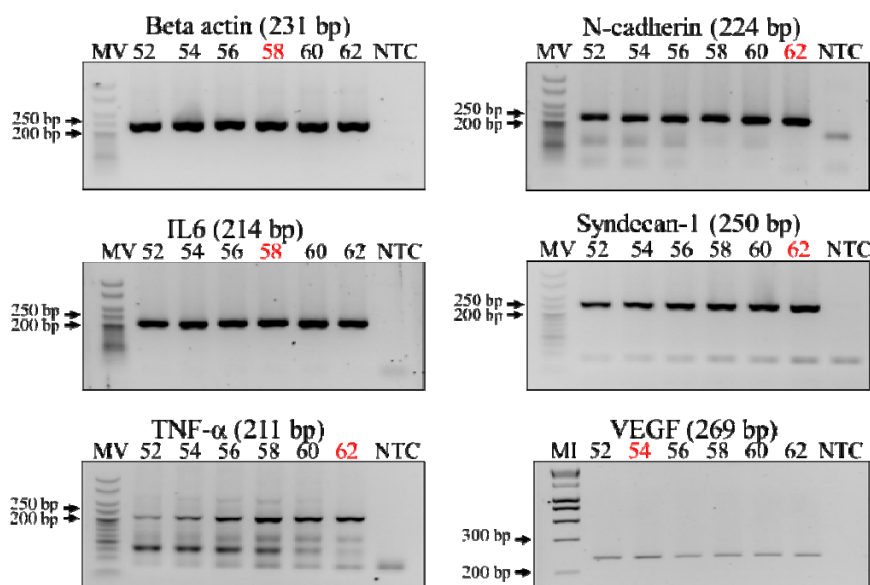
#### 5.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้ Pearson test วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ CHI3L1 และการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM ในผู้ป่วย หากค่าของ P value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

### 6. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการโดยย่อ

6.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM เช่น (VE-cadherin และ N-cadherin) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกที่ทรานส์เฟกต์ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 โดยใช้วิธี RT-PCR

ในขั้นแรก ผู้วิจัยทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำพีซีอาร์ของยีนต่างๆ โดยผลดังรูปที่ 1 พบว่ายีน Beta Actin (231 bp), N-cadherin (224 bp), IL-6 (214 bp), syndecan-1 (250 bp), TNF- $\alpha$  (211 pb) และ VEGF (269 pb) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 58, 62, 58, 62, 62 และ 54 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

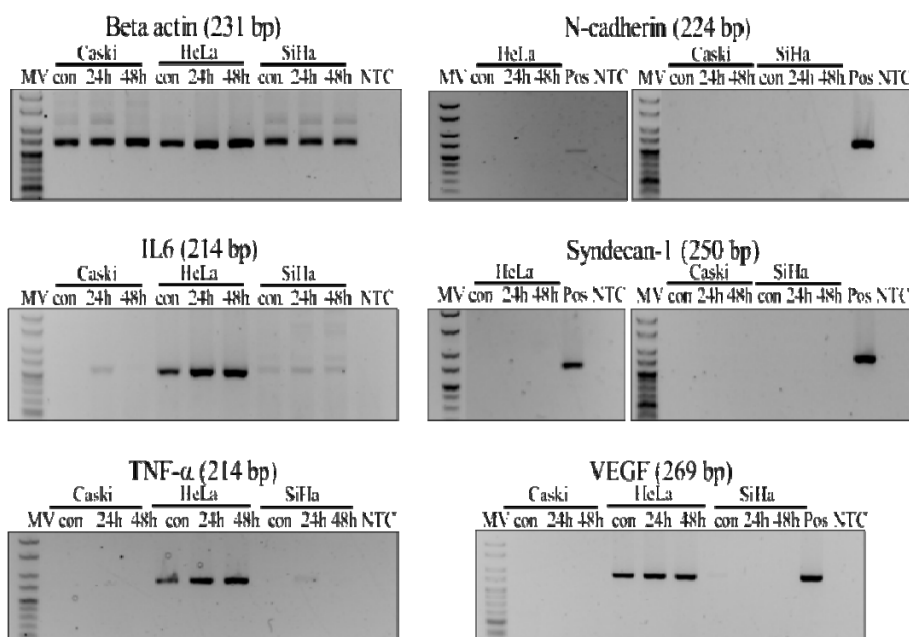


รูปที่ 1 การหาอุณหภูมิ (52, 54, 56, 58, 60 และ 62 องศาเซลเซียส) ที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ยีนต่างๆ ที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด VM โดยใช้ cDNA ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในระยะรุนแรงมาใช้เป็น DNA template และ NTC คือ non template control

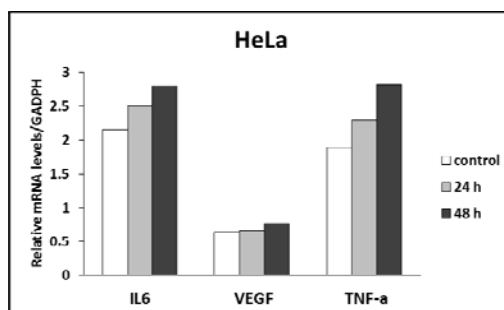
หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกทั้ง 3 ชนิด และทำการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว นำเซลล์มะเร็งมาสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอสายแรก หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบยีนต่างๆ ที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด VM โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของแต่ละยีน ผลพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกทั้ง 3 ชนิด ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเซลล์ HeLa มีการตอบสนองและการเปลี่ยนแปลงยีนมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกชนิด Caski และ SiHa (รูปที่ 2) ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบทั้งภายในเซลล์มะเร็งแตกต่างกันรวมทั้งรีเซปเตอร์บนผิวของ

เซลล์มะเร็งก็แตกต่างกันด้วย ดังนั้นอาจเป็นเหตุที่ทำให้ผลการแสดงออกของยีนแตกต่างกันและการตอบรับของการกระตุ้นจากการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกันด้วย

เมื่อทำการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa พบว่าการแสดงออกของยีน IL6, VEGF และ TNF- $\alpha$  มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนั้นยังพบว่ามีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาเพาะเลี้ยงหลังจากการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 3) อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ HeLa สามารถตอบสนองต่อโปรตีน CHI3L1 มากกว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดอื่นๆ



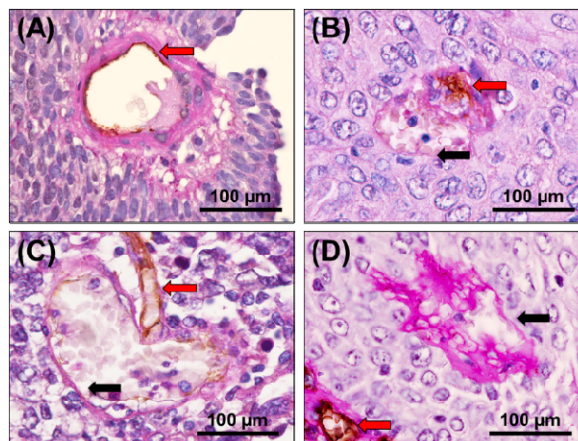
รูปที่ 2 การแสดงออกของยีนต่างๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกทั้ง 3 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง และใช้ cDNA ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในระยะรุนแรงมาใช้เป็น Positive control (Pos), NTC: non template control



รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน IL6, VEGF และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ HeLa มีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CHI3L1 ที่ระดับความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

## 6.2 ศึกษาการแสดงออกของ VM ในชั้นเนื้อมะเร็งปากมดลูก

เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ CHI3L1 และข้อมูลทางคลินิก รวมทั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่แบบ VM ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ผู้วิจัยตรวจสอบการแสดงออกของ โปรตีน CHI3L1 ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (IHC) และตรวจสอบการแสดงออกของหลอดเลือดใหม่แบบ VM ด้วยการย้อม CD34–PAS dual staining ในเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูก ผลการวิจัยพบว่าผู้ป่วยทั้งหมด 66 ราย พบผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ VM 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.72 (รูปที่ 4)

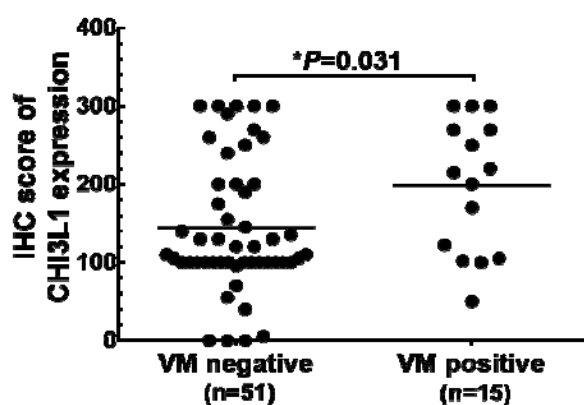


รูปที่ 4 รูปแสดงหลอดเลือดใหม่แบบ angiogenesis (A) และหลอดเลือดใหม่แบบ VM (B-D)

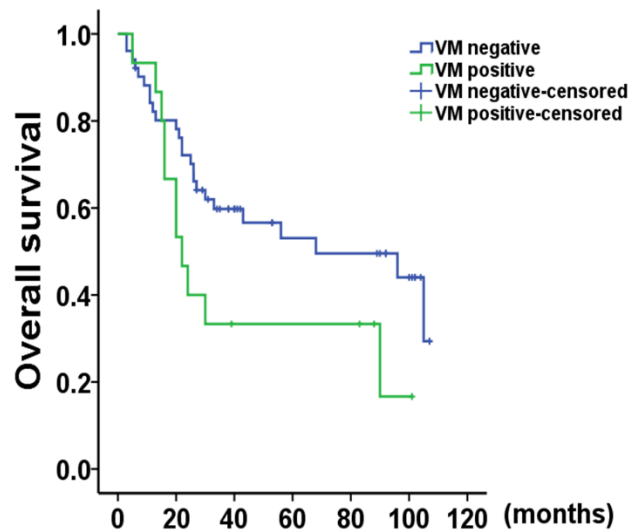
## 6.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ CHI3L1 การแสดงออกของ VM และข้อมูลทางคลินิก

ผลการวิจัยพบว่าผู้ป่วยทั้งหมด 66 ราย สามารถจัดจำแนกกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มตามระดับการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 โดยมีค่าเกณฑ์การแบ่งกลุ่มอยู่ที่การแสดงออกของระดับ CHI3L1 immunoreactive scores เท่ากับ 126 พบว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ CHI3L1 ในระดับสูงมีความสัมพันธ์กับการพบ VM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.031$ ) (รูปที่ 5)

นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 สูงมีแนวโน้มสัมพันธ์กับการมีชีวิตที่สั้นของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ CHI3L1 น้อยอีกด้วย (43.9 และ 64.6 เดือน ตามลำดับ,  $P = 0.079$ ) (รูปที่ 6).



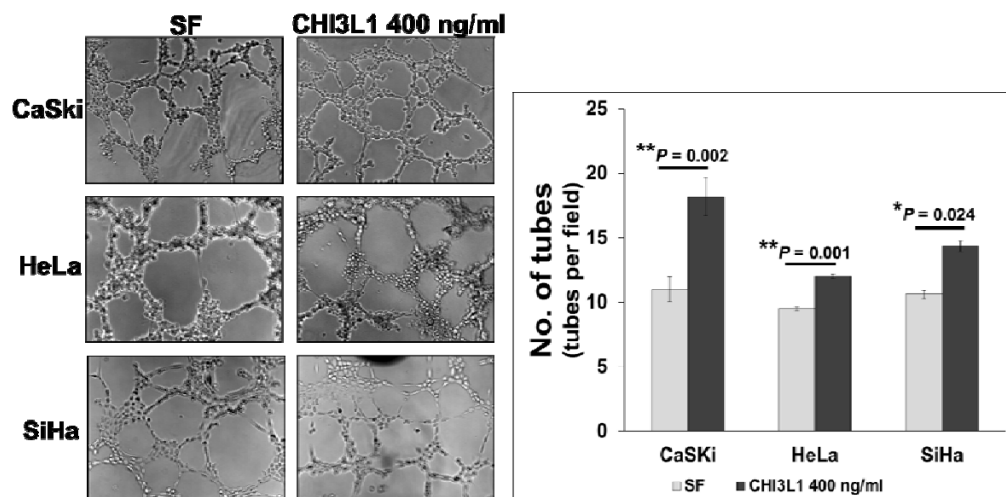
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของหลอดเลือดใหม่แบบ VM และการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของหลอดเลือดใหม่แบบ VM และการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1

#### 6.4 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ CHI3L1 ในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งปากมดลูกในการสร้างโครงสร้างคล้ายหลอดเลือด

เมื่อทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกพบว่าโปรตีน CHI3L1 มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเกิดการสร้างโครงสร้างคล้ายหลอดเลือดที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน CHI3L1 ในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิดการสร้างโครงสร้างคล้ายหลอดเลือด

#### 6.4 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ CHI3L1 การแสดงออกของ TNF- $\alpha$ IL-6 และข้อมูลทางคลินิก

ผลการวิจัยพบว่ามีผู้ป่วยทั้งหมด 66 ราย พบผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ VM 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.72 และพบว่า CHI3L1 และ TNF- $\alpha$  ที่มีความสัมพันธ์ต่อการพบ VM ในชั้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

## 7. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำ CHI3L1 ใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากระยะก่อนมะเร็งไปเป็นระยะมะเร็งปากมดลูก และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดหลอดเลือดใหม่ทั้งแบบ angiogenesis และแบบ VM ซึ่งอาจจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาตัวรับที่จำเพาะกับ CHI3L1 ในอนาคตเพื่อให้เกิดประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกอย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นรวมทั้งอัตราการรอดชีวิตที่ยาวขึ้น

## 8. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Ahmedin J, Freddie B, Melissa M.C, Jacques F, Elizabeth W, F D. Global Cancer Statistics. CA CANCER J CLIN. 2011;61:69-90.
2. Waggoner SE. Cervical cancer. Lancet. 2003;361:2217-25.
3. Poolkerd S, Leelahakorn S, Manusirivithaya S, Tangjitgamol S, Thavaramara T, Sukwattana P, et al. Survival rate of recurrent cervical cancer patients. J Med Assoc Thai. 2006;89(3):275-82.
4. Friedlander M, Grogan M. Guidelines for the treatment of recurrent and metastatic cervical cancer. Oncologist. 2002;7(4):342-7.
5. Duyn A, Van Eijkeren M, Kenter G, Zwinderman K, Ansink A. Recurrent cervical cancer: detection and prognosis. Acta Obstet Gynecol Scand. 2002;81(8):759-63.
6. Zanetta G, Torri W, Bocciolone L, Lucchini V, Mangioni C. Factors predicting response to chemotherapy and survival in patients with metastatic or recurrent squamous cell cervical carcinoma: a multivariate analysis. Gynecol Oncol. 1995;58(1):58-63.
7. Randall-Whitis LM, Monk BJ. Topotecan in the management of cervical cancer. Expert opinion on pharmacotherapy. 2007;8(2):227-36.
8. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am J Pathol. 1999;155(3):739-52.
9. Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Heidger PM, Jr., Cohen MB, et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. Prostate. 2002;50(3):189-201.
10. Hao X, Sun B, Zhang S, Zhao X. [Microarray study of vasculogenic mimicry in bi-directional differentiation malignant tumor]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2002;82(19):1298-302.
11. Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, Hashimoto D, Shimizu A, Wakasugi H. Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. Breast Cancer Res. 2003;5(3):136-9.
12. Yue WY, ZP C. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? J Histo Cyto. 2005;53:997-1002.
13. Su M, Feng YJ, Yao LQ, Cheng MJ, Xu CJ, Huang Y, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo. Int J Gynecol Cancer. 2008;18(3):476-86.

14. Jiang J, Liu W, Guo X, Zhang R, Zhi Q, Ji J, et al. IRX1 influences peritoneal spreading and metastasis via inhibiting BDKRB2-dependent neovascularization on gastric cancer. *Oncogene*. 2011;30(44):4498-508.
15. Francescone R, Scully S, Bentley B, Yan W, Taylor SL, Oh D, et al. Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *J Biol Chem*. 2012;287(29):24821-31.
16. Han C, Sun B, Wang W, Cai W, Lou D, Sun Y, et al. Overexpression of microtubule-associated protein-1 light chain 3 is associated with melanoma metastasis and vasculogenic mimicry. *Tohoku J Exp Med*. 2011;223(4):243-51.
17. Sakunjia M, Jearanaikoon P, Yuenyao P, Tussakhon I, T L. Differential expression of gene profiling in therapeutic response and non-response cervical carcinoma. *J Med Tech Phy Ther*. 2010;22:6-16.
18. Ngernyuang N, Francescone RA, Jearanaikoon P, Daduang J, Supoken A, Yan W, et al. Chitinase 3 like 1 is associated with tumor angiogenesis in cervical cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;51:45-52.
19. Duarte-Franco E, Franco EL. Cancer of the Uterine Cervix. *BMC Womens Health*. 2004;4 Suppl 1:S13.
20. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(7):619-26.
21. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1167-73.
22. Long HJ, 3rd, Laack NN, Gostout BS. Prevention, diagnosis, and treatment of cervical cancer. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(12):1566-74.
23. Rehli M, Krause SW, Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics*. 1997;43(2):221-5.
24. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem*. 1993;268(34):25803-10.
25. Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J*. 2002;365(Pt 1):119-26.
26. Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *The Biochemical journal*. 2004;380(Pt 3):651-9.
27. Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol*. 2000;32(6):911-20.

28. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(6):599-605.
29. Cinton C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sorensen S, Nielsen HJ. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer.* 2002;95(2):267-74.
30. Dehn H, Hogdall EV, Johansen JS, Jorgensen M, Price PA, Engelholm SA, et al. Plasma YKL-40, as a prognostic tumor marker in recurrent ovarian cancer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica.* 2003;82(3):287-93.
31. Dupont J, Tanwar MK, Thaler HT, Fleisher M, Kauff N, Hensley ML, et al. Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(16):3330-9.
32. Johansen JS, Drivsholm L, Price PA, Christensen IJ. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung cancer.* 2004;46(3):333-40.
33. Jensen BV, Johansen JS, Price PA. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2003;9(12):4423-34.
34. Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res.* 2002;62(15):4364-8.
35. Mitsuhashi A, Matsui H, Usui H, Nagai Y, Tate S, Unno Y, et al. Serum YKL-40 as a marker for cervical adenocarcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2009;20(1):71-7.
36. Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, et al. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncogene.* 2012;31(26):3111-23.
37. Francescone RA, Scully S, Faibish M, Taylor SL, Oh D, Moral L, et al. Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *J Biol Chem.* 2011;286(17):15332-43.
38. Ku BM, Lee YK, Ryu J, Jeong JY, Choi J, Eun KM, et al. CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *Int J Cancer.* 2011;128(6):1316-26.
39. Shao R, Hamel K, Petersen L, Cao QJ, Arenas RB, Bigelow C, et al. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis YKL-40 and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2009;28:4456-68.
40. Liu XM, Zhang QP, Mu YG, Zhang XH, Sai K, Pang JC, et al. Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *Journal of neuro-oncology.* 2011;105(2):173-9.

**Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
  - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
  - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
  - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
  - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)



From: **Pathology** <[EviseSupport@elsevier.com](mailto:EviseSupport@elsevier.com)>

Date: Tue, May 30, 2017 at 1:57 PM

Subject: Successfully received: submission Chitinase 3 like 1 promotes vasculogenic mimicry formation in cervical cancer for Pathology

To: [temduang@kku.ac.th](mailto:temduang@kku.ac.th)

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: PATHOL\_2017\_190

Title: Chitinase 3 like 1 promotes vasculogenic mimicry formation in cervical cancer

Journal: Pathology

Dear Professor Limpai boon,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Pathology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=PATHOL](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=PATHOL)  
and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Pathology

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

-----

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	PATHOL_2017_190
<b>Title</b>	Chitinase 3 like 1 promotes vasculogenic mimicry formation in cervical cancer
<b>Short title</b>	CHI3L1 promotes VM in cervical cancer
<b>Article type</b>	Full length article

### Abstract

Vasculogenic mimicry (VM) is an alternative microvascular system which tumor cells orchestrate, independent of endothelial cell-mediated angiogenesis. VM develops tumor vascular networks that correlate with tumor growth, metastasis, and short survival time of patients with a number of cancers. However, little is known regarding VM in the vascularization of cervical cancer. Chitinase 3 like 1 (CHI3L1) was previously reported to display the ability to induce angiogenesis in cervical cancer. Here, we explored a pathologic role of CHI3L1 in tumor cell-mediated vascularization. Sixty-six samples of cervical cancer were collected to examine CHI3L1 expression and VM formation using immunohistochemistry and CD34-Periodic acid-schiff (PAS) dual staining. CHI3L1 expression was correlated with formation of tumor cell-associated vascular channels in the absence of endothelial cells ( $P=0.031$ ). Interestingly, tumor samples lacking VM were positively correlated with non-metastasis ( $P=0.035$ ). Patients with VM positive tumors tended to have decreased overall survival (OS) compared to those with VM negative samples (43.9 vs. 64.6 months,  $P=0.079$ ). In addition, recombinant CHI3L1 enhanced cervical cancer cell lines to form tube-like structures, supporting the notion that CHI3L1 mediates VM in cervical cancer. Our present data reveals the crucial role of CHI3L1 in the formation of VM, which may contribute to tumor aggressiveness. Therefore, targeting CHI3L1 may be a valuable strategy for the reduction of cervical cancer vascularization and metastasis.

<b>Keywords</b>	YKL-40; vasculogenic mimicry; angiogenesis; dual staining
<b>Taxonomy</b>	Oncology Pathology, Molecular Pathology
<b>Corresponding Author</b>	Temduang Limpaboon
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Khon Kaen University
<b>Order of Authors</b>	Nipaporn Ngernyung, Rong Shao, Komsun Suwannarurk, Temduang Limpaboon

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

Cover letter\_Pathology.docx [Cover Letter]

VM-CHI3L1\_Pathology\_NN300517.docx [Manuscript File]

Fig 1.tif [Figure]

Fig 2.tif [Figure]

Fig 3.tif [Figure]

Fig 4.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.



**Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories  
Faculty of Associated Medical Sciences  
Khon Kaen University  
Khon Kaen 40002, Thailand  
Tel: 66-43-202088; Fax: 66-43-202088**

May 30, 2017

Dear Editor in Chief,

Please find enclosed the manuscript entitled "Chitinase 3 like 1 promotes vasculogenic mimicry formation in cervical cancer" by Ngernyuang et al. for consideration for publication in Pathology.

This study aimed to explore a pathologic role of Chitinase-3-like-1 (CHI3L1) in tumor cell-mediated vascularization in cervical cancer. We found that CHI3L1 expression was significantly correlated with formation of tumor cell-associated vascular channels in the absence of endothelial cells. Moreover, recombinant CHI3L1 enhanced cervical cancer cell lines to form tube-like structures, supporting the notion that CHI3L1 mediates VM in cervical cancer. Our present study demonstrated the crucial role of CHI3L1 in the formation of VM, which may contribute to tumor aggressiveness, by which targeting CHI3L1 may be a valuable strategy for the reduction of cervical cancer vascularization and metastasis.

All authors have substantially contributed to this study. We have approved the manuscript and agreed for the submission. This paper is an original research which has not been previously published in whole or in part. It is not under consideration for publication elsewhere. All authors declare no conflicts of interest.

We believe that this paper will be interesting for the readers of Pathology and look forward to your review.

Yours sincerely,

Prof. Temduang Limpai boon, Ph.D.

Corresponding author

# **Chitinase 3 like 1 promotes vasculogenic mimicry formation in cervical cancer**

NIPAPORN NGERNYUANG<sup>1</sup>, RONG SHAO<sup>2</sup>, KOMSUN SUWANNARURK<sup>3</sup> AND  
TEMDUANG LIMPAIBOON<sup>4</sup>

*<sup>1</sup>Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus,  
Pathum Thani 12120, Thailand*

*<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine,  
Shanghai 200025, China*

*<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Thammasat University,  
Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand*

*<sup>4</sup>Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of  
Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

**Corresponding author:** Prof. Temduang Limpaiboon, Centre for Research and  
Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences,  
Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. E-mail: [temduang@kku.ac.th](mailto:temduang@kku.ac.th)  
Tel/Fax: +66-43-202088

**Running Title:** CHI3L1 promotes VM in cervical cancer

## Summary

Vasculogenic mimicry (VM) is an alternative microvascular system which tumor cells orchestrate, independent of endothelial cell-mediated angiogenesis. VM develops tumor vascular networks that correlate with tumor growth, metastasis, and short survival time of patients with a number of cancers. However, little is known regarding VM in the vascularization of cervical cancer. Chitinase 3 like 1 (CHI3L1) was previously reported to display the ability to induce angiogenesis in cervical cancer. Here, we explored a pathologic role of CHI3L1 in tumor cell-mediated vascularization. Sixty-six samples of cervical cancer were collected to examine CHI3L1 expression and VM formation using immunohistochemistry and CD34-Periodic acid-schiff (PAS) dual staining. CHI3L1 expression was correlated with formation of tumor cell-associated vascular channels in the absence of endothelial cells ( $P=0.031$ ). Interestingly, tumor samples lacking VM were positively correlated with non-metastasis ( $P=0.035$ ). Patients with VM positive tumors tended to have decreased overall survival (OS) compared to those with VM negative samples (43.9 vs. 64.6 months,  $P=0.079$ ). In addition, recombinant CHI3L1 enhanced cervical cancer cell lines to form tube-like structures, supporting the notion that CHI3L1 mediates VM in cervical cancer. Our present data reveals the crucial role of CHI3L1 in the formation of VM, which may contribute to tumor aggressiveness. Therefore, targeting CHI3L1 may be a valuable strategy for the reduction of cervical cancer vascularization and metastasis.

*Key words:* YKL-40; vasculogenic mimicry; angiogenesis; dual staining

## INTRODUCTION

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women and is diagnosed in nearly 530,000 women globally each year.<sup>1</sup> In 2017, an estimated 12,820 new cases of invasive cervical cancer are diagnosed in U.S.,<sup>2</sup> in which a high risk of infection with human papillomavirus (HPV) is the leading cause of carcinogenesis.<sup>3</sup> Over the past several decades, accumulating evidence has revealed that highly metastatic cancers are intimately associated with vessel-like formation that is primarily derived from tumor cells, independent of endothelial cell-mediated angiogenesis. This alternative microvascular formation lacking endothelial cells is known as vasculogenic mimicry (VM). It is emerging that VM plays an essential pathologic role in a wide variety of human cancers.<sup>4-10</sup> The development of VM is strongly correlated with a poor prognosis in a number of cancers including hepatocellular carcinoma<sup>11</sup>, gastrointestinal stromal tumors<sup>12</sup> and glioma<sup>13</sup>. However, little is known regarding VM in the development of cervical cancer.

Chitinase 3 like 1 (CHI3L1), also known as YKL-40, is a secreted glycoprotein with molecular mass of approximately 40 kDa. CHI3L1 is related in amino acid sequence to the chitinase protein family but it lacks enzymatic property due to a mutation in the chitinase-3-like catalytic domain in which an essential glutamic acid is replaced with a leucine. CHI3L1 is mainly produced by macrophages, neutrophils and cancer cells.<sup>14</sup> High expression of CHI3L1 has been found in sera of patients with various diseases including inflammatory diseases,<sup>15-18</sup> and human solid tumors including cervical cancer.<sup>19-23</sup> Our previous study reported that CHI3L1 acts as an angiogenic factor in cervical cancer to promote endothelial cell migration and tube formation *in vitro*. Moreover, the expression of CHI3L1 was positively correlated with metastasis in cervical cancer patients.<sup>24</sup> However, it is unclear whether or not the elevated levels of CHI3L1 are associated with the formation of VM and cancer progression. To explore the potential role CHI3L1 in tumor vasculogenesis, we test

the hypothesis that CHI3L1 promotes the formation of tumor cell-mediated blood supply network, thereby contributing to the aggressiveness of cervical cancer.

Our present findings will provide novel pathologic insights into CHI3L1 active role in the microvasculogenesis of cervical cancer; thus defining a potential therapeutic target for cervical cancer therapy.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and tumor samples**

Cervical tissues were collected from patients who were treated at the Tumor Clinic, Srinagarind Hospital, Thailand. This project was approved by the Ethical Committee of Thammasat University (MTU-EC-OO-4-098/58). All the patients provided informed consents and did not receive chemotherapy or radiotherapy before operation. The histopathology of 66 tissue samples was reviewed and analyzed by pathologists. These cervical cancer samples were squamous cell carcinoma (SCCA) including 4 stage I, 21 stage II, 37 stage III and 4 stage VI. The clinical data involved age, tumor stage, metastasis, and overall survival time.

### **Immunohistochemistry (IHC) analysis**

In brief, 4  $\mu$ m thickness tissue sections were deparaffinized with xylene and rehydrated through a graded series of ethanol. The antigen retrieval was performed under the boiling cooker in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) for 15 min. After cooling down for 15 min at room temperature, the slides were incubated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min at room temperature to inactivate the endogenous peroxidase, followed by incubation with blocking buffer containing 20% fetal bovine serum (FBS) for 30 min. The slides were then incubated with primary antibodies (1:400, anti-CHI3L1) for 16 h at room temperature in a humidified

chamber. After washing in PBS, proteins were detected by immunodetection using the EnVision+ System - HRP labelled polymer anti-rabbit (DAKO corporation, Carpinteria, CA) for 15 min at room temperature. Finally, IHC staining was developed using 3,3'-diaminobenzidine DAB substrate (DAKO corporation) for several minutes. After washing, samples were counterstained with Meyer's hematoxylin. For reliability and consistency of the analysis, the slides were independently blind-reviewed by different pathologists. The CHI3L1 staining was evaluated as multiplied scores of percent (0–100%) and intensity of positive staining cells (0, negative; 1+, weakly positive; 2+, moderately positive; and 3+, strongly positive) giving rise the score ranging from 0 to 300.

#### **Determination of VM by CD34 - periodic acid-schiff (PAS) dual staining**

VM was detected by CD34-PAS dual staining. Briefly, the process for IHC of CD34 was performed as mentioned previously<sup>7</sup>, the dilution 1:100 of anti-CD34 (BD Pharmingen, San Diego, CA) was used as a primary antibody at 4°C for 16 h in a humidified chamber, followed by immunodetection using the EnVision+ System - HRP labelled polymer anti-mouse (DAKO corporation, Carpinteria, CA) for 15 min at room temperature. Subsequently, the slides were rinsed with distilled water for 5 min, incubated with PAS for 15 min, counterstained with Mayer's hematoxylin for 1 min, and viewed under a light microscope to detect CD34 and PAS signals. All areas of the slides were examined for the presence of VM (CD34-negative and PAS-positive vessels).

#### **Cell culture**

Cervical cancer cell lines (CaSki, HeLa and SiHa) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high-glucose (DMEM-HG) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin/Streptomycin (all from Gibco, Carlsbad, CA) in a humidified



atmosphere of 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) at 37°C. Cells were passaged when they reached 80% confluence.

### **Tube-like structure formation assay**

The ability of cervical cancer cell lines to develop vascular channels was evaluated by a tube-like structure formation assay. The 50 µl of growth factor-reduced Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA) was added to each well of a 96-well plate and allowed to polymerize at 37 °C for 30 min. Cervical cancer cells (1 x 10<sup>4</sup> cells) were suspended in the DMEM-HG with or without CHI3L1 (400 ng/ml)<sup>24</sup> and seeded on a 96-well plate coated with Matrigel. After 6-hr incubation, the number of tube-like structures of each group was assessed at least for 6 different fields under the light microscope with 200x magnification.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with SPSS version 20. The relationship of VM formation with the clinicopathological parameters was analyzed using two-tailed Chi-square test and Kappa test. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier and log rank test. Students't-test was used to analyze between treated and untreated control groups. *P* value < 0.05 was statistically significant.

## **RESULTS**

### **CHI3L1 expression is associated with VM in cervical cancer patients**

To evaluate the potential relationship between CHI3L1 expression levels and VM formation, expression of CHI3L1 and tumor cell-mediated vascular tissue were determined in 66 cervical cancer cases. Using CD34-PAS double-staining (Fig. 1), VM was distinguished by channels lined with cancer cells from shuttle-like endothelial cell-associated vessels that

express CD34.<sup>25</sup> These vascular channels showed PAS-positive but CD34-negative structure, in which a large amount of blood cells were identified, confirming that cells around the channels were not composed of endothelium. No necrotic and infiltrating inflammatory cells were observed around the channels. VM was detected in 15 cases out of 66 cervical cancer cases (22.72%) whereas endothelial cell-associated angiogenesis was present in all of the cases, indicating a large subset of cervical cancer that develops tumor cell-associated vascular channels. Next, to evaluate the relationship between the VM-positive tissue and CHI3L1 expression, 66 cervical cancer cases were categorized into 2 groups based on a cut-off value of the median of CHI3L1 immunoreactive scores (126).<sup>24</sup> Cancer samples with VM positive expressed higher CHI3L1 than those with VM negative ( $P = 0.031$ ) (Fig. 2), suggesting that VM formation correlated with CHI3L1 expression in cervical cancer patients.

### **Association of VM with clinicopathological features of cervical cancer patients**

The clinicopathological features of 66 cervical cancer patients related to VM were summarized in Table 1. The VM negative was significantly correlated with non-metastasis status in cervical cancer patients ( $P = 0.035$ ), implicating VM formation as an indicator of tumor progression and metastasis. Moreover, survival analysis revealed that patients with VM positive tended to have short overall survival (OS) compared to those with VM negative (43.9 vs. 64.6 months,  $P = 0.079$ ) (Fig. 3). No significant correlations were found between VM formation and age or tumor stage.

### **Recombinant CHI3L1 protein promotes tube-like structure formation of cervical cancer cell lines**

The clinical data indicated that VM formation was associated with CHI3L1 expression. To address whether CHI3L1 plays a key role in VM formation, a tube-like structure formation

assay was performed in cervical cancer cell lines (CaSki, HeLa, and SiHa). We found that recombinant CHI3L1 enhanced cervical cancer cells to form more tube-like structures when compared to controls ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 4). Taken together, all the data suggest that CHI3L1 prompts tumor cells to participate in the development of vascular channels in cervical cancer.

## DISCUSSION

Cervical cancer is the most common cancer that causes woman death worldwide.<sup>1</sup> Although the radiotherapy and radical surgery are equally effective for early stage disease and give rise to a favorable outcome with 5-year survival rate over 90%<sup>26</sup>, the combination regimen of chemo-radiotherapy used for advanced disease is only effective in 40% of patients who can survive longer than 5 years.<sup>27</sup> A vast majority of advanced diseases eventually develop progressive, recurrent tumors or distant metastases.<sup>28</sup> It is noteworthy that patients initially diagnosed with metastatic disease have poorer outcomes with a 5-year survival rate of 16.5%.<sup>29</sup> At present, chemotherapy with cisplatin or carboplatin is recommended for these patients as the standard course, whereas non-platinum regimens including paclitaxel and topotecan are alternative for patients who cannot tolerate cisplatin.<sup>30-31</sup>

To gain highly effective intervention in metastatic diseases, the conjunctive treatment of cytotoxic drugs with anti-angiogenic agents has received significant attention as compared with monotherapy.<sup>32</sup> For example, the combination of chemotherapy and VEGF inhibitor bevacizumab compared with chemotherapy alone showed a significant improvement in overall response rate (ORR), progression free survival (PFS), and OS.<sup>33</sup> While the combined therapy demonstrated the advantage over the single therapy, some of patients could still not receive notable benefit from the intervention, since advanced cancers can escape from VEGF inhibition and thus develop resistance to bevacizumab. The molecular mechanisms that mediate anti-VEGF-drug resistance were probably ascribed to the alternative tumor

vascularization such as VM.<sup>34-35</sup> A study in 2013 by Steeg<sup>36</sup> has reported that VM poses a major challenge to anti-angiogenesis treatment in hepatocellular carcinoma (HCC), where some of anti-angiogenesis drugs have showed minimal effectiveness in the treatment of HCC.<sup>36</sup> Therefore, targeting both angiogenic and VM pathways may pave a novel therapeutic avenue to effectively block tumor vasculogenesis and metastasis.

Here, we demonstrated the correlation of CHI3L1 expression and VM formation in human cervical cancer. Moreover, we uncovered the critical role of CHI3L1 on VM formation *in vitro*, which was consistent with the study in glioblastoma and other cancers.<sup>37</sup> In addition, previous studies reported that VM contributes to metastasis of multiple cancers, including hepatocellular carcinoma<sup>38</sup>, laryngeal squamous cell carcinoma<sup>39</sup>, and colon cancer.<sup>25</sup> We found that VM negative had strong correlation with non-metastasis status. Although increased cancers are needed to probably gain significant difference in survival time and cancer metastasis, our finding suggests that cervical cancer patients with VM positive have a tendency of poor prognosis compared to those with VM negative. Collectively, the current data suggest that the increased CHI3L1 expression mediates VM formation, thereby facilitating cancer aggressiveness and metastasis.

In conclusion, our findings have shown the first time that CHI3L1 expression was associated with VM formation in cervical cancer, in addition to angiogenesis.<sup>24</sup> The study might suggest a feasible therapeutic strategy for targeting CHI3L1 expression in cervical cancer with both classic angiogenesis and VM formation.

**Conflicts of interest and sources of funding:** This project was financially supported by Thailand Research Fund (TRF) under TRF Grant for New Researcher, Contract No. TRG5880156 and Thammasat University Research Fund under the TU Research Scholar, Contract No. 2/47/2558. All authors declare they have no conflicts of interest to disclose.

## References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359-86.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 7-30.
3. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361: 2217-25.
4. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-52.
5. Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 2002; 50: 189-201.
6. Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, et al. Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 136-9.
7. Yue WY, Chen ZP. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histo Cyto* 2005; 53: 997–1002.
8. Su M, Feng YJ, Yao LQ, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18: 476-86.
9. Jiang J, Liu W, Guo X, et al. IRX1 influences peritoneal spreading and metastasis via inhibiting BDKRB2-dependent neovascularization on gastric cancer. *Oncogene* 2011; 30: 4498-508.
10. Francescone R, Scully S, Bentley B, et al. Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *J Biol Chem* 2012; 287: 24821-31.

11. Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, et al. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1776–81.
12. Sun B, Qie S, Zhang S, et al. Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2008; 39: 444–51.
13. Liu XM, Zhang QP, Mu YG, et al. Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *J Neuro Oncol* 2011; 105: 173-9.
14. Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, et al. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 194-202.
15. Bernardi D, Podswiadek M, Zaninotto M, et al. YKL-40 as a marker of joint involvement in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2003; 49: 1685-8.
16. Johansen JS, Milman N, Hansen M, et al. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis-a potential marker of disease activity? *Respir Med* 2005; 99: 396-402.
17. Nordenbaek C, Johansen JS, Halberg P, et al. High serum levels of YKL-40 in patients with systemic sclerosis are associated with pulmonary involvement. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 293-7.
18. Lebensztejn DM, Skiba E, Werpachowska I, et al. Serum level of YKL-40 does not predict advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Adv Med Sci* 2007; 52: 120-4.
19. Dehn H, Høgdall EV, Johansen JS, et al. Plasma YKL-40, as a prognostic tumor marker in recurrent ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 287-93.
20. Dupont J, Tanwar MK, Thaler HT, et al. Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3330-9.

21. Jensen BV, Johansen JS, Price PA. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4423-34.
22. Johansen JS, Drivsholm L, Price PA, et al. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer* 2004; 46: 333-40.
23. Mitsuhashi A, Matsui H, Usui H, et al. Serum YKL-40 as a marker for cervical adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2009; 20: 71-7.
24. Ngernyuang N, Francescone RA, Jearanaikoon P, et al. Chitinase 3 like 1 is associated with tumor angiogenesis in cervical cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 51: 45-52.
25. Qi L, Song W, Liu Z, et al. Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 18564-79.
26. Landoni F, Maneo A, Colombo A, et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 1997; 350: 535- 40.
27. Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, et al. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26<sup>th</sup> annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 95: S43-103.
28. Ana O, Victor RF. Bevacizumab in the treatment of cervical cancer – current evidence and next steps. *Eur Oncol Haematol* 2016; 12: 32–43.
29. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1374-403.
30. Colombo N, Carinelli S, Colombo A, et al. Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012; 23: vii27-32.

31. Monk BJ, Sill MW, McMeekin DS, et al. Phase III trial of four cisplatin-containing doublet combinations in stage IVB, recurrent, or persistent cervical carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4649–55.
32. Yu S, Garcia AA. Advancements in recurrent and metastatic cervical cancer. *Am J Hematol Oncol* 2015; 11: 26-31.
33. Tewari KS, Sill MW, Long III HJ, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 2014; 370: 734-43.
34. van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1473–7.
35. Dunleavy JM, Dudley AC. Vascular mimicry: concepts and implications for anti-angiogenic therapy. *Curr Angiogenes* 2012; 1: 133–8.
36. Steeg PS. Angiogenesis inhibitors: motivators of metastasis? *Nat Med* 2003; 9: 822-3.
37. Shao R, Taylor SL, Oh DS, et al. Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization. *Oncotarget* 2015; 6: 40507-18.
38. Sun B, Zhang S, Zhang D, et al. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 4: 693-8.
39. Wang W, Lin P, Han C, et al. Vasculogenic mimicry contributes to lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 60.

## Figure captions

### Fig. 1

VM formation in cervical cancer tissue samples. (A) CD34<sup>+</sup> blood vessels (red arrow indicates typical blood vessels with brown CD34<sup>+</sup> staining; green arrow indicates red blood



cells). (B-D) VM formation in cervical cancer tissue (red arrows indicate typical blood vessels with brown CD34<sup>+</sup> staining; green arrows indicate red blood cells and black arrows indicate VM channels formed by tumor cells).

### **Fig. 2**

VM formation was positively correlated with CHI3L1 expression level in cervical cancer tissues. (A) Representative images of CHI3L1 immunostaining (left) and VM formation in cervical cancer tissue (right) (magnification:  $\times 400$ ). (B) The scatter plot showed that patients with VM positive had higher expression level of CHI3L1 than those with VM negative ( $P=0.031$ ). Horizontal black bars indicate mean of expression level. Horizontal black bars indicate mean of expression level. VM negative (n=51) vs. VM positive (n=15).

### **Fig. 3**

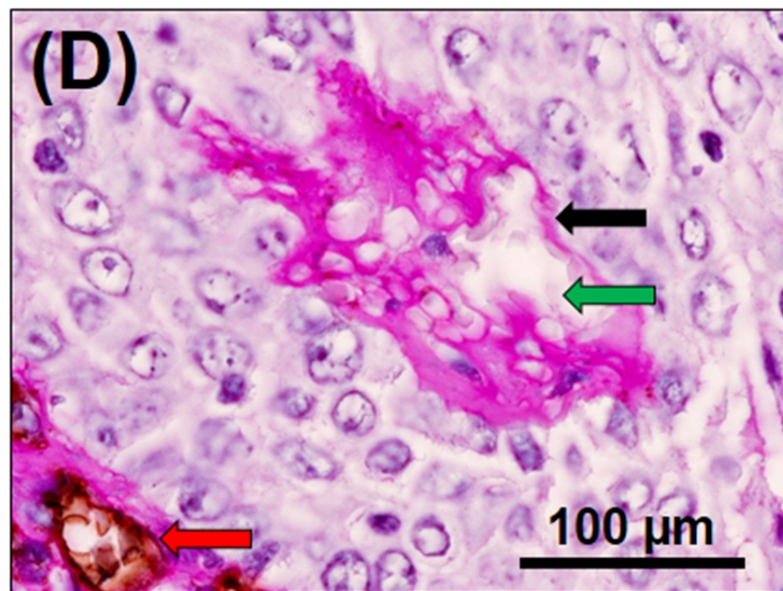
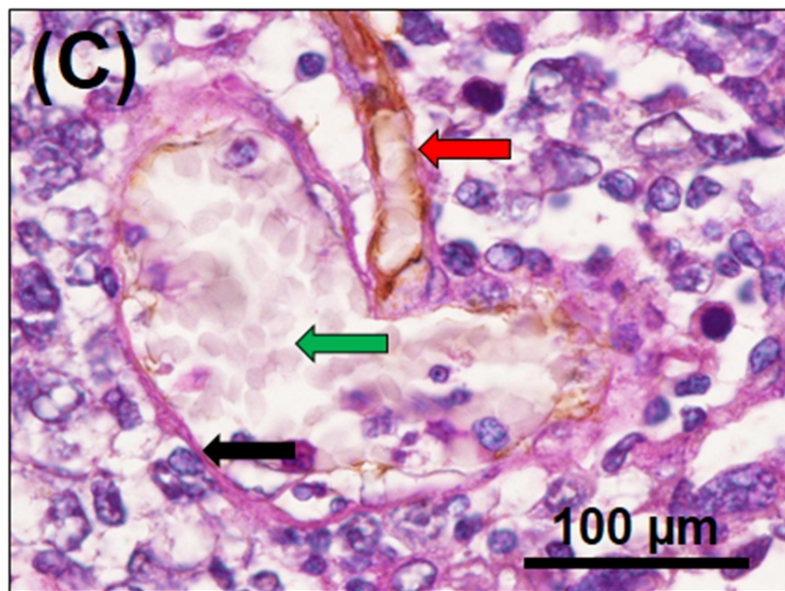
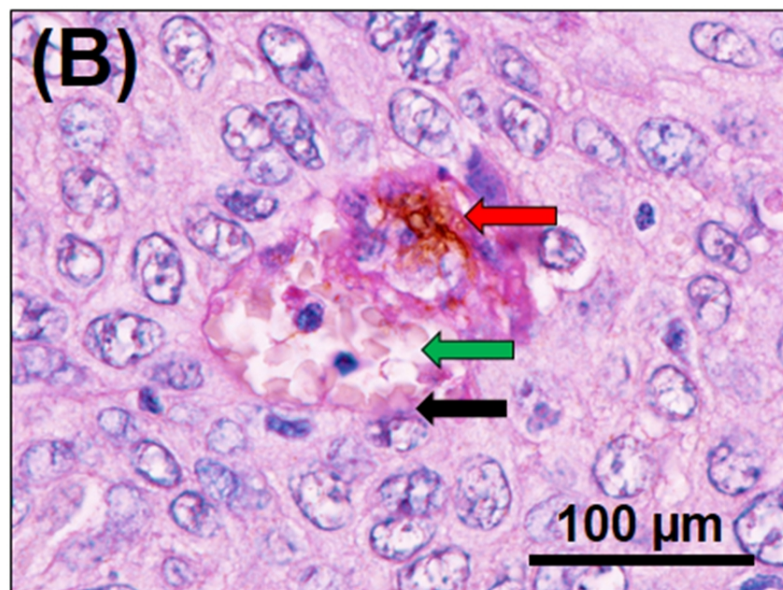
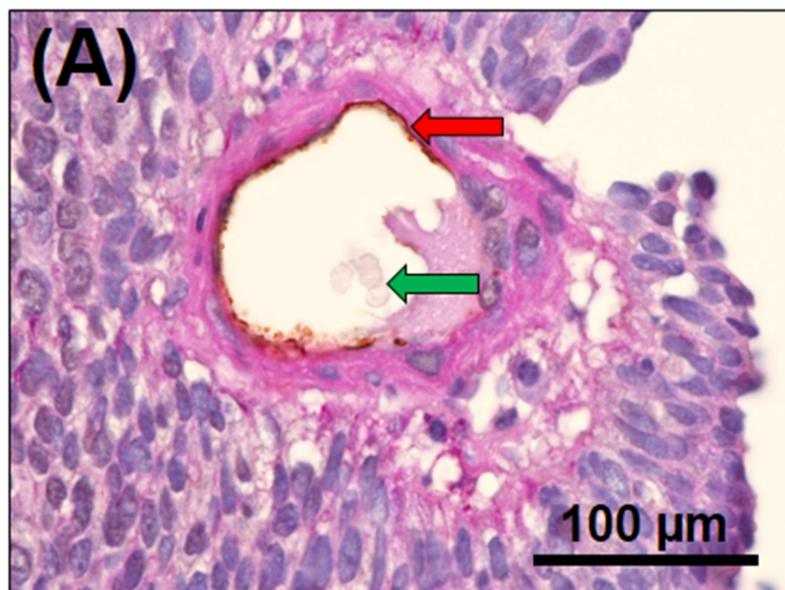
Effect of VM formation on patients' overall survival. Patients with VM positive tended to have short overall survival when compared to those with VM negative ( $P=0.079$ ). VM negative (n=51) vs. VM positive (n=15).

### **Fig. 4**

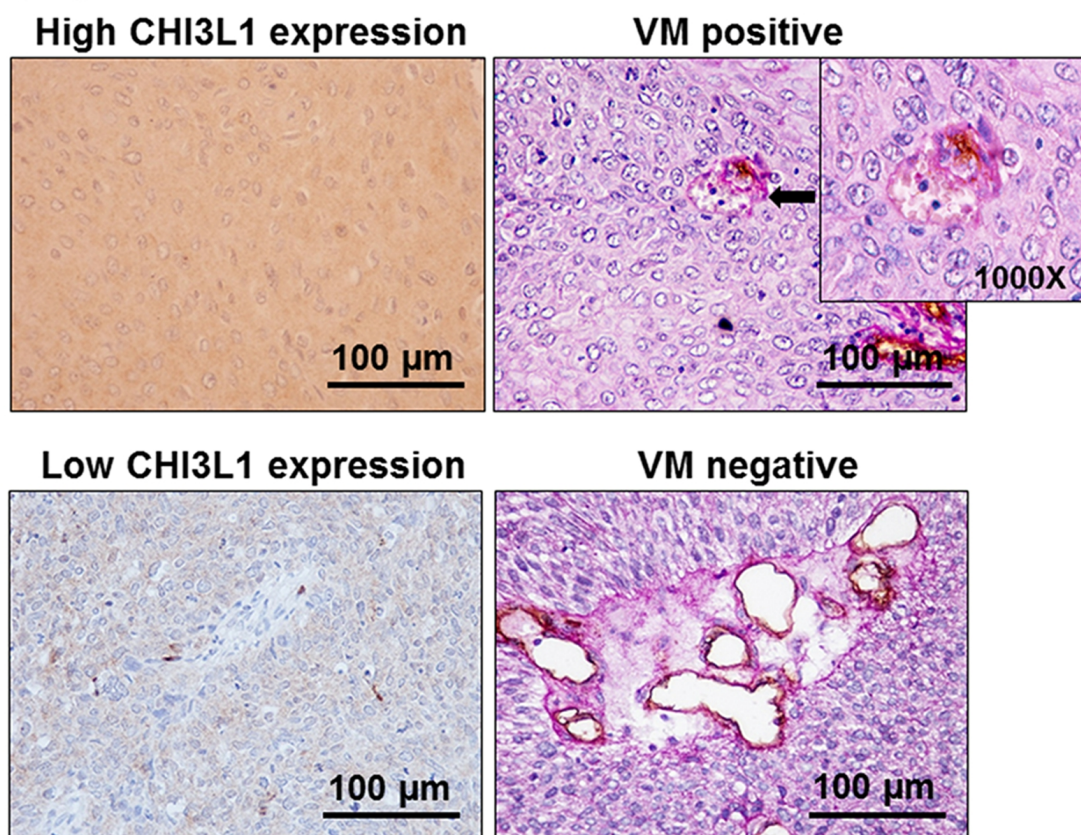
Effect of recombinant CHI3L1 on VM formation in cervical cancer cell lines. Cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded on a layer of Matrigel and cultured in the presence or absence of CHI3L1 (400 ng/ml) for tube formation analysis. The recombinant CHI3L1 protein (400 ng/ml) significantly enhanced cervical cancer cells to form vessel-like structures. The representative pictures (left) and quantification mean numbers (right) of tube-forming structures.  $*P < 0.05$  compared with the control group. (SF, Serum-free medium). n=6.

**Table 1.** Relationship between clinicopathological variables and VM formation.

<b>Variables</b>	<b>Cases (n)</b>	<b>VM formation</b>		<b>P</b>
		<b>Negative (%)</b>	<b>Positive (%)</b>	
<b>Age (years)</b>				0.142
≤54	33	23 (69.7)	10 (30.3)	
>54	33	28 (84.8)	5 (15.2)	
<b>FIGO stage</b>				0.263
Stage I	4	4 (100.0)	0 (0.0)	
Stage II	21	16 (76.2)	5 (23.8)	
Stage III	37	29 (78.4)	8 (21.6)	
Stage IV	4	2 (50.0)	2 (50.0)	
<b>Metastasis</b>				*0.035
Negative	49	41 (83.7)	8 (16.3)	
Positive	17	10 (58.8)	7 (41.2)	
<b>Mean OS time</b>	66	64.599	43.900	0.079
<b>(months)</b>		(52.316-76.881)	(25.072-62.728)	





**(A)****(B)**