



รายงานการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกและการกระจายตัวของ
Integrin Glycoproteins ในมะเร็งท่อน้ำดี
Determination of the Expression and Distribution of
Integrin Glycoproteins in Cholangiocarcinoma

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

นางสาวนงนิตย์ อีระวัฒนสุข

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้วิจัยร่วม

นางบังอร ศรีพานิชกุลชัย

นางชุดินันท์ ประสิทธิ์อุริปริษา

นางวิจิตร เกิดผล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2543

รหัสโครงการ : 03010361-0001

ISBN 974-609-116-6

| | |
|---------------------|--|
| ชื่อโครงการวิจัย | การศึกษาการแสดงออกและการกระจายตัวของ Integrin Glycoproteins ในมะเร็งท่อน้ำดี |
| หัวหน้าโครงการวิจัย | นางสาวณงนิตย์ ชีระวัฒนสุข |
| ผู้ร่วมโครงการวิจัย | นางบังอร ศรีพานิชกุลชัย นางชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา นางวิจิตร เกิดผล |
| หน่วยงาน | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| ปีงบประมาณ | 2543 |
| งบประมาณที่ได้รับ | 230,000.- บาท |
| คำสำคัญ | integrins, cholangiocarcinoma, cancer |

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์สูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการรักษาโรคนี้นี้คือ ผู้ป่วยมักได้รับการวินิจฉัยโรคล่าช้า เนื่องจากยังไม่มีตัวติดตามชีวภาพซึ่งมีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยโรค จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า integrins ซึ่งเป็น cell adhesion molecules มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็ง โปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกในเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ แตกต่างกันไป ความรู้เกี่ยวกับแบบแผนการแสดงออกที่จำเพาะของ integrins อาจมีประโยชน์ในการวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งต่างๆ ได้ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ integrins 6 ชนิด คือ α_1 , α_v , α_6 , β_1 , β_3 , และ β_4 ในมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติและศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นตัวติดตามเพื่อวินิจฉัยโรค การศึกษาทำโดยแยก total RNA จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติที่ได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 ราย ซึ่งได้รับการผ่าตัดรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นนำ total RNA มาทำปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อตรวจวิเคราะห์หา RT-PCR products โดย agarose gel electrophoresis พบ integrins α_1 , α_v , และ β_1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยเกือบทุกราย ในขณะที่พบ integrin β_4 เฉพาะในเนื้อเยื่อมะเร็ง (33.3%) สำหรับ integrin α_6 นั้นพบในเนื้อเยื่อมะเร็งบางราย (33.3%) และพบในเนื้อเยื่อตับในจำนวนที่น้อยกว่า (16.7%) ส่วน integrin β_3 พบน้อยมากในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด (25%) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งรายงานว่า integrin β_4 มีการแสดงออกเฉพาะในเยื่อบุท่อน้ำดีและมะเร็งท่อน้ำดีแต่ไม่พบในเนื้อเยื่อตับ อย่างไรก็ตามการตรวจพบ integrin α_1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติแทบทุกรายนั้นขัดแย้งกับที่เคยมีผู้รายงานว่าไม่พบ integrin ชนิดนี้ในเยื่อบุท่อน้ำดีและมะเร็งท่อน้ำดี แต่พบในเนื้อเยื่อของตับและ hepatocarcinoma การตรวจพบ integrin α_1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่นำมาศึกษานี้ อาจเกิดจากการที่มีเนื้อเยื่อตับปนเปื้อนมากับตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งด้วย โดยสรุปผลการวิจัยครั้งนี้พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับมีการแสดงออกของ integrins บางชนิดแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้อาจมีประโยชน์ในการเป็นเครื่องมือช่วยวินิจฉัยโรคได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยจำนวนมากเพื่อประเมินความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนี้ และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกในอนาคต

| | |
|-----------------|--|
| Project name | Determination of the Expression and Distribution of Integrin Glycoproteins in Cholangiocarcinoma |
| Head of Project | Nongnit Teerawatanasuk |
| Co-researchers | Bung-orn Sripanidkulchai Chutinan Prasitpuriprecha Wichit Kirdpon |
| Institution | Faculty of Pharmaceutical sciences, Ubonratchathani University |
| Fiscal Year | 1999 (230,000.- Bath) |
| Keywords | integrins, cholangiocarcinoma, cancer |

Abstract

Cholangiocarcinoma (CHCA), a malignant tumor of biliary epithelium, is highly prevalence in northeast Thailand. Definitive diagnosis is often delayed, due partly to a lack of a specific biological marker. Prior studies have demonstrated the important role of integrins, a family of cell adhesion molecules, in carcinogenesis. These proteins are differentially expressed in various cells and tissues. An understanding on the expression profile of integrins could be of important in cancer diagnosis and treatment. This project is aimed to study the expressions of six integrins; α_1 , α_v , α_6 , β_1 , β_3 , and β_4 , in CHCA and normal liver tissue, and determine whether they could be used as specific markers for this cancer. CHCA and liver tissues were obtained from 12 patients who were admitted for surgical treatment in Srinagarind Hospital, Khon Kaen University. Total RNAs were isolated and subjected to RT-PCR. Analyses of the RT-PCR products by agarose gel electrophoresis revealed a high expression level of integrins α_1 , α_v , and β_1 in most CHCA and liver tissues, whereas integrin β_4 was detected only in CHCA (33.3%). Integrin α_6 was detected in a small number of CHCA (33.3%) and lesser in liver tissue (16.7%). The expression of integrin β_3 was similary low in both tissue types (25%). Altogether, our findings are partly in consistent with prior studies which have reported the exclusive expression of integrin β_4 in biliary epithelium and CHCA. However, the finding on integrin α_1 is contradicted to prior studies. While it has previously shown to express exclusively in liver tissues and hepatocarcinoma, it was highly expressed in both tissue types in this study. We suspect that the detection of integrin α_1 in our CHCA samples could be due to a contamination of hepatocytes surrounding the biliary tumors while surgically removed. In conclusion, we found a significant differential expression of some integrins in CHCA and liver tissue of hepatocytes origin. This specific pattern could be used as a tool to assist the diagnosis of this disease. Further investigation in a larger number of patients should be conducted in order to determine the sensitivity and specificity of this tool, and to provide additional information for clinical applications.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยการวิจัยครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ได้โดยความช่วยเหลือของบุคคลหลายท่าน คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ชาลิต ไพโรจน์กุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตลอดจนให้ข้อมูลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา และขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้และอนุญาตให้ใช้สถานที่และเครื่องมือ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการร่วมกับวิทยานิพนธ์ของนางสาวดวงฤดี อินทร์วงศ์ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยซึ่งได้รับการผ่าตัดรักษามะเร็งท่อน้ำดี ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทั้งนี้การดำเนินวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณผู้ป่วยซึ่งได้อุทิศเนื้อเยื่อเพื่อการศึกษาครั้งนี้และขอบคุณนางสาวดวงฤดี อินทร์วงศ์ ที่มีส่วนร่วมอย่างสำคัญในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยครั้งนี้ จักเป็นประโยชน์ในทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และการศึกษาวิจัยด้านโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2545

สารบัญ

| | หน้า |
|---|-------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ข |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ค |
| สารบัญ..... | ง |
| สารบัญตาราง..... | จ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... | 1-2 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย..... | 2 |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม | |
| 2.1 มะเร็งท่อน้ำดี..... | 3-5 |
| 2.2 Integrins : โครงสร้างและบทบาทหน้าที่..... | 5-8 |
| 2.3 บทบาทของ Integrins ในโรคมะเร็ง..... | 8-10 |
| 2.4 การแสดงออกของ Integrins ในมะเร็งท่อน้ำดี..... | 10-11 |
| และมะเร็งตับ | |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย | |
| 3.1 การเก็บเนื้อเยื่อจากผู้ป่วย..... | 12 |
| 3.2 การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณ Integrin mRNAs..... | 13-19 |
| โดยวิธี RT-PCR | |
| 3.3 การตรวจวิเคราะห์หาชนิด Integrin proteins..... | 19-25 |
| โดย Western blot analysis | |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | |
| 4.1 ข้อมูลผู้ป่วย..... | 26-28 |
| 4.2 แบบแผนการแสดงออกของ integrins..... | 28-36 |
| ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี | |
| 4.3 การศึกษาโดย Western blot analysis..... | 36-37 |

| | |
|---|-------|
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... | 38-40 |
| บรรณานุกรม..... | 41-43 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก ลำดับเบสของ human integrin oligonucleotide primers..... | 44 |
| ภาคผนวก ข สารละลายและบัฟเฟอร์..... | 45-47 |
| ประวัตินักวิจัย..... | 48-54 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 2.1 การกระจายตัวของ integrins ในเนื้อเยื่อและชนิดของ.....6 extracellular matrix proteins ที่จับกับ integrins | |
| ตารางที่ 2.2 แบบแผนการแสดงออกของ integrins ในมะเร็งชนิดต่าง ๆ.....9 | |
| ตารางที่ 4.1 ข้อมูลผู้ป่วยรายบุคคล.....26 | |
| ตารางที่ 4.2 สรุปข้อมูลทั่วไปและข้อมูลด้านโรคของผู้ป่วย27 | |
| ตารางที่ 4.3 สรุปผล RT-PCR ในผู้ป่วยแต่ละรายเปรียบเทียบ.....31 เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติ | |
| ตารางที่ 4.4 การแสดงออกของ Integrins แต่ละชนิดเปรียบเทียบ.....32 เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติ | |

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 2.1 ตำแหน่งท่อทางเดินน้ำดีและการจัดจำแนกชนิดมะเร็งท่อน้ำดี..... | 3 |
| รูปที่ 2.2 Focal adhesion point และ integrin signaling..... | 7 |
| รูปที่ 2.3 Integrin-protein interactions at the focal adhesion point..... | 8 |
| รูปที่ 4.1 การตรวจสอบ total RNA integrity..... | 29 |
| รูปที่ 4.2 ผล RT-PCR ของ Integrin α_1 | 32 |
| รูปที่ 4.3 ผล RT-PCR ของ Integrin α_5 | 33 |
| รูปที่ 4.4 ผล RT-PCR ของ Integrin α_6 | 34 |
| รูปที่ 4.5 ผล RT-PCR ของ Integrin β_1 | 34 |
| รูปที่ 4.6 ผล RT-PCR ของ Integrin β_3 | 35 |
| รูปที่ 4.7 ผล RT-PCR ของ Integrin β_4 | 36 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CHCA) เป็นมะเร็งซึ่งมีกำเนิดจากเยื่อบุท่อนทางเดินน้ำดี (biliary ducts) ซึ่งเป็นท่อนำน้ำดีจากตับมาสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นเพื่อช่วยในการย่อยอาหาร ในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และไทย มะเร็งท่อน้ำดีจัดเป็นมะเร็งของตับที่มีอุบัติการณ์สูงรองลงมาจาก hepatocellular carcinoma สำหรับในประเทศไทยพบว่าประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าภาคอื่นของประเทศ คือ 135.4 และ 43.8 ต่อประชากร 100,000 คน ในชายและหญิงตามลำดับ (Green et al. 1991) การศึกษาทางระบาดวิทยาในกลุ่มประชากรซึ่งมีภูมิสำเนาในจังหวัดขอนแก่น พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งชนิดชนิดที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในเพศชายและหญิง (Vatanasapt et al. 1990)

ปัญหาในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี คือการวินิจฉัยโรคค่อนข้างล่าช้า มักตรวจพบเมื่อโรคดำเนินไปมากและมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ แล้ว ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้องตั้งแต่ระยะแรกของโรค (early stage) มีจำนวนไม่ถึงร้อยละ 20 ในบางครั้งการวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งท่อน้ำดีออกจากมะเร็งตับชนิดอื่นไม่สามารถทำได้โดยการข้อมสึเนื้อเยื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแม้ว่าจะได้มีความพยายามในการนำ immunohistochemical markers หลายชนิดมาใช้ช่วยวินิจฉัยโรค เช่น cancer antigen (CA 19-9), cytokeratins (CK), carcinoembryonic antigen (CEA), α -fetoprotein (AFP), และ α -1-antitrypsin (Hurlimann and Gardiol 1991, Brumm et al. 1989, de Groen et al. 1999) แต่ tumor markers เหล่านี้มีความไวต่ำและไม่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี

Integrins เป็น cell surface receptors ซึ่งพบในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดแต่มีแบบแผนการแสดงออก (expression profile) ในเนื้อเยื่อต่างๆแตกต่างกันไป หน้าที่สำคัญของ integrins คือเป็น adhesion molecules กล่าวคือทำให้มีการยึดเกาะของ cells-matrix proteins และ cells-cells และนอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งต่อสัญญาณผ่านเข้า-ออกเซลล์ ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแน่ชัดแล้วว่า integrins มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตและการรุกรานแพร่กระจายของมะเร็ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์มะเร็งมักมีการแสดงออกของ integrins แตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติชนิดเดียวกันทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ การศึกษาให้ทราบถึงชนิดและบทบาทของ integrins ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งแต่ละชนิด จึงอาจมีประโยชน์ในการวินิจฉัยและรักษาโรค

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการกระจายตัวของ integrins 6 ชนิดในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติที่ได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน เพื่อวิเคราะห์แบบแผน

การแสดงผลที่จำเพาะของ integrins แต่ละชนิด และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็น tumor markers ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี

1.2 ประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกที่ระดับ mRNA ของ integrins 6 ชนิด คือ α_1 , α_3 , α_v , β_1 , β_3 , และ β_4 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติของคนโดยเทคนิค RT-PCR
- 1.2.2 เพื่อวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกที่ระดับโปรตีนของ integrins 6 ชนิด คือ α_1 , α_3 , α_v , β_1 , β_3 , และ β_4 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติของคนโดยเทคนิค Western blot analysis
- 1.2.3 เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำ integrins มาใช้เป็น tumor markers ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติ ซึ่งได้จากผู้ป่วยมาสกัดแยก total RNA และ proteins จากนั้นนำมาศึกษาการแสดงออกและการกระจายตัวของ Integrins โดยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Western blot analysis ตามลำดับ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1.4.1 เป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่สามารถประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยพยากรณ์โรค และติดตามผลการรักษาและมะเร็งท่อน้ำดี
- 1.4.2 เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยและพัฒนาการรักษามะเร็งท่อน้ำดี
- 1.4.3 เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

บทที่ 2

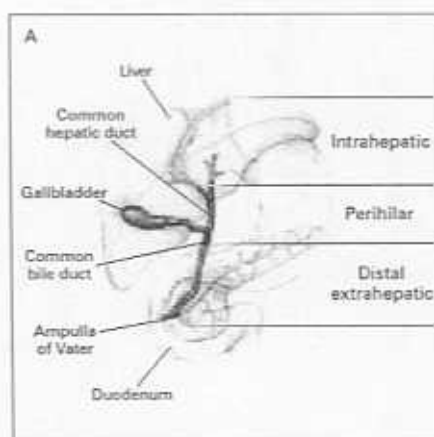
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma)

ท่อน้ำดีมีความยาวประมาณ 4-5 นิ้ว มีกำเนิดมาจากท่อทางไหลของน้ำดีขนาดเล็กจำนวนมากในเนื้อตับมารวมกันเป็นท่อใหญ่ท่อเดียว (hepatic duct) เมื่อออกจากตับ จะมีท่อจากถุงน้ำดี (cystic duct) มาเชื่อมรวมเข้าด้วยกันเป็น common bile duct ซึ่งไปสิ้นสุดที่ลำไส้เล็กส่วนต้น หน้าที่ของท่อน้ำดีคือการขนส่งน้ำดีไปยังลำไส้เล็กเพื่อช่วยในการย่อยอาหาร

มะเร็งท่อน้ำดีอาจเกิดที่ส่วนใดของท่อน้ำดีก็ได้ และมะเร็งที่ตำแหน่งต่างกันอาจมีอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยแตกต่างกันได้ โดยทั่วไปนิยมแบ่งมะเร็งท่อน้ำดีตามตำแหน่งที่เกิดได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ (รูปที่ 2.1) กลุ่มที่หนึ่งคือ Perihilar tumor หรือ Klatskin tumor เกิดที่ส่วน hepatic duct บริเวณที่ออกจากตับ พบถึงร้อยละ 60-80 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมด กลุ่มที่สองคือ Distal extrahepatic tumors เกิดที่ common bile duct ส่วนที่ใกล้กับลำไส้เล็ก พบประมาณร้อยละ 25 ของผู้ป่วย และกลุ่มที่สามคือ Intrahepatic bile duct cancer เกิดที่ท่อเล็ก ๆ ภายในเนื้อตับ พบประมาณร้อยละ 6 ของผู้ป่วย (Alden et al. 1995, Nakeeb et al. 1996)

รูปที่ 2.1 ตำแหน่งท่อทางเดินน้ำดีและการจัดจำแนกชนิดมะเร็งท่อน้ำดี (de Groen et al. 1999)



มากกว่าร้อยละ 95 ของมะเร็งท่อน้ำดีไม่ว่าจะเกิดที่ตำแหน่งใดของท่อ เป็นชนิด adenocarcinomas ซึ่งมีกำเนิดมาจากต่อมหลังเมือก (mucous gland) ของเยื่อบุท่อน้ำดี นอกจากนี้เป็นมะเร็งชนิด papillary carcinoma และ mucinous carcinoma (de Groen et al. 1999)

อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีอุบัติการณ์ประมาณ 2,000-3,000 รายต่อปี (Landis et al. 1998) สำหรับประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และไทย มีอุบัติการณ์สูงรองจาก hepatocarcinoma ในประเทศไทยอัตราการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูงสุดในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Vatanasapt 1990, Green et al. 1991)

ปัจจัยเสี่ยงส่งเสริมการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมีหลายประการ อาทิ การอักเสบเรื้อรังของท่อน้ำดี (cholangitis) นิ่วในท่อน้ำดี (intraductal gallstone) ลำไส้อักเสบเป็นแผลเรื้อรัง (ulcerative colitis) และการได้รับสารเคมีก่อมะเร็งเช่น nitrosamine, dioxin, polychlorinated biphenyls (PCBs) เป็นต้น ในประชากรไทยพบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) และการรับประทานอาหารที่มีสารก่อมะเร็ง dimethylnitrosamine เช่น ปลาร้า แหนม และส้มผัก เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญและส่งเสริมซึ่งกันและกัน (Pirojkul et al. 1991, Sithithaworn et al. 1994) สำหรับประเทศในเอเชียอื่นๆ เช่น จีน เกาหลี และญี่ปุ่น อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* การศึกษาทางระบาดวิทยาในประเทศเกาหลีรายงานว่า การติดเชื้อ *Clonorchis sinensis* ทำให้อัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีสูงขึ้นถึง 25-50 เท่า (Shin et al. 1996)

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุระหว่าง 50-70 ปี อาการและอาการแสดงของโรคที่พบบ่อยคือ ดีซ่าน คันตามตัว ปัสสาวะเป็นสีน้ำตาลเข้ม (cola-coloured urine) น้ำหนักลด มีไข้ และอาจมีอาการเจ็บบริเวณช่องท้องด้านบนขวา เนื่องจากอาการของผู้ป่วยไม่ค่อยมีความจำเพาะ ดังนั้นจึงมีผู้ป่วยเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่ได้รับการวินิจฉัยโรคถูกต้องตั้งแต่ระยะเริ่มแรก (early stage) ในปัจจุบัน tumor markers ที่ใช้ช่วยวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี คือ cancer antigen (CA 19-9), cytokeratins, carcinoembryonic antigen (CEA), และ mucin (de Groen et al. 1999) Tumor markers ที่นิยมตรวจกันแพร่หลายและมีความไวสูงสุดคือ serum CA 19-9 ซึ่งมีความไวราวร้อยละ 89 กล่าวคือผู้ป่วยประมาณร้อยละ 89 มีระดับ serum CA 19-9 เพิ่มขึ้นมากกว่า 100 unit/ml (ค่าปกติ ~ 40 unit/ml) (Nichols 1993) อย่างไรก็ตาม CA 19-9 ไม่ได้มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี แต่พบว่าสูงขึ้นในมะเร็งชนิดอื่นด้วย เช่น มะเร็งตับอ่อน และมะเร็งกระเพาะอาหาร ส่วน tumor markers ตัวอื่นนั้น มีความไวต่ำกว่า CA 19-9 และไม่มีมีความจำเพาะมากนักในการวินิจฉัยแยกโรค

วิธีการรักษาหลักสำหรับมะเร็งท่อน้ำดีคือการผ่าตัด และอาจใช้รังสีรักษาร่วมกับการผ่าตัด ในกรณีที่ไม่สามารถผ่าตัดก่อนมะเร็งออกได้หมด นอกจากนั้นมีการใช้เคมีบำบัดหลังการผ่าตัด เช่น fluorouracil, mitomycin, methotrexate, etoposide, doxorubicin, และ cisplatin แต่พบว่าเคมีบำบัดมิได้ช่วยให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวได้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีมาตรฐานมะเร็งที่มีประสิทธิภาพดีพอในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี โดยทั่วไป median survival ในผู้ป่วย intrahepatic cholangiocarcinoma ประมาณ 18-30 เดือน และในผู้ป่วย perihilar

cholangiocarcinoma ประมาณ 12-24 เดือน อัตราการรอดชีวิตภายใน 5 ปีของผู้ป่วยทั้งสอง กลุ่มราวร้อยละ 10-45 และอัตราการรอดชีวิตภายใน 5 ปีของผู้ป่วย distal extrahepatic cholangiocarcinoma เพียงร้อยละ 15-25 (de Groen et al. 1999)

2.2 Integrins : โครงสร้างและบทบาทหน้าที่ (Integrins : Structures and Functions)

Integrins เป็นไกลโคโปรตีนซึ่งพบบนผิวเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวจับ (receptor) ของ extracellular matrix proteins (ECM) เพื่อให้เกิดการยึดเกาะระหว่าง เซลล์-ECM และ เซลล์-เซลล์ การรักษารูปร่างโครงสร้าง ตลอดจนการเคลื่อนที่ของเซลล์ นอกจากทำหน้าที่เป็น adhesion molecule แล้ว integrins ยังมีบทบาทสำคัญในการส่งทอดสัญญาณเข้าออกเซลล์สองทิศทางซึ่งก่อให้เกิดผลทางชีวภาพมากมาย เช่นการควบคุมรูปร่างลักษณะเซลล์ การแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ ฯลฯ และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็งด้วย

โมเลกุลของ integrins ประกอบด้วยโปรตีนที่ต่างกัน 2 สาย (heterodimers) คือ α และ β subunits แต่ละสายนั้นแบ่งเป็น isoforms ได้มากมาย ในปัจจุบันพบ α subunit จำนวน 16 isoforms และ β subunit จำนวน 8 isoforms และ α และ β isoforms เหล่านี้มารวมกันเป็น โมเลกุลของ integrins ได้มากกว่า 22 ชนิด (Aplin et al. 1998) ทั้ง α และ β subunits สอดแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีปลายด้านอะมิโนอยู่ด้านนอกเซลล์ (extracellular domain) ส่วนนี้ทำหน้าที่จับกับ ligands ความจำเพาะในการจับกับ ligands ขึ้นกับชนิดของ α และ β subunits ที่มาประกอบกัน สำหรับปลายด้านคาร์บอกซิลนั้นอยู่ภายในเซลล์ (cytoplasmic domain) เป็นบริเวณที่มีการจับและทำปฏิกิริยากับ cytoskeletal proteins และ signal transducer molecules

Ligands ของ integrins ส่วนใหญ่ได้แก่ ECM (ตารางที่ 2.1) เช่น collagens, laminin, vitronectin, fibronectin, intercellular adhesion molecule (ICAM), และ vascular cell adhesion molecule (VCAM) (Albelda and Buck 1990) โดย integrins จะจับกับบริเวณเปปไทด์สั้น ๆ ซึ่งอยู่ในสายโปรตีนนั้น เช่นบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น RGD (Arg-Gly-Asp) เป็นต้น นอกจากนี้ integrins บางชนิด ยังสามารถจับกับ adhesion receptors อื่น ๆ เช่น Ig-CAMs และ cadherins ได้ด้วย

เมื่อ ligands จับกับ integrins จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของ integrins และทำให้โมเลกุล integrins ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงเคลื่อนมารวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) โดยภายในเซลล์จะมีลักษณะเป็น adhesion plaques เรียกว่า focal adhesion points (รูปที่ 2.2) ซึ่งเป็นบริเวณที่ cytoskeletal proteins เช่น talin vinculin, paxillin, α -actinin, filamin และ protein kinases เช่น focal adhesion kinase (FAK) ถูกดึงเข้ามา นอกเหนือจาก cytoskeletal proteins และ protein kinases แล้ว ยังมีโปรตีนอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่สามารถจับกับ integrins

ตารางที่ 2.1: การกระจายตัวของ integrins ในเนื้อเยื่อ และชนิดของ extracellular matrix proteins ที่จับกับ integrins (Mizejewski 1999)

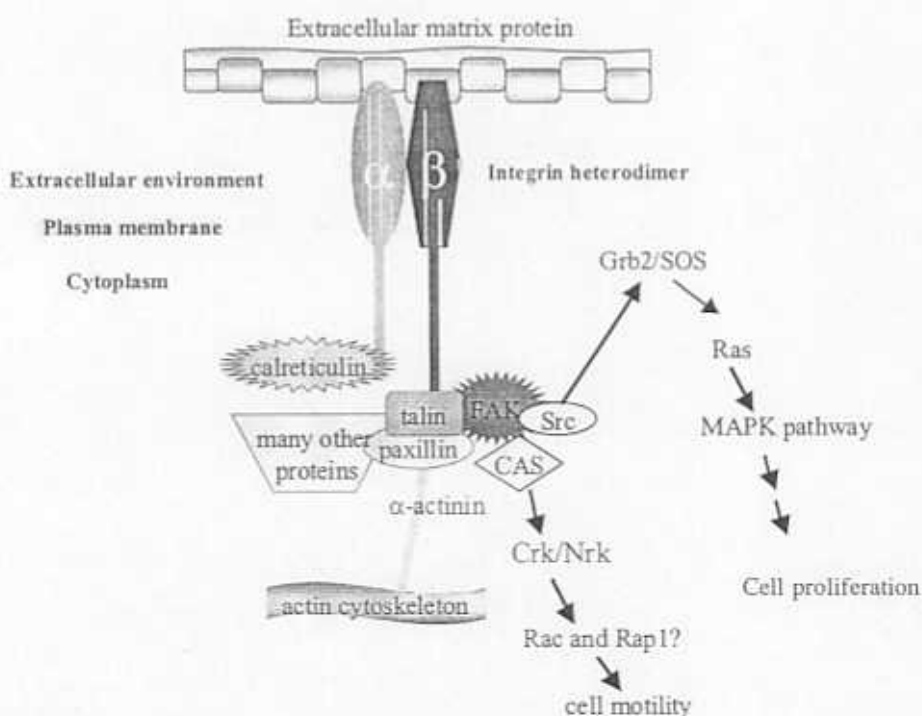
| Integrin Subunit | ECM proteins/ligands | Cell/tissue distribution |
|----------------------------|---|---|
| $\alpha_1\beta_1$ | LAM, Col | Smooth muscle, T cell, endothelium, hepatocytes |
| $\alpha_2\beta_1$ | Col, PLT, LAM, ENC, cell-to-cell | Epithelium, endothelium, Leukocytes, platelets. |
| $\alpha_3\beta_1$ | FBN, Col, INV, EPL, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, LAM, KAL, ENT | Epithelium, endothelium |
| $\alpha_4\beta_1$ | FBN, VCAM-1, PP-HEV, CSF | Leukocytes, melanomas |
| $\alpha_5\beta_1$ | FBN, INV, PLT | Endothelium, platelets, hepatocytes, lymphocytes |
| $\alpha_6\beta_1$ | LAM, INV, PLT, EPL | Most cells, platelets, epithelium, endothelium |
| $\alpha_7\beta_1$ | LAM | Muscle, melanoma |
| $\alpha_8\beta_1$ | BAL, TEN | Epithelium, brain, endothelium, myeloid |
| $\alpha_9\beta_1$ | FBN, VTN | Fibroblasts, tumor cells, osteoblasts |
| $\alpha_1\beta_2$ | ICAM _{1,2,3} | Leukocytes, myeloid cells |
| $\alpha_{IIb}\beta_2$ | C3bi, FBN, FAX, ICAM | Neutrophils, lymphocytes, monocytes |
| $\alpha_{IIb}\beta_2$ | C3bi, FBN | Granulocytes, monocytes |
| $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ | FBN, FBG, FIB, VWF, VTN, TSP | Megakaryocytes, platelets, melanoma |
| $\alpha_{IIb}\beta_3$ | BSP, FIB, VTN, FBN, FBG, PLC, α Col, PBP, VWF, TSP, OSP, Col | Osteoclasts, tumors, endothelium, fibroblasts |
| $\alpha_6\beta_4$ | LAM, KAL, MER | Neurons, fibroblasts, epithelium |
| $\alpha_{IIb}\beta_5$ | VTN, FBN, PBP, TAT | Pancreas, fibroblasts, carcinoma cells |
| $\alpha_{IIb}\beta_6$ | FBN | Epithelium, carcinoma cells |
| $\alpha_4\beta_7$ | FBN, VCAM, MADCAM | Endothelial and mucosal lining-associated actions |
| $\alpha_{IIb}\beta_8$ | NR | Reproductive organs |
| $\alpha_7\beta_9$ | NR | NR |

NR = not reported

(Amino acid single letter code; Abbreviations: BAL = basal lamina; BMP = basement membrane protein; BSP = bone sialoprotein; C3Bi = Complement Component 3B inactivated; COL = collagen; CSF connecting strand, fibronectin; ENC = endothelial cell; ENT = entactin (nidogen); EPL = epiligrin; FAX, clotting blood factor X; FBN = fibronectin; ICAM = intercellular cell adhesion molecule; INV = invasin, protein product of INV gene; KAL = kallikrein; LAM = laminin; MADCAM = mucosal adherens in coil adhesion molecule; MER = merosin (laminin-2); OSP = osteopontin; PBP = penton base protein of human adenovirus; PLC = perlecan; PLT = platelet; PPHev = Peyer's Patch high endothelial venules; TAT = HIV tat protein; TEN = tenascin (cytotactin); TSP = thrombospondin; VCAM = vascular cell adhesion molecule; VTN = vitronectin; VWF = Von Willibrand factor; NSCL = non-small cell lung (carcinoma).

โปรตีนเหล่านี้ได้แก่ cell-surface proteins เช่น tetraspans (TM4SF), integrin-associated proteins (IAP, CD47), caveolin, และ cytoplasmic proteins เช่น cytohesin-1, β_3 -endonexin, ICAP-1 เป็นต้น (Hemler 1998, Porter and Hogg 1998) และยังมี signaling molecules อีกหลายชนิดซึ่งไม่ได้จับกับ integrins โดยตรง แต่มาจับกับโปรตีนอื่นๆ ใน focal adhesion plaques ได้แก่ Rho, Rac, Ras, Grb2, SOS, Raf, MEKK, MEK, ERK1, ERK2, CAS, Src family kinases, CSK เป็นต้น (Dedhar and Hannigan 1996) จะเห็นว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ focal adhesion site นั้นมีความสลับซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับโปรตีนมากมายหลายชนิด

รูปที่ 2.2 Focal adhesion point and integrin signaling

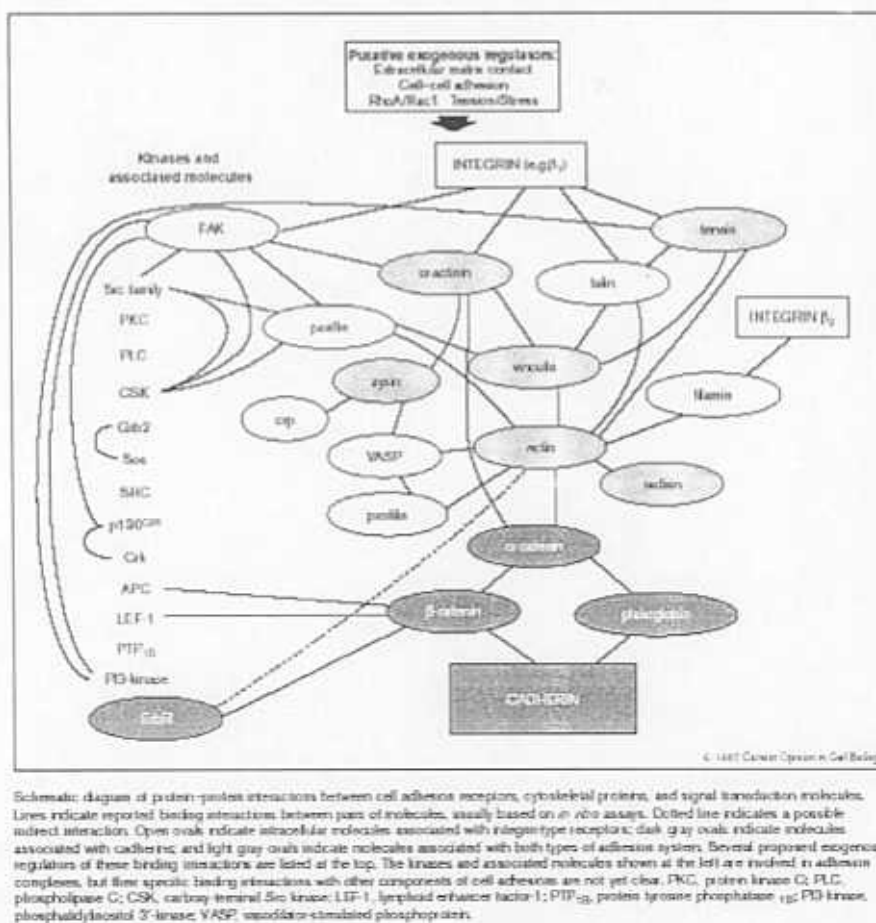


Biological outcomes: gene expression, cell proliferation & differentiation, cytoskeletal changes, cell motility

(รูปที่ 2.3) โปรตีนบางชนิดทำหน้าที่เชื่อมโยง integrins กับ actin cytoskeletal system (Yamada and Geiger 1997, Hemler 1998, Critchley 2000) และบางชนิดทำหน้าที่ในการส่งทอดสัญญาณจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ (outside-in signaling) และในขณะเดียวกันปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่บริเวณ focal adhesion points จะก่อให้เกิดสัญญาณจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก

นอกเซลล์ (inside-out signaling) เพื่อควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวกับ cell adhesion ด้วย (O'Toole 1994)

รูปที่ 2.3 Integrin-protein interaction at the focal adhesion point (Yamada and Geiger 1997)



2.3 บทบาทของ Integrins ในโรคมะเร็ง (Roles of Integrins in Cancers)

เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่สูญเสียกลไกในการควบคุมการเจริญเติบโต มีคุณสมบัติในการรุกรานเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียงและสามารถแพร่กระจายไปเติบโตยังที่อื่นได้ กลไกการเกิดมะเร็งมีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพหลายประการ ปัจจุบันเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า integrins มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนต่างๆ ของการเกิดมะเร็ง ได้แก่การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การเจริญเติบโต การรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การที่ integrins มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งนั้น เพราะ integrins ทำหน้าที่

ควบคุมการทำงานของ extracellular matrix และ cytoskeleton proteins ตลอดจนทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณเข้า-ออกเซลล์ จึงมีผลต่อทั้งต่อการทำงานและรูปร่างลักษณะของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นการเคลื่อนที่ การแบ่งตัว และการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นเมื่อเกิดความผิดปกติในการทำงานของ integrins จึงนำไปสู่การเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามที่ตีบทบาของ integrins ในการเกิดมะเร็งนี้มีความซับซ้อนมาก เพราะโปรตีนชนิดนี้มีมากกว่า 22 isoforms กระจายตัวตามเซลล์และเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดและมีแบบแผนการแสดงออกแตกต่างกันไป (Virtanen 1990) ในปัจจุบันมีข้อมูลอย่างชัดเจนเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ integrins เพียงบาง isoforms เท่านั้น และพบว่า isoforms เหล่านี้อาจมีบทบาทและความสำคัญแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อที่พบด้วย

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของ integrins แตกต่างไปจากเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2.2) ตัวอย่างเช่น skin carcinomas มีปริมาณ $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, และ $\alpha_6\beta_4$ integrin เพิ่มขึ้น (Tennenbaum et al. 1993, Mizejewski 1999) ใน colorectal carcinoma พบว่ามีปริมาณ $\alpha_6\beta_1$ และ $\alpha_6\beta_4$ integrin เพิ่มขึ้นเช่นกัน และการเพิ่มขึ้นของ $\alpha_6\beta_4$ integrin นี้สัมพันธ์กับความสามารถในการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงและแพร่กระจายของมะเร็งชนิดนี้ (Chao et al. 1996, Mizejewski 1999) ใน human nonsmall-cell lung carcinoma (Smythe et al. 1995) และ breast carcinoma (Shaw et al. 1996, Friedrichs et al. 1995) มีปริมาณ α_6 integrin เพิ่มขึ้นและพบว่ามีปริมาณ α_6 integrin ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการตายของมะเร็งชนิดนี้ด้วย

ตารางที่ 2.2 แบบแผนการแสดงออกของ integrins ในมะเร็งชนิดต่าง ๆ (Mizejewski 1999)

| | | Integrin heterocomplexes—alpha-beta chains | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Tumor tissue | Tumor state | $\alpha_1\beta_1$ | $\alpha_2\beta_1$ | $\alpha_2\beta_2$ | $\alpha_3\beta_1$ | $\alpha_3\beta_2$ | $\alpha_4\beta_1$ | $\alpha_4\beta_2$ | $\alpha_5\beta_1$ | $\alpha_5\beta_2$ | $\alpha_6\beta_1$ | $\alpha_6\beta_2$ | $\alpha_6\beta_4$ |
| Breast | Trans. | | ± | ± | — | — | ± | | | | | ± | |
| | Prim. | — | ± | ± | — | — | ± | — | | | — | ± | |
| | Metas. | + | ± | ± | — | — | + | + | | | | ± | |
| Colon | Trans. | | | ± | | — | | | | | | | |
| | Prim. | — | — | ± | | — | ± | | | | — | | |
| | Metas. | | ± | | | + | | | | | | + | |
| Kidney | Trans. | | | | — | + | | + | | | + | | + |
| | Prim. | | | | | | ± | | | | | | |
| | Metas. | | ± | ± | | + | ± | ± | | | | | ± |
| Lung (NSCLC) | Trans. | — | + | + | | — | + | ± | | | — | | ± |
| | Prim. | | — | ± | | | — | ± | | | ± | | |
| | Metas. | | | + | | | | | | | + | | |
| Melanoma | Trans. | | + | | | | | | | | + | | |
| | Prim. | — | ± | + | + | ± | — | | | | + | ± | |
| | Metas. | + | + | ± | ± | + | ± | | | | + | + | |
| Ovary | Trans. | | | | | + | | — | | | | | |
| | Prim. | | | + | | — | | | | | | | |
| | Metas. | | | + | | + | | — | | | | | |
| Skin (squamous) | Trans. | | | | | + | | | | | | + | + |
| | Prim. | | | | | — | | | | | + | | |
| | Metas. | | + | — | — | — | + | — | | | — | + | |

Note: Blanks indicate paucity of data in the literature.
 + = Upregulation of integrin expression
 — = Downregulation of integrin expression
 ± = Disorganized redistribution of integrin expression and/or reduced expression
 NSCLC = Nonsmall cell lung carcinoma
 Trans. = transformed cells
 Prim. = primary tumor cells
 Metas. = metastatic tumor cells
 Data were extracted and compiled from Refs. 4, 6, 8, 15, 22, 27, 79–92, 95, and 96.

มะเร็งบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ integrins หลาย isoforms ด้วยกัน ตัวอย่างเช่น melanoma พบว่ามีปริมาณ integrins $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_2\beta_3$ และ $\alpha_v\beta_3$ เพิ่มสูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติ (Klein et al. 1991, Marshall and Hart 1996, Mizejewski 1999) แต่ที่อาจมีความสำคัญทางคลินิกคือ $\alpha_v\beta_3$ integrin เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของ integrin ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็งชนิดนี้ (Marshall and Hart 1996) ส่วนใน breast cancer พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ integrins $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ และ $\alpha_5\beta_1$ โดยมีปริมาณลดลงกว่าที่พบใน normal breast tissue (Mizejewski 1999) และมีรายงานว่า การที่ปริมาณ $\alpha_2\beta_1$ integrins ลดน้อยลงนี้สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (Gui et al. 1995)

2.4 การแสดงออกของ Integrins ในมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับ (Integrin

Expression in Cholangiocarcinoma and Hepatocarcinoma)

มะเร็งของตับที่เป็นปัญหาสำคัญและพบบ่อยอันดับแรก คือ hepatocellular carcinoma (HCC) และที่พบบรองลงมาคือ cholangiocarcinoma (CHCA) มะเร็งทั้งสองชนิดนี้มีอัตราการตายสูง และมักตรวจพบในระยะที่โรคดำเนินไปมากแล้ว งานวิจัยในอดีตได้ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ integrins และศึกษากลไกที่ integrins ไปเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งชนิด HCC และ CHCA โดยงานวิจัยจำนวนหนึ่งได้ทำการศึกษานื้อเยื่อมะเร็งที่ได้จากผู้ป่วย และงานวิจัยอีกส่วนหนึ่งทำการศึกษาใน cell lines ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากมะเร็ง HCC หรือ CHCA และ integrin isoforms ที่เคยมีการศึกษาได้แก่ α_1 , α_2 , α_3 , α_6 , β_1 , และ β_4 จากรายงานของ Torimura et al. (1997) ซึ่งศึกษาการแสดงออกของ integrins ใน HCC ในผู้ป่วยจำนวน 25 ราย โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry คือการย้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อ integrins α_1 , α_2 , α_3 , α_6 , β_1 , และ β_4 พบว่าที่บริเวณ sinusoids ของเนื้อเยื่อมะเร็ง HCC และเนื้อเยื่อตับปกติมีปริมาณ integrins α_1 และ β_1 ไม่แตกต่างกันนัก และมี integrins 3 ชนิด ซึ่งไม่พบในเนื้อตับปกติ ได้แก่ α_6 , α_2 , α_3 แต่กลับพบ α_6 ปริมาณค่อนข้างสูงในเนื้อเยื่อมะเร็ง ส่วน β_4 ไม่พบทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อตับปกติ ซึ่งผลที่ได้นี้มีบางส่วนสอดคล้องกับรายงานของ Ozaki et al. (1998) ซึ่งใช้เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ integrins ในมะเร็งตับชนิด HCC ซึ่งได้จากผู้ป่วยจำนวน 16 ราย ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ integrins 7 ชนิด ได้แก่ α_1 , α_6 , α_{6A} , α_{6B} , β_1 , β_{1A} และ β_{1B} พบว่า integrins α_6 มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็ง ในขณะที่ปริมาณ integrins α_1 และ β_{1A} นั้นไม่แตกต่างจากเนื้อตับปกติ อย่างไรก็ตามในการศึกษารังนี้พบว่ามีเนื้อเยื่อมะเร็งตับ มีปริมาณ integrins β_1 และ β_{1B} เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งต่อมา Masumoto et al. (1999) ได้ศึกษาการแสดงออกของ integrins ใน HCC cell lines 7 ชนิดโดยเทคนิค

fluorocytometry พบว่าเซลล์เหล่านี้มีปริมาณ integrins β_1 สูงกว่าชนิดอื่น ๆ (α_{1-6}) และพบว่า integrin ชนิดนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความสามารถในการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็งด้วย

สำหรับในมะเร็งตับชนิด cholangiocarcinoma (CHCA) Volpes et al. (1993) ได้ใช้เทคนิค immunohistochemistry ศึกษาชิ้นเนื้อมะเร็ง CHCA และ HCC ซึ่งได้จากผู้ป่วยจำนวน 11 ราย และ 15 รายตามลำดับ โดยศึกษา integrins 6 ชนิด ได้แก่ VLA- α_1 , VLA- α_2 , VLA- α_3 , VLA- α_6 , VLA- β_1 , VLA- β_4 (VLA คือ β_1 subgroup) พบว่า integrin VLA- α_1 มีการแสดงออกเฉพาะใน HCC และ hepatocytes ส่วน VLA- α_2 , VLA- α_3 , VLA- β_4 และ VLA- α_6 พบเฉพาะใน CHCA และ biliary epithelium ในขณะที่ VLA- β_1 พบในเนื้อเยื่อตับทุกประเภท และที่น่าสนใจคือแบบแผนการแสดงออกของ integrins ใน well-differentiated CHCA และ HCC ไม่ได้แตกต่างเซลล์ปกติประเภทเดียวกัน แต่อย่างไรก็ดี ใน poorly differentiated CHCA พบว่าปริมาณ integrins VLA- α_2 , VLA- α_3 , VLA- β_4 , และ VLA- α_6 ลดน้อยลงกว่าที่พบใน normal biliary epithelium นอกจากนี้มีผู้ศึกษาใน CHCA cell lines (5 ชนิด) และ HCC cell lines (3 ชนิด) โดยเทคนิค flowcytometry (Enjoji et al. 1997) พบว่า integrins α_3 และ β_4 พบเฉพาะใน CHCA cell lines ในขณะที่ integrins α_1 พบเฉพาะใน HCC cell lines ส่วน integrins α_2 , α_6 และ β_1 พบทั้งใน CHCA และ HCC cell lines และ integrins α_4 และ α_5 พบใน CHCA cell line เพียงชนิดเดียว

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ integrins บางชนิดมีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์มะเร็ง HCC และ CHCA ตัวอย่างที่ค่อนข้างชัดเจน ได้แก่ integrins β_4 ซึ่งในรายงานที่กล่าวมาข้างต้นพบ integrin ชนิดนี้ใน CHCA แต่ไม่พบใน HCC และ integrins α_1 ซึ่งพบใน HCC แต่ไม่พบใน CHCA ความแตกต่างในแบบแผนการแสดงออกของ integrins อาจมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรค CHCA ซึ่งมีกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีออกจาก HCC ซึ่งมีกำเนิดจากเซลล์ตับได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการทดลองในโครงการวิจัย มีดังนี้

3.1 การเก็บเนื้อเยื่อจากผู้ป่วย

3.2 การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณ integrin mRNAs โดยวิธี RT-PCR

3.3 การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณ integrin proteins โดยวิธี Western blot analysis

3.1 การเก็บเนื้อเยื่อจากผู้ป่วย

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

- Cryotubes 2 ml.
- Liquid nitrogen and storage tank
- Freezer (-70°C)

3.1.2 วิธีการทดลอง

เนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 ราย ซึ่งเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ข้อมูลทั่วไป และข้อมูลด้านโรคของผู้ป่วยสรุปไว้ในตารางที่ 4.1 (บทที่ 4) เนื้อเยื่อตับปอดของผู้ป่วยรายเดียวกันเป็นเนื้อเยื่อโดยรอบก้อนมะเร็งซึ่งตัดออกมาพร้อมกันหรือเป็นเนื้อเยื่อตับปอดจากส่วนอื่น เนื้อเยื่อจะถูกแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกประมาณ 1-5 กรัม นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวข้ามคืนแล้วจึงนำมาแช่ในตู้เย็นที่ -70°C เนื้อเยื่อส่วนนี้เป็นส่วนที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของ integrin mRNAs และ integrin proteins ด้วยวิธี RT-PCR และ Western blot ตามลำดับ เนื้อเยื่อส่วนที่สองนำไปแช่ในฟอร์มาลินและห่อหุ้มด้วยพาราฟิน เนื้อเยื่อส่วนนี้เก็บไว้สำหรับศึกษาทางด้าน histology และ immunohistochemistry

3.2 การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณ integrin mRNAs ของ โดยวิธี RT-PCR

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

- TRIzol[®] reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
- DNase I (Promega Corp, Madison, WI, USA)
- Agarose (Life Technologies)
- Ethidium bromide (Sigma Aldrich Inc., St. Louise, MO, USA)
- SuperScript[™] One-Step RT-PCR system (Life Technologies)
- Taq DNA polymerase (Promega Corp)
- Standard DNA ladders (100 bp, 1 Kb) (Life Technologies)
- DEPC (Sigma Aldrich Inc.)
- Chloroform
- Isopropyl alcohol
- 75% ethanol
- 2 M sodium acetate
- MOP buffer
- TAE buffer
- RNA sampler buffer
- RNA loading buffer
- DNA loading buffer
- Micropipett tips for RNA (1 ml, 0.2 ml)
- Eppendorf tubes
- Micropipett (1 ml, 0.2 ml)
- Dounce glass homogenizer
- Refrigerated microcentrifuge
- UV-VIS spectrophotometer
- Submarine gel electrophoresis apparatus with power supply (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- UV illuminator with polaroid camera (Image Master VDS, Amersham Pharmacia Biotech, Inc. NJ, USA)
- iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

3.2.2 วิธีการทดลอง

3.2.2.1 การแยก total RNA จากเนื้อเยื่อ

- บดเนื้อเยื่อเพื่อให้เซลล์แตกในน้ำยา TRIzol[®] (เนื้อเยื่อ 50-100 mg ต่อน้ำยา 1 ml) โดยใช้ dounce glass homogenizer
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30°C เป็นเวลา 5 นาที
- เติม chloroform 0.2 ml ต่อ 1 ml of TRIzol[®] ปิดฝาให้แน่น เขย่าหลอดตัวอย่างแรงๆ แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30°C เป็นเวลา 5 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากปั่นเสร็จ น้ำยาจะแยกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนสุดมีลักษณะใสเป็น aqueous phase มี RNA ละลายอยู่ ชั้นล่างสุดมีสีแดงเป็นชั้น phenol-chloroform ซึ่งมีโปรตีนละลายอยู่ และชั้นกลางเป็นชั้นบางๆ มีลักษณะขุ่นขาว มี DNA ละลายอยู่
- ใช้ pipette ดูดน้ำยาชั้นบนไปไว้ใน eppendorf tube 1.5 ml เพื่อนำไปแยก total RNA และดูดน้ำยาชั้นล่างแยกไปไว้ใน eppendorf tube อีกอันเพื่อนำไปแยกโปรตีน
- ในการแยก total RNA เติม isopropyl alcohol 0.5 ml ลงในน้ำยา ส่วนบนที่แยกมาไว้ใน eppendorf tube ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30°C เป็นเวลา 10 นาที
- ปั่นที่ 12,000 xg อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลา 10 นาที
- หลังจากปั่นจะเห็น RNA pellet อยู่ที่ก้นหลอด มีลักษณะคล้ายเจล
- วางหลอดคว่ำเพื่อให้ RNA pellet แห้งพอประมาณ

3.2.2.2 การวัดปริมาณ total RNA

- เจือจางตัวอย่าง RNA ประมาณ 200 เท่า ใน DEPC-treated water
- นำไปวัดค่า absorbance ที่ 260 nm และ 280 nm
- คำนวณหาความเข้มข้นของ total RNA ในสารละลายได้ดังนี้

$$\text{Total RNA concentration } (\mu\text{g} / \text{ml}) = A_{260} \times 44.19 \times \text{dilution factor}$$

- คำนวณหาอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความบริสุทธิ์ของ RNA ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.65-2.0

3.2.2.3 การตรวจสอบ RNA integrity

เนื่องจาก RNA สามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์ RNase ซึ่งมีในเซลล์และเกิดจากการปนเปื้อน ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบว่า RNA ที่แยกได้มีสภาพดี ไม่สลายตัว วิธีการตรวจสอบทำโดยการแยก RNA ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ถ้า RNA ยังคงสภาพดีไม่เกิดการสลายตัว จะมองเห็นแถบหนาของ 28 S และ 18S ribosomal RNA อย่างชัดเจน วิธีการแยก RNA ทำดังนี้

- เตรียม 1% agarose gel ใน MOP buffer โดยใส่ agarose 1 g. ใน MOP buffer 95 ml. อุ่นให้ละลายในไมโครเวฟ
- เมื่อเจลมีอุณหภูมิประมาณ 55-60°C ใส่ formalin 5 ml. (ซึ่งผ่านการกรองด้วย Whatman paper แล้ว) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเทลงแบบพิมพ์ (gel cast) และใส่ comb เพื่อทำหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง (sample loading well) ปลอຍให้เจลแข็งตัวแล้วจึงนำออกจากแบบพิมพ์ไปใส่ไว้ใน submarine gel electrophoresis apparatus ใส่ MOP buffer ลงใน electrophoresis chamber ให้ท่วมผิวเจล
- เตรียมตัวอย่างโดยนำ RNA sample (10 µg) มาผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:2 (v/v) อุ่นที่อุณหภูมิ 65°C จากนั้นเติม RNA loading buffer ในอัตราส่วน 1/10 (v/v) ของส่วนผสมข้างต้น
- หยอดตัวอย่าง (10-20 µl) ลงใน loading well
- Run gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ประมาณ 100 volts จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนลงมาอยู่ที่ประมาณ 2 ซม. จากด้านล่างของแผ่นเจล
- ย้อมเจลด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสง UV บันทึกภาพด้วยกล้องโฟราลอคด์

3.2.2.4 การกำจัด DNA ปนเปื้อนในตัวอย่าง และการตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA โดย PCR

เนื่องจากการสกัด total RNA โดยใช้ TRIzol[®] reagent อาจมีการปนเปื้อนของ DNA ในตัวอย่าง และโดยที่ sense & antisense integrin primers ที่ใช้ในการทดลองทั้ง มีตำแหน่งอยู่บน exon เดียวกัน ดังนั้นหากเกิดการปนเปื้อน DNA จะเกิด amplification ของ DNA ในปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย ซึ่งทำให้ได้ผลบวกลวง (false positive) ดังนั้นก่อนที่จะ

นำ total RNA มาใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR จะต้องกำจัด DNA โดยการ
ใช้เอนไซม์ DNase ไปย่อย DNA เสียก่อน และเพื่อเป็นการยืนยันว่าไม่มี
การปนเปื้อนของ DNA อาจนำตัวอย่าง total RNA ซึ่งผ่านการย่อยด้วย
DNase แล้ว ไปทำ PCR โดยใช้ sense & antisense primers เช่นเดียวกับ
ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งเมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose
gel electrophoresis แล้วไม่พบ DNA fragment ก็เป็นการยืนยันว่าไม่มี
DNA ปนเปื้อนในตัวอย่าง

ปฏิกิริยาสำหรับการทำ DNase I pre-treatment มีส่วนประกอบดังนี้

| |
|-------------------------------|
| 5 µg total RNA |
| 10 units RNase-free DNase I |
| 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) |
| 10 mM MgCl ₂ |
| 50 µg/ml BSA |
| Final reaction volume = 20 µl |

ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นอุ่นที่ 75 °C นาน 5 นาที เพื่อ
ทำลายเอนไซม์

ปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR มีส่วนประกอบดังนี้

| | | |
|-----------------------------------|--------|----|
| Total RNA | 10-100 | ng |
| Integrin sense primer (10 mM) | 1 | µl |
| Integrin antisense primer (10 mM) | 1 | µl |
| β-actin sense primer (10 mM) | 1 | µl |
| β-actin antisense primer (10 mM) | 1 | µl |
| 10X reaction buffer | 5 | µl |
| Taq DNA polymerase | 0.5 | µl |
| Distilled water qs. to | 50.0 | µl |

- นำปฏิกิริยาไป Run ในเครื่อง Thermo cycler โดยกำหนดจำนวนรอบ
ขั้นตอน อุณหภูมิ และระยะเวลาของปฏิกิริยา ดังนี้

Cycle 1 x 35 : (Polymerase chain reaction)

| | |
|-----------------------------|------------------|
| Step 1: temperature 94°C | duration 0.5 min |
| Step 2: temperature 53-55°C | duration 0.5 min |
| Step 3: temperature 72°C | duration 1.0 min |

Cycle 2 x 1 : (Final extension)

Step 1: temperature 72°C

duration 7.0 min

- เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดแล้ว นำ PCR reaction มาแยกบน 1% agarose gel แล้วตรวจหาแถบ DNA fragment และเทียบขนาดกับ standard DNA ladder ที่ run ไปพร้อมกัน วิธีการทดลองตามหัวข้อ 3.2.2.6

3.2.2.5 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ปริมาณ integrin mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อเยื่อเยื่อมีปริมาณน้อยมาก จึงต้องทำการเพิ่มปริมาณเพื่อขยายสัญญาณให้สามารถตรวจพบได้ ปฏิกิริยา RT-PCR เป็นการเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาเป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ต้องการเป็นล้านเท่า เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดจะได้ integrin DNA fragment ที่ต้องการจำนวนมากซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

เนื่องจาก mRNA ที่แยกได้จากเซลล์มีมากมายหลายชนิด การที่จะเลือกขยายสัญญาณของ integrin mRNA อย่างจำเพาะนั้นต้องใช้คู่ primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเบสคู่สมกับตำแหน่งบน integrin gene sequence ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ integrin genes α_1 , α_2 , α_6 , β_1 , β_2 , β_4 มีผู้ค้นพบและตีพิมพ์เผยแพร่แล้ว ข้อมูลเหล่านี้ถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) สำหรับ oligonucleotide primers ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

ในปฏิกิริยา RT-PCR ทุกตัวอย่าง ใช้ β -actin gene เป็น internal control เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ mRNA เริ่มต้น เนื่องจาก β -actin gene เป็นยีนที่มีการแสดงออกในเซลล์ทุกชนิด (house keeping gene) และเชื่อว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนนี้ในเนื้อเยื่อมะเร็ง

ในการทำ RT-PCR ใช้ชุดสำเร็จรูป SuperScript™ One-Step RT-PCR system ซึ่งในปฏิกิริยา 50 μ l มีส่วนประกอบดังนี้

| | | |
|-----------------------------------|---|---------|
| Total RNA | 1 | μ g |
| Integrin sense primer (10 mM) | 1 | μ l |
| Integrin antisense primer (10 mM) | 1 | μ l |

| | | |
|---|----|---------|
| β -actin sense primer (10 mM) | 1 | μ l |
| β -actin antisense primer (10 mM) | 1 | μ l |
| 2X reaction buffer | 25 | μ l |
| RT-Taq mix | 1 | μ l |
| DEPC-treated water qs. to | 50 | μ l |

หมายเหตุ : ปฏิกริยาควบคุม (control reaction) ซึ่งทำควบคู่กับปฏิกริยาจริงนั้น มีส่วนประกอบเหมือนปฏิกริยาจริง แต่ไม่มี RNA sample ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่า 1) ไม่มีการปนเปื้อนของ RNA และ DNA ในน้ำยาต่างๆที่ใช้ และ 2) primers 4 สายที่ใช้ในปฏิกริยาไม่เกิด self annealing & amplification

ขั้นตอนการทำ RT-PCR มีดังนี้ :

- เตรียมปฏิกริยา RT-PCR มีส่วนประกอบดังที่แสดงข้างต้น โดยเลือกใช้ integrin primers คู่ที่สนใจสำหรับปฏิกริยาแต่ละชุด
- นำปฏิกริยาไป Run ในเครื่อง Thermo cycler โดยกำหนดจำนวนรอบ ขั้นตอน อุณหภูมิ และระยะเวลาของปฏิกริยา ดังนี้

Cycle 1 X 1 : (Reverse transcription)

| | |
|--------------------------|-----------------|
| Step 1: temperature 50°C | duration 25 min |
| Step 2: temperature 94°C | duration 5 min |

Cycle 2 x 35 : (Polymerase chain reaction)

| | |
|-----------------------------|------------------|
| Step 1: temperature 94°C | duration 0.5 min |
| Step 2: temperature 53-55°C | duration 0.5 min |
| Step 3: temperature 72°C | duration 1.0 min |

Cycle 3 x 1 : (Final extension)

| | |
|--------------------------|------------------|
| Step 1: temperature 72°C | duration 7.0 min |
|--------------------------|------------------|

3.2.2.6 การวิเคราะห์ PCR product

เมื่อปฏิกริยาลิ้นสุดแล้ว นำ PCR reaction มาแยกบน 1% agarose gel แล้วตรวจหาแถบ DNA fragment และเทียบขนาดกับ standard DNA ladder ที่ run ไปพร้อมกัน ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

- เตรียม 1% agarose gel ใน TAE buffer อุ่นให้ละลายด้วยไมโครเวฟ

- เมื่อเจลมีอุณหภูมิประมาณ 55–60°C นำไปเทลงแบบพิมพ์ (gel cast) และใส่ comb เพื่อเป็นหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง (sample loading well) ปลอຍให้เจลแข็งตัวแล้วจึงนำออกจากแบบพิมพ์ไปใส่ไว้ใน submarine gel electrophoresis apparatus ใส่ TAE buffer ลงไปใน chamber ให้ท่วมผิวเจล
- เตรียมตัวอย่างโดยนำ PCR reaction จำนวน 5 μ l ผสมกับน้ำ 4 μ l และ DNA loading buffer 1 μ l
- หยอดตัวอย่างลงใน loading well และหยอด standard DNA ladder (100 bp ladder) ลงใน well ข้างเคียง
- Run gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 volts จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินของ Cyanoxyleneol FF เคลื่อนลงมาอยู่ที่ประมาณ 2 ซม. จากด้านล่างของแผ่นเจล
- ย้อมเจลด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสง UV บันทึกภาพด้วยกล้องโพราลอยด์

3.3 การตรวจวิเคราะห์หาชนิด integrin proteins โดย Western blot analysis

3.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.3.1.1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

- TRIzol[®] reagent (Life Technologies)
- Separating and stacking gel solutions
- H₂O-saturated isobutyl alcohol
- Wash solution (0.3 M guanidine hydrochloride ละลายใน 95% ethanol)
- 1x Tris~Cl/SDS, pH 8.8
- 2x and 1x SDS sample buffer
- Protein molecular-weight-standards mixture, prestained (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- 6x SDS sample buffer
- 1x SDS electrophoresis buffer
- Transfer buffer
- Ethanol
- Whatman 3MM filter paper
- 0.45 μ m nitrocellulose transfer membrane

- Scotch-Brite pads (3M)
- Electrophoresis apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- Electroblotting apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- 0.75 mm Teflon comb with 1, 3, 5, 10, 15, or 20 teeth
- 25- or 100- μ l syringe with flat-tipped needle
- 0.45 μ m filters (used in stock solution preparation)
- 25 ml Erlenmeyer side-arm flask
- Power supply (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

3.3.1.2 Immunodetection

- Primary monoclonal antibody: antihuman integrin antibodies, α_1 , α_6 , α_6 , β_1 , β_3 , β_4 (Chemicon International, Inc., Temecular CA, USA)
- Primary monoclonal antibody: antimouse actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA)
- Immun-blot Assay kit (Bio-Rad[®] Laboratories, Inc.) ประกอบด้วย
 - Alkaline phosphatase (AP)-anti-Ig conjugate
 - AP color reagent A (contains NBT in aqueous dimethylformamide (DMF), containing magnesium chloride)
 - AP color reagent B (contains BCIP in DMF)
 - AP color development buffer 25X
 - Tris-buffered saline (TBS)
 - Gelatin, blocking grade
 - Tween 80, blocking grade
- Blocking buffer : 3% gelatin in TBS
- Tris tween buffer saline (TTBS) : 350 μ l of Tween 20 ใน 700 ml 1X TBS
- Antibody buffer : 1% gelatin in TTBS
- First antibody solution: dissolve the primary antibody to the appropriate dilution in 100 ml of 100 ml Antibody buffer
- Second antibody solution: : dissolve 33 μ l of the antibody conjugate in 100 ml Antibody buffer
- Heat-sealable plastic bag

- Orbital shaking incubator

3.3.2 วิธีการทดลอง

3.3.2.1 การแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อ

แยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อโดยใช้น้ำยา TRIzol[®] (รายละเอียดการทดลองอยู่ในหัวข้อ 3.2.2.1) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- นำชั้น phenol-chloroform มาตกตะกอนโดยการเติม isopropanol 1.5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นแยกที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากปั่นเสร็จดูดส่วนน้ำใส (supernatant) ทิ้งไป แล้วนำ protein pellet มาล้าง 3 ครั้งด้วย wash solution โดยในแต่ละครั้งให้เติม wash solution 2 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30°C นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 7,500 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสข้างบนทิ้งไป ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง
- เติม ethanol 2 ml ลงใน pellet ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30°C นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 7,500 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสข้างบนทิ้งไป เก็บ pellet ไว้
- ทำให้ pellet แห้ง โดยใช้ speed vacuum นาน 5-10 นาที
- ละลาย pellet ด้วย 1% SDS ปริมาณ 0.5 ml ที่อุณหภูมิ 50°C
- ปั่นแยกที่ 10,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสไปใส่หลอดใหม่ เพื่อนำไปใช้ในการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป หรืออาจเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

3.3.2.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE electrophoresis)

ก) การเตรียม separating gel

- ประกอบแผ่นแก้ว 2 แผ่นเข้ากับเครื่อง electrophoresis apparatus โดยใช้ spacer คั่นเพื่อให้มีช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว 0.75-mm
- เตรียม separating gel solution และใส่แก๊สออกโดยใช้ vacuum
- เติม 10% ammonium persulfate and TEMED ปริมาณตามที่ต้องการลงใน gel solution เขย่าเบาๆ ให้ผสมกันดี ระมัดระวังให้เกิดฟองอากาศ

- ใช้ Pasteur pipet หยอด gel solution ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วให้ระดับเจลสูงประมาณ 11 ซม.
- ใช้ Pasteur pipet อันใหม่หยอด H_2O -saturated isobutyl alcohol ลงบนผิวเจลอย่างช้าๆหนาประมาณ 1 ซม.เพื่อให้ผิวเรียบสม่ำเสมอและป้องกันมิให้ออกซิเจนแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเจล (เตรียม H_2O -saturated isobutyl alcohol โดยการเขย่า isobutyl alcohol กับ H_2O ใน separatory funnel แล้วตั้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นเปิดเอาส่วนน้ำซึ่งอยู่ข้างล่างทิ้งไป ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง)
- ปลอຍให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที
- เทชั้น H_2O -saturated isobutyl alcohol ออกแล้วล้างด้วย 1X Tris Cl/SDS, pH 8.8.

ข) การเตรียม stacking gel

- เตรียม stacking gel solution ดังนี้
- ใช้ Pasteur pipet หยอด stacking gel solution ใส่ลงเหนือ separating gel ให้ระดับเจลอยู่ประมาณ 1 ซม. จากขอบบนของแผ่นแก้ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- ใส่ 0.75-mm Teflon comb ลงในชั้น stacking gel solution แล้วเติม stacking gel solution จนท่วมช่องระหว่าง comb
- ปลอຍให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที จากนั้นเอา comb ออก แล้วล้างช่องหยอดตัวอย่างด้วย 1x SDS electrophoresis buffer
- นำแผ่นเจลไปประกอบเข้ากับ electrophoresis chamber แล้วเติม 1x SDS electrophoresis buffer ลงไปใน chamber ให้ท่วมเจล

ค) การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

- เจือจางตัวอย่าง protein ใน 2x SDS sample buffer ด้วยอัตราส่วน 1:1 (v/v) ใส่ eppendorf tube ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปต้มที่ $100^{\circ}C$ นาน 3 to 5 min ถ้าตัวอย่างตกตะกอน ให้ละลายโปรตีนใน 1X SDS sample buffer 50 to 100 μl
- ละลาย protein-molecular-weight standard mixture ใน 1X SDS sample buffer เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบ
- หยอดตัวอย่างโปรตีนลงในช่องโดยใช้ 100 μl syringe และหยอด standard protein marker ลงในอีกช่อง

- ต่อ electrophoresis apparatus เข้ากับ power supply
- Run gel ใช้กระแสไฟ 10 mA จนกระทั่งสี bromphenol blue วิ่งลงไปชั้น separating gel จึงเพิ่มกระแสไฟเป็น 15 mA
- Run ต่อ จนสี bromphenol blue เคลื่อนลงไปจนถึงด้านล่างของเจล จึงปิดกระแสไฟฟ้า จากนั้นถอดแผ่นเจลออกจากเครื่อง
- เอาเจลออกจากแผ่นแก้ว ตัดมุมด้านหนึ่งไว้เพื่อเป็นสัญลักษณ์บอกทิศทางของเจล
- นำเจลไปตรวจหาโปรตีนโดยวิธีย้อมสี (Coomassie blue staining) หรือย้อมด้วยแอนติบอดี (Western blot) แล้วแต่กรณี

3.3.2.3 การตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี immunoblotting (Western blot)

เป็นการตรวจหาโปรตีนจำเพาะภายหลังจากการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE โดยการถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปสู่ nitrocellulose membrane หรือ membrane ชนิดอื่น เช่น PVDF และ nylon membrane จากนั้นให้โปรตีนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวแรก การตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก สามารถทำได้โดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อแอนติบอดีตัวแรก (anti-IgG antibody) แอนติบอดีตัวที่สองนี้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase (HRPO) และ alkaline phosphatase เมื่อแอนติบอดีตัวที่สองทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวแรกแล้ว สร้างแอนติบอดีที่เกินออกไป จากนั้นใส่ substrate ลงไปในปฏิกิริยา เอนไซม์จะเปลี่ยน substrate ซึ่งไม่มีสีให้เป็น product ที่มีสีปรากฏให้เห็น ณ ตำแหน่งที่โปรตีนนั้นอยู่บน membrane การทำ Western blot มีขั้นตอนดังนี้

ก) การถ่ายโปรตีนไปสู่ nitrocellulose membrane

- หลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วนำแผ่นเจลมาแช่ใน transfer buffer ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
- ประกอบแผ่นเจลเข้ากับ transfer cassette ให้มีลักษณะเป็น sandwich (รูปที่) ดังนี้ ชั้นล่างสุดวางแผ่น Scotch-Brite ถัดมาวางแผ่นกระดาษกรองซึ่งตัดให้ได้ขนาดเท่าแผ่นเจลและชุบให้เปียกด้วย transfer buffer จากนั้นวางแผ่นเจลลงบนกระดาษกรอง โดยให้ด้านที่ติดกระดาษกรองเป็นด้าน cathode คือต่อกับขั้วลบ เมื่ออยู่ใน transfer tank วาง nitrocellulose membrane ลงบนแผ่น

เจลให้แนบสนิทโดยไม่มีฟองอากาศ (ก่อนที่จะนำ nitrocellulose membrane มาใช้ ต้องแช่ในน้ำกลั่นให้ membrane เปียกทั่วกันแล้วนำไปแช่ต่อใน transfer buffer นาน 10-15 นาที) จากนั้นวางแผ่นกระดาษกรองซึ่งชุบให้เปียกด้วย transfer buffer ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ และสุดท้ายวาง Scotch-Brite บนแผ่นกระดาษกรองอีกชั้นหนึ่ง

- ปิดลีด transfer cassette แล้วนำไปวางใน transfer tank ให้ถูกทิศทาง กล่าวคือด้านที่เป็น nitrocellulose membrane เป็นด้านที่ต่อกับขั้วบวก เนื่องจากการถ่ายโปรตีนจากเจลไปสู่เมมเบรนมีทิศทางจากลบไปบวก
- เติม transfer buffer ลงใน tank แล้วต่อ tank เข้ากับ power supply
- Electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V (โดยมีระบบ cooling) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ปิดกระแสไฟฟ้า นำ membrane ออกมาจาก transfer cassette แล้วตัดมุมข้างหนึ่งเพื่อเป็นสัญลักษณ์บอกทิศทาง
- นำ membrane ไปตรวจหาโปรตีนโดยการย้อมกับแอนติบอดี

ข) การตรวจหาโปรตีนโดยวิธี Direct conjugated secondary antibody

- ใส่ membrane ในถุงพลาสติกซึ่งบรรจุ blocking buffer 5 ml. ปิดถุงให้สนิทโดยการลนไฟ
- นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
- เจือจาง primary antibody 1:10, 1:100, 1:1000
- เปิดถุงใส่ membrane เท blocking bufferทิ้งแล้วล้างเมมเบรนด้วย TTBS โดยการแช่ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 5-10 นาที
- เท TTBS ออก แล้วใส่ diluted primary antibody solution ลงไปแทน นำไปแช่ต่อบนเครื่อง orbital shaker หรือ rocker ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 ชั่วโมง หรืออาจจะแช่ข้ามคืน
- นำ membrane ออกมาจากถุง วางไว้ในกล่องพลาสติก ล้างด้วย TTBS 200 ml. 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้แช่ไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- เตรียม antibody conjugate solution โดยการเจือจาง AP-anti-Ig conjugate 33 μ l ใน antibody buffer 100 ml.

- ใส่ membrane ในถุงพลาสติกใบใหม่ แล้วใส่ antibody conjugate solution ลงในถุง ปิดถุงให้สนิทโดยการสนไฟ
- นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที - 2 ชั่วโมง
- นำ membrane ออกมาจากถุง ล้างโดยการแช่ใน TTBS 50 ml ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง
- ก่อนนำ membrane ไปทำ color development ล้างด้วย TBS ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เพื่อกำจัด Tween 20
- เตรียม Color development solution โดยผสม AP color reagent A 1.0 ml และ AP color reagent B 1.0 ml ใน 1X AP color development buffer ที่อุณหภูมิห้อง ควรใช้ทันทีหลังเตรียมเสร็จ แต่ถ้าจะเก็บไว้ข้ามคืนให้เก็บที่ 4°C
- แช่ membrane ใน Color development solution ควรจะเห็น band สีม่วงเข้ม ภายใน 10-30 นาที กรณีที่ไม่เห็น band อาจแช่ membrane ไว้นาน 4 ชั่วโมง
- หยุดปฏิกิริยาโดยการล้าง membrane ด้วย distilled water นาน 10 นาที พร้อมแช่ที่อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนน้ำในระหว่างนั้น อย่างน้อย 1 ครั้ง
- ถ่ายรูปไว้ในขณะที่ membrane ยังเปียก
- นำ membrane ไปทำให้แห้ง โดยประกบกับ filter paper 2 แผ่น แล้วห่อด้วย aluminium foil ป้องกันแสง เพื่อมิให้สีจาง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลผู้ป่วย

เนื้อเยื่อนำมาศึกษาในโครงการวิจัยนี้ ได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 ราย ซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีโดยการตรวจร่างกายและการตรวจทางพยาธิวิทยา และผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยเป็นรายบุคคล การวินิจฉัยและผลการตรวจชิ้นเนื้อโดยพยาธิแพทย์ ทั้งนี้ผู้วิจัยขอสงวนการเปิดเผย ชื่อ-สกุลและหมายเลขทะเบียนผู้ป่วย ตารางที่ 4.2 สรุปข้อมูลทั่วไปและข้อมูลด้านโรคของผู้ป่วย

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลผู้ป่วยรายบุคคล

| No | Code | Sex | Age: Yrs. | Tumor location | CHCA type | Histology Type | Histology grade |
|----|------|-----|-----------|----------------|---------------|--|-----------------|
| 1 | N144 | M | 58 | Rt lobe | intraductal | Tubular adenocarcinoma | WD |
| 2 | P12 | M | 54 | Rt. lobe | hilar | Tubular adenocarcinoma | WD |
| 3 | P20 | M | 49 | Rt.lobe | hilar ? | Tubular adenocarcinoma | WD |
| 4 | P29 | F | 49 | Rt. lobe | Intraductal | Tubular adenocarcinoma | WD |
| 5 | P31 | M | 67 | Rt. lobe | hilar | Tubular adenocarcinoma | WD |
| 6 | P48 | M | 73 | Rt lope | mass- forming | Adenocarcinoma | WD |
| 7 | P60 | F | 64 | Rt lope | Intraductal | Papillary adenocar- cinoma with tubular invasion | WD |
| 8 | P71 | M | 51 | Lt lobe | Intraductal | X | X |
| 9 | P92 | M | 55 | Lt lobe | mass- forming | Adenocarcinoma | WD |
| 10 | P105 | M | 46 | Rt lobe | hilar | Adenocarcinoma | WD |

| No | Code | Sex | Age: Yrs. | Tumor location | CHCA type | Histology Type | Histology grade |
|----|------|-----|--------------|-------------------|---------------|-------------------------|--------------------|
| 11 | P120 | M | 49 | Rt. lobe | Mass- forming | Adenocarcinoma | MD |
| 12 | P126 | M | 51 | | Mass- forming | Mucinous adenocarcinoma | |

หมายเหตุ:

CHCA type = Cholangiocarcinoma type

Rt. lobe = right liver lobe, Lt. lobe = left liver lobe

WD = well differentiated, MD = moderately differentiated, PD = poorly differentiated

ตารางที่ 4.2 สรุปข้อมูลทั่วไปและข้อมูลด้านโรคของผู้ป่วย

| Patients | Number | Percentage (%) |
|---------------------------------------|--------|----------------|
| Sex: | | |
| - Male | 10 | 83.3 |
| - Female | 2 | 16.7 |
| Age (years): | | |
| - >60 | 3 | 25.0 |
| - 50-59 | 5 | 41.7 |
| - 40-49 | 4 | 33.3 |
| - <40 | 0 | 0 |
| Tumor location | | |
| - Right lobe liver | 10 | 83.3 |
| - Left lobe liver | 2 | 16.7 |
| Cholangiocarcinoma (CHCA) type | | |
| - Intraductal | 4 | 33.3 |
| - Hilar | 4 | 33.3 |
| - Mass-forming | 4 | 33.3 |
| Histology type | | |
| - Tubular adenocarcinoma | 5 | 41.7 |
| - Mass forming-adenocarcinoma | 5 | 41.7 |
| - Mucinous adenocarcinoma | 1 | 8.3 |
| - No data | 1 | 8.3 |

| Patients | Number | Percentage (%) |
|----------------------------------|--------|----------------|
| Histology grade | | |
| - Well differentiated (WD) | 10 | 83.3 |
| - Moderately differentiated (MD) | 1 | 8.3 |
| - Poorly differentiated (PD) | 0 | 0 |
| - No data | 1 | 8.3 |

4.2 แบบแผนการแสดงออกของ integrins ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

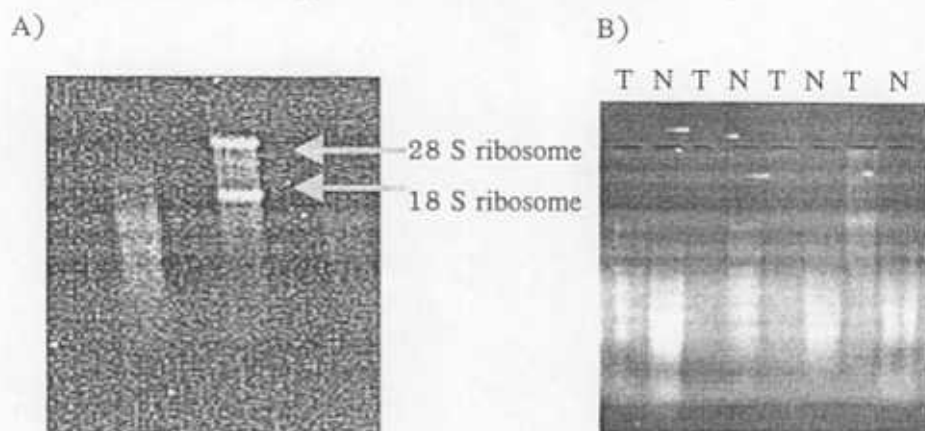
4.2.1 การตรวจสอบ total RNA integrity

Total RNA ซึ่งอยู่ในสภาพดี เมื่อนำมาแยกด้วย agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นส่องดูภายใต้ UV illuminator จะมองเห็นแถบเรืองแสงขนาดใหญ่ของ 28 S ribosomal 18 S ribosomal อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.1A) แต่ถ้า total RNA เกิดการสลายตัวไปบางส่วนซึ่งจะมองเห็นแถบเรืองแสงลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladders) และถ้า total RNA สลายตัวหมดจะไม่พบแถบเรืองแสงเลย (รูปที่ 4.2B)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้คัดเลือก total RNA ที่แยกจากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยจำนวน 12 ตัวอย่าง (ตาราง 4.1) จากจำนวนที่รวบรวมได้ทั้งหมดมากกว่ายี่สิบตัวอย่าง เหตุผลที่คัดเลือกมาเพียง 12 ราย เพราะ total RNA ยังอยู่ในสภาพดีหรือมีการสลายตัวเพียงเล็กน้อย ส่วนตัวอย่างที่ total RNA มีการสลายตัวอย่างมาก ผู้วิจัยไม่ได้นำมาศึกษา

สาเหตุที่ total RNA สลายตัวอาจเป็นเพราะการเก็บตัวอย่างไว้นานหลายวันก่อนที่จะนำมาแยก total RNA และเนื้อเยื่อมะเร็งที่ได้รับมามีลักษณะค่อนข้างเหลวและมีส่วนประกอบอื่นเช่นน้ำดีปะปนมาด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพและความคงตัวของ RNA ด้วย

รูปที่ 4.1 การตรวจสอบ total RNA integrity A) total RNA ที่มีสภาพดีจะพบแถบ ribosones ชัดเจน B) total RNA ที่สลายตัวบางส่วนเห็นแถบคล้ายชั้นบันไดและที่สลายตัวหมดไม่ปรากฏแถบ (T = CHCA, N = liver tissue)



4.2.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA โดย polymerase chain reaction (PCR)

หลังจากนำตัวอย่าง total RNA มาทำ DNase I pretreatment แล้วนำไปตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA ด้วยเทคนิค PCR และ agarose gel electrophoresis ไม่พบ DNA fragment ใน PCR products เป็นการยืนยันว่าไม่มีการปนเปื้อนของ DNA ในตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาด้วย RT-PCR ดังนั้นเมื่อนำตัวอย่างนี้ไปศึกษาการแสดงออกของ integrins ด้วยเทคนิค RT-PCR (หัวข้อ 4.2.4) แถบที่ปรากฏบน agarose gel จึงเป็นแถบที่เกิดจากการขยายจำนวน polyA⁺ RNA

4.2.3 การศึกษาโดย Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR เป็นการตรวจวัดระดับ poly A⁺ RNA (mRNA) ในเนื้อเยื่อ โดยการแยก total RNA หรือ polyA⁺ RNA จากเนื้อเยื่อ จากนั้นใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เปลี่ยน integrin polyA⁺ RNA ไปเป็น cDNA ซึ่ง cDNA ที่ได้นี้จะถูกใช้เป็นแม่แบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR ความจำเพาะของปฏิกิริยาเป็นผลจากการใช้ oligonucleotide primers ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสของ integrin gene ชนิดที่ต้องการตรวจ ในปฏิกิริยา PCR จะมีการสร้าง DNA fragment บริเวณที่อยู่ระหว่างคู่ primers เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จะมีปริมาณ DNA fragment ดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่า ทำให้สามารถตรวจพบได้โดยง่าย โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกบน agarose gel แล้วย้อมสีด้วย ethidium

bromide เมื่อนำไปส่องด้วยแสง UV จะมองเห็นแถบ DNA เรืองแสงสีส้ม มีขนาดตามที่คาดไว้ ซึ่งทราบได้โดยการเทียบกับขนาดของ standard DNA ladder

ผลการวิเคราะห์ integrins α_1 , α_v , α_6 , β_1 , β_3 , และ β_4 โดยวิธี RT-PCR ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติซึ่งได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 12 ตัวอย่าง ปรากฏในตารางที่ 4.3 และ 4.4 และรูปที่ 4.1-4.6

ตาราง 4.3 สรุปผล RT-PCR ในผู้ป่วยแต่ละรายเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อมะเร็งท้องน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติ (n =12)

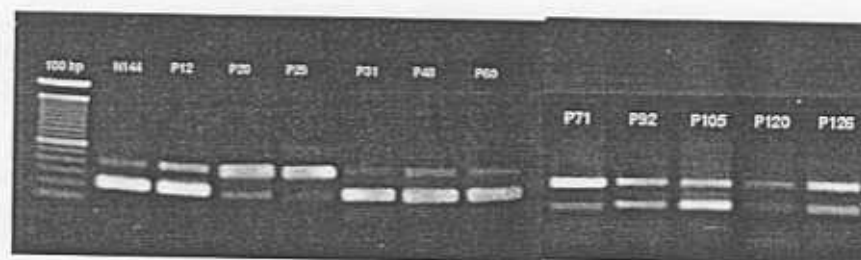
| No | Code | Alpha1 | | AlphaV | | Alpha6 | | Beta1 | | Beta3 | | Beta4 | |
|----|------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | | Normal | Tumor | Normal | Tumor | Normal | Tumor | Normal | Tumor | Normal | Tumor | Normal | Tumor |
| 1 | N144 | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | + |
| 2 | P12 | + | + | + | + | - | | + | + | - | - | - | + |
| 3 | P20 | ± | + | + | ± | ± | | + | + | - | - | - | - |
| 4 | P29 | ± | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + |
| 5 | P31 | + | + | ± | + | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 6 | P48 | + | + | + | + | - | - | ± | - | + | - | - | - |
| 7 | P60 | + | + | + | + | | | + | + | + | + | - | - |
| 8 | P71 | + | + | + | + | | | + | + | - | - | - | - |
| 9 | P92 | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 10 | P105 | + | - | + | ± | + | | + | - | + | - | - | - |
| 11 | P120 | ± | + | + | + | - | + | ± | + | - | - | - | + |
| 12 | P126 | + | - | + | ± | - | - | + | + | - | - | - | - |

หมายเหตุ: + strong signal, ± weak signal

ตารางที่ 4.4: การแสดงออกของ Integrins แต่ละชนิดเปรียบเทียบเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติ (n = 12)

| Integrins | CHCA | | Liver tissue | |
|------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| | (+/n) | (% positive) | (+/n) | (% positive) |
| α_1 | 10/12 | 83.3 | 12/12 | 100.0 |
| α_v | 12/12 | 100.0 | 11/12 | 91.6 |
| α_6 | 4/12 | 33.3 | 2/12 | 16.7 |
| β_1 | 10/12 | 83.3 | 12/12 | 100.0 |
| β_3 | 3/12 | 25.0 | 3/12 | 25.0 |
| β_4 | 4/12 | 33.3 | 0/13 | 0 |

รูปที่ 4.2 ผล RT-PCR Integrin α_1 ก) CHCA และ ข) เนื้อเยื่อตับปกติ
ในเนื้อเยื่อตับปกติตรวจพบทั้ง 12 ตัวอย่าง ใน CHCA ตรวจพบ 10 ตัวอย่าง
ก)



ข)



100 bp = 100 bp DNA ladder) แถบขนาด ~ 400 bp คือ β actin internal control, แถบขนาด 250 bp คือ integrin α_1

รูปที่ 4.3 ผล RT-PCR Integrin α_v ก) CHCA และ ข) เนื้อเยื่อตับปกติ
ในเนื้อเยื่อตับปกติตรวจพบ 10 ตัวอย่าง ใน CHCA ตรวจพบ 11 ตัวอย่าง

ก)



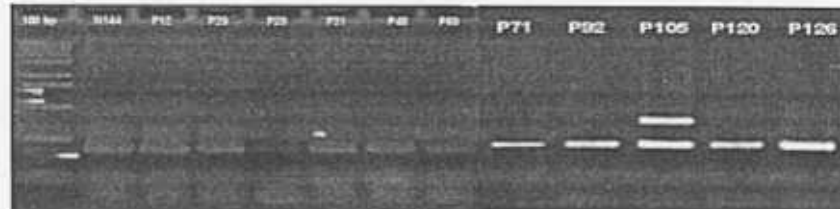
ข)



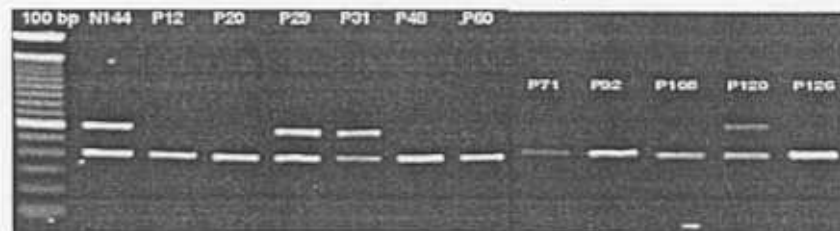
100 bp = 100 bp DNA ladder แถบขนาด ~ 400 bp คือ β actin internal control แถบขนาด ~ 230 bp คือ integrin α_v

รูปที่ 4.4 ผล RT-PCR Integrin α_6 ก) CHCA และ ข) เนื้อเยื่อตับปกติ
ในเนื้อเยื่อตับปกติตรวจพบ 2 ตัวอย่าง ใน CHCA ตรวจพบ 4 ตัวอย่าง

ก)



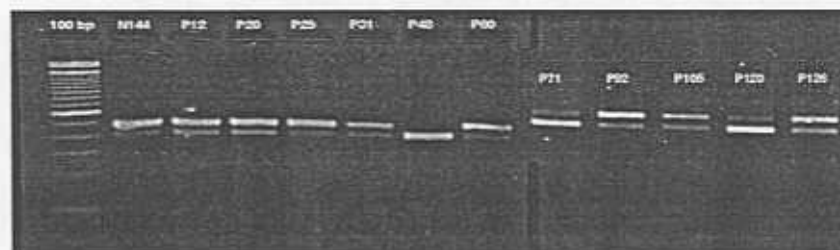
ข)



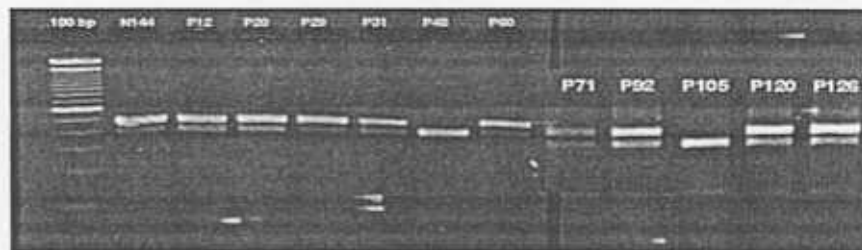
100 bp = 100 bp DNA ladder แถบขนาด ~ 400 bp คือ β actin internal control, แถบขนาด 600 bp คือ integrin α_6

รูปที่ 4.5 ผล RT-PCR Integrin β_1 ก) CHCA และ ข) เนื้อเยื่อตับปกติ
ในเนื้อเยื่อตับปกติตรวจพบ 12 ตัวอย่าง ใน CHCA ตรวจพบ 10 ตัวอย่าง

ก)



ข)



100 bp = 100 bp DNA ladder แถบขนาด ~ 400 bp คือ β actin internal control, แถบขนาด 500 bp คือ integrin $\beta 1$

รูปที่ 4.6 ผล RT-PCR Integrin β_3 ก) CHCA และ ข) เนื้อเยื่อตับปกติ
ในเนื้อเยื่อตับปกติตรวจพบ 3 ตัวอย่าง ใน CHCA ตรวจพบ 3 ตัวอย่าง

ก)



ข)



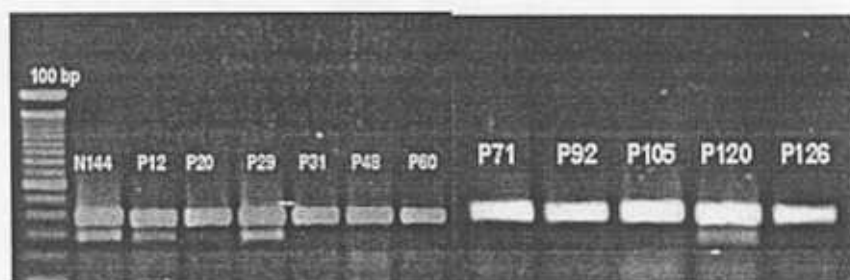
100 bp = 100 bp DNA ladder แถบขนาด ~ 400 bp คือ β actin internal control, แถบขนาด 350 bp คือ integrin β_3

รูปที่ 4.7 ผล RT-PCR Integrin β_4 ก) CHCA และ ข) เนื้อเยื่อตับปกติ ในเนื้อเยื่อตับปกติตรวจไม่พบ ใน CHCA ตรวจพบ 4 ตัวอย่าง

ก)



ข)



100 bp = 100 bp DNA ladder แถบขนาด ~ 400 bp คือ β actin internal control แถบขนาด 300 bp คือ integrin β_4

4.2.4 การศึกษาโดย Western Blot Analysis

Western blot analysis เป็นการวิเคราะห์หาโปรตีนที่สนใจ โดยการใช้แอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีนชนิดนั้น เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตาม (probe) โดยใน ขั้นตอนจะต้องแยกโปรตีน (protein lysate) จากเนื้อเยื่อ จากนั้นนำ lysate ที่ได้มาแยก โปรตีนต่างๆออกจากกันโดยเทคนิค Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โปรตีนที่อยู่ใน lysate จะแยกออกจากกันตามขนาด โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนไปบนเจลได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ในขั้นตอนนี้ถ้าทำ การย้อมสีเจลจะพบโปรตีนต่างๆแยกเป็นแถบจำนวนหลายแถบ ซึ่งยังไม่สามารถบอกได้ ว่าเป็นโปรตีนชนิดใด จะต้องถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปอยู่บน nitrocellulose membrane (หรือ membrane ชนิดอื่นที่เหมาะสม) เสียก่อน จากนั้นย้อมโปรตีนบน membrane ด้วย แอนติบอดี ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า immunoblot หรือ Western blot ขั้นตอนเริ่มจากการย้อม membrane ด้วยแอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ซึ่งจะไปจับกับโปรตีนที่ต้องการตรวจ หายอย่างจำเพาะ เกิดเป็น antibody-protein complex บน membrane หลังจากล้างส่วนเกิน

ออก ย้อมด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง โดยแอนติบอดีตัวที่สองนี้ทำหน้าที่เป็นตัวติดตาม เพราะปลายด้านหนึ่งถูกเชื่อมกับเอนไซม์ (ในที่นี้คือ Alkaline phosphatase conjugated second antibody) แอนติบอดีตัวที่สองจะไปจับอย่างจำเพาะกับ antibody-protein complex เมื่อล้างส่วนที่เกินออกไป แล้วใส่ enzyme substrate (ในที่นี้คือ BCIP/NBT) ลงไปในปฏิกิริยา จะเกิดการย่อย substrate ได้สารที่มีสีม่วงเข้มปรากฏที่แถบของโปรตีนที่แอนติบอดีตัวแรกไปจับ

ในการทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อ มะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับปกติ จำนวน 2-3 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลบวกต่อ integrins ชนิดที่สนใจในการตรวจด้วย RT-PCR ปรากฏว่าในการทำการทดลองครั้งนี้ ตรวจไม่พบ integrins ในตัวอย่างที่เลือกมา และไม่พบ β -actin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากในเซลล์ ด้วย ทั้งนี้โดยได้ทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ และทดลองใช้แอนติบอดีในความเข้มข้น ตั้งแต่ 1:10 - 1:1000 dilution หลังจากที่ได้ทดลองซ้ำหลายครั้งและไม่เป็นผลสำเร็จ ผู้วิจัยจึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อในเนื้อเยื่อส่วนที่เหลือ

ปัญหาที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจาก monoclonal antibody ที่ใช้ในการศึกษามี ความสามารถในการจับโปรตีน (binding affinity) ได้ไม่ดี หรืออาจเป็นเพราะ integrin proteins ในตัวอย่างมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีนี้ สาเหตุอีกประการหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ โปรตีนที่แยกด้วย SDS-PAGE จะสูญเสียโครงสร้างสามมิติซึ่งทำให้ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า Integrins นั้นนอกจากจะมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการจับระหว่างเซลล์และ extracellular matrix proteins ยังมีบทบาทสำคัญในการส่งต่อสัญญาณเข้า-ออกเซลล์สองทิศทาง ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเซลล์หลายประการ เช่น การแบ่งตัว การเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ ตลอดจนรูปร่างลักษณะของเซลล์ มีหลักฐานจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งจะมีแบบแผนการแสดงออกของ integrins แตกต่างไปจากเซลล์ปกติทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ

จากผลการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการแสดงออกของ integrins ในมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (HCC) และ cholangiocarcinoma (CHCA) มีแบบแผนที่ค่อนข้างจำเพาะซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งทั้งสองชนิดนี้ได้ ซึ่ง integrins ที่เคยมีผู้ทำการศึกษาโดย immunohistochemistry และพบว่ามีกระจายตัวแตกต่างกัน คือ integrin VLA- α_1 , และ VLA- β_4 (VLA = β_1 subgroup) กล่าวคือ integrin β_4 พบในเยื่อบุท่อน้ำดีและมะเร็งชนิด CHCA แต่ไม่พบทั้งใน HCC และเนื้อตับปกติ ส่วน integrin α_1 พบในเนื้อตับปกติและมะเร็งชนิด HCC แต่ไม่พบในมะเร็งชนิด CHCA และเยื่อบุท่อน้ำดี (Volpes et al. 1993) และในการศึกษาการแสดงออกของ integrins ในเนื้อเยื่อตับ และ HCC โดยเทคนิค RT-PCR พบว่ามะเร็งตับมีการแสดงออกของ integrin α_1 , α_2 , α_3 , α_6 , และ β_1 แต่ไม่พบ β_4 ส่วนในเนื้อเยื่อตับปกติพบเฉพาะ integrin α_1 , และ β_1 ในปริมาณใกล้เคียงกับที่พบใน HCC (Ozaki et al. 1998)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค RT-PCR ศึกษาการแสดงออกของ integrins α_1 , α_v , α_6 , β_1 , β_3 , และ β_4 ในเนื้อเยื่อมะเร็ง CHCA เปรียบเทียบกับเนื้อตับปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 12 ราย จากการวิเคราะห์ปริมาณ integrins mRNA ในเนื้อเยื่อตับปกติพบที่มีการแสดงออกของ integrins α_1 (100%), α_v (91.7%), และ β_1 (100%) ในปริมาณสูงและสามารถตรวจพบในเนื้อเยื่อตับเกือบทุกราย ในขณะที่พบ integrin α_6 เพียง 2 ราย (%), integrin β_3 3 ราย (%), ที่น่าสนใจคือไม่พบ integrin β_4 ในเนื้อเยื่อตับปกติแม้แต่รายเดียว ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับที่ Volpes et al (1993), Enjoji et al. (1997), และ Ozaki et al. (1998), เคยรายงานว่าเซลล์ตับมีการแสดงออกของ integrin α_1 , และ β_1 แต่ไม่มี integrin β_4

สำหรับในเนื้อเยื่อมะเร็ง CHCA พบการแสดงออกของ integrins α_1 (83.3%), α_v (100%), และ β_1 (83.3%) ในปริมาณสูงเช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อตับปกติ ส่วน integrins β_3 นั้นมีการแสดงออกน้อยทั้งใน CHCA และเนื้อเยื่อตับปกติ (25%) และที่พบว่ามี ความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อสองชนิดนี้คือ integrin α_6 และ β_4 โดยเฉพาะ β_4 นั้นพบใน CHCA ถึง 4 ราย

(33.3%) ในขณะที่ไม่พบในเนื้อเยื่อตับเลย ส่วน α_6 นั้น พบใน CHCA 4 ราย (33.3%) และพบในเนื้อเยื่อตับปกติพบเพียง 2 ราย (16.7%) ซึ่งสัญญาณ (signal) ที่ตรวจพบค่อนข้างอ่อน ผลการทดลองครั้งนี้ในบางส่วนสอดคล้องกับการศึกษาของ Volpes ซึ่งรายงานว่า integrins β_1 พบทั้งในเนื้อเยื่อตับปกติ, HCC, และ CHCA ในขณะที่ α_6 และ β_4 พบเฉพาะใน biliary epithelium และ CHCA ไม่พบในเซลล์ตับปกติ แต่อย่างไรก็ดีอัตราการตรวจพบ integrins 2 ชนิดนี้ใน CHCA มีเพียง 33.3% ซึ่งการที่อัตราการตรวจพบต่ำอาจมีสาเหตุจากปัจจัยต่อไปนี้คือ ประการที่หนึ่งเนื้อเยื่อที่ตัดมามีส่วนเนื้อเยื่อตับปนมาด้วยและมีส่วนที่เป็นท่อน้ำดีปริมาณน้อย เมื่อนำมาแยก total RNA จึงได้ส่วนที่เป็น polyA⁺ RNA ของ integrins ชนิดดังกล่าวปริมาณน้อยมากจนตรวจไม่พบ ประการที่สอง อาจเกิดจากการที่ RNA สลายตัวไปดังจะเห็นว่าเมื่อตรวจสอบ total RNA integrity ของตัวอย่าง ส่วนใหญ่จะมีลักษณะที่แสดงถึงการสลายตัวของ RNA ไปบางส่วน และสาเหตุประการที่สามอาจเกี่ยวข้องกับระยะการดำเนินโรค ซึ่งตามที่ Volpes ได้สังเกตพบว่าใน poorly differentiated CHCA ปริมาณการแสดงออกของ integrin α_2 , α_3 , α_3 , และ β_4 จะลดน้อยลงกว่าที่พบใน normal biliary epithelium และ well-differentiated CHCA ดังนั้นในระยะที่โรคดำเนินไปมากการตรวจหา integrins α_6 และ β_4 จึงอาจมีโอกาสดตรวจพบได้น้อยลง

ส่วนผลการตรวจ integrin α_1 นั้นขัดแย้งกับที่ Volpes และ Enjoji เคยรายงานไว้ว่าพบเฉพาะในเนื้อเยื่อตับและ HCC แต่ไม่พบใน CHCA อาจเป็นไปได้ว่าวิธีการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งเป็นการแยก total RNA จากเนื้อเยื่อ CHCA มีเนื้อตับปนมาด้วยเนื่องจากการยากที่จะแยกเอาเฉพาะ CHCA ซึ่งมีกำเนิดจาก biliary epithelium การปนเปื้อนของเนื้อเยื่อตับทำให้ตรวจพบ integrin α_1 ซึ่งมีปริมาณสูงในเนื้อเยื่อตับที่มีต้นกำเนิดจาก hepatocytes

จากผลการวิจัยครั้งนี้ สรุปได้ว่า แบบแผนการแสดงออกของ integrins ในมะเร็งชนิด CHCA แตกต่างจากเซลล์ตับปกติ และที่มีความชัดเจนมากที่สุดคือ integrins β_4 แบบแผนการแสดงออกของ integrins และความลักษณะการแสดงออกที่จำเพาะในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดนี้อาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้ช่วยวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งของตับที่มีกำเนิดจาก biliary tract ออกจาก hepatocytes ได้ อย่างไรก็ตามการใช้ RT-PCR ในการตรวจหา integrins ในเนื้อเยื่อ มีข้อจำกัด เพราะการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ CHCA มักจะมีเนื้อเยื่อตับติดมาด้วย ทำให้ผลการตรวจมีความไวและความถูกต้องไม่สูงพอที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในทางการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาได้ สำหรับการตรวจโดยเทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดี (immunohistochemistry) ซึ่งได้เคยมีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงในการตรวจหาชนิดและการกระจายตัวของ integrins ในเนื้อเยื่อ จึงน่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะนำมาใช้ในการตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อช่วยวินิจฉัย CHCA และ liver cancers อื่น ๆ ส่วนการตรวจด้วยเทคนิค flow cytometry นั้น เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจหาชนิด integrins บนผิวเซลล์โดยตรง แต่มีข้อจำกัดคือ flow cytometry นั้นใช้สำหรับการตรวจเซลล์ที่อยู่แยกกันเดี่ยว ๆ เช่น เม็ดเลือดขาว และ เมลาโนมา

เป็นต้น แต่ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจเนื้อเยื่อ และ solid cancers เช่น CHCA และ liver cancers อื่น ๆ ได้

อย่างไรก็ดี การนำ integrins มาใช้ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีนั้น ควรใช้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่นอาจใช้ integrins α_1 , α_6 , และ β_4 เพื่อให้มีแบบแผนการแสดงออกที่จำเพาะต่อ CHCA มากกว่ามะเร็งชนิดอื่นของตับ และควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยจำนวนมากเพื่อให้ทราบข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยแยกโรค

นอกจากมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคแล้ว การที่ทราบข้อมูลว่า integrins α_1 , α_v , β_1 , และ β_4 มีการแสดงออกใน CHCA อาจมีประโยชน์ในการรักษามะเร็งชนิดนี้ในอนาคต เพราะในปัจจุบันมีความสนใจอย่างกว้างขวางในการวิจัยและพัฒนายายับยั้งการทำงานของ integrins (integrin antagonists) เพื่อประโยชน์ในการรักษามะเร็งชนิดต่าง ๆ

ท้ายที่สุด คณะผู้วิจัยหวังว่าข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจศึกษาการแสดงออกของ integrins ในมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยและการรักษาโรคต่อไป

บรรณานุกรม

- Albelda SM, Buck CA. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4:2868-2880.
- Alden ME, Waterman FM, Topham AK, et al. 1995. Cholangiocarcinoma: clinical significance of tumor location along the extrahepatic bile duct. *Radiology.* 197:511-516.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, et al. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 50:197-258.
- Brumm C, Schulze C, Charels K, et al. 1989. The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology.* 14:503-13.
- Chao C, Lotz MM, Clarke AC, et al. 1996. A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 56:4811-4819.
- Critchley DR. 2000. Focal adhesions- the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol.* 12:133-139.
- Dedhar S, Hannigan GE. 1996. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 8:657-69
- De Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, et al. 1999. Biliary tract cancers. *New Engl J Med.* 341:1368-1378.
- Enjoji M, Nakashima M, Sakai H, et al. 1998. Integrins: Utility as cell type-and stage-specific markers for hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol Animal.* 34:25-27.
- Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, et al. 1995. High expression level of $\alpha 6$ integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res.* 55:901-906.
- Green A, Uttaravichien T, Bhudhisawasdi V, et al. 1991. Cholangiocarcinoma in Northeast Thailand: a hospital-based study. *Trop Geogr Med.* 43:193-198.
- Gui GP, Wells CA, Browne PD, et al. 1995. Integrin expression in primary breast cancer and its relation to axillary nodal status. *Surgery.* 117:102-108.
- Hemler ME. 1998 Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 10:578-585.

- Hurlimann J, Gardiol D. 1991. Gastrointestinal stromal tumours: an immunohistochemical study of 165 cases. *Histopathology*. 19:311-20
- Klein CE, Steinmayer T, Kaufman D, et al. 1991. Identification of a melanoma progression antigen as integrin VLA-2. *J Invest Dermatol*. 96:281-284.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. 1998. Cancer Statistics, 1998. *Ca Cancer J Clin*. 48:192.
- Marshall JF, Hart IR. 1996. The role of alpha v-integrins in tumour progression and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 7:129-38.
- Masumoto A, Arao S, Otsuki M. 1999. Role of β_1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 29:68-74.
- Mizejewski GJ. 1999. Roles of integrins in cancer: survey of expression pattern. *Proc Sc Exp Biol Med*. 222:124-138.
- Nakeep A, Pitt HA, Sohn TA, et al. 1996. Cholangiocarcinoma: a spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg*. 224:463-75.
- Nichols JC, Gores GJ, LaRusso NF, et al. 1993. Diagnostic roles of serum CA 19-9 for cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc*. 68:874-879.
- O'Toole TE, Kalagiri Y, Faull RJ, et al. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol*. 124:1047-1059.
- Ozaki I, Yamamoto K, Mizuta T, et al. 1998 Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma. *Gut*. 43:837-842.
- Pairojkul C, Shirai T, Hirohashi S, et al. 1991. Multistage carcinogenesis of liver-fluke-associated cholangiocarcinoma in Thailand. *Princess Takamatsu Symp* 22:77-86.
- Porter JC, Hogg N. 1998. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol*. 8:390-396.
- Shaw LM, Chao C, Wewer UM, et al. 1996. Function of the $\alpha_6\beta_1$ integrin in metastatic breast carcinoma assessed by expression of a dominant-negative receptor. *Cancer Res*. 56:959-963.
- Shin HR, Lee CU, Park HJ, et al. 1996. Hepatitis B and C virus, Clonorchis sinensis for the risk of liver cancer: a case-control study in Pusan, Korea. *Int J Epidemiol*. 25:933-40.

- Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR, Mairiang P, et al. 1994. arasite-associated morbidity: liver fluke infection and bile duct cancer in northeast Thailand. *Int J Parasitol.* 24:833-43
- Smythe WR, LeBel E, Bavaria JE, et al. 1995. Integrin expression in non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Metastasis Rev.* 14:229-239.
- Tennenbaum T, Weiner AK, Belanger AJ, et al. 1993. The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 53:4803-10
- Torimura T, Inuzuka S, Tamaki S, et al. 1997 Coordinated expression of integrin $\alpha_6\beta_1$ and laminin in hepatocellular carcinoma. *Human Pathol.* 28:1131-1138.
- Vatanasapt V, Tangvoraphonkchai V, Titapant V, et al. 1990. A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21:489-94
- Virtanen I, Laitinen L, Korhonen M, et al. 1990. Integrins in human cells and tumors. *Cell Differ Dev.* 32:215-228.
- Volpes R, van den Oord JJ, et al. 1993. Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. *Am J Pathol.* 142: 1483-1492.
- Yamada KM, Geiger B. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 9:76-85.

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสของ human integrin oligonucleotide primers

| Primers | Sequences | Tm | Size of RT-PCR Product |
|---------------------------|----------------------------------|------|---------------------------|
| Integrin α 1 sense | 5'AGAATGCAGCACTCAACTGG'3 | 58.8 | 212 |
| Antisense | 5'GCAACAAGTACCTCTTCGGTG'3 | 59.6 | |
| Integrin α V sense | 5'TTC TTG GTG GTC CTG GTA GC '3 | 47.0 | 238 |
| Antisense | 5'GTC CTT GCT GCT CTT GGA AC '3 | 51.9 | |
| Integrin α 6 sense | 5'GCA AGG AAG ATC AGT GGA TGG '3 | 50.1 | 602 |
| Antisense | 5'TCC ATC GAA TAT GTG CTC AGG '3 | 48.0 | |
| Integrin β 1 sense | 5'GTGTGAGATGTGTCAGACCTG '3 | 56.1 | 495 |
| Antisense | 5'CTTCGGATTGACCACAGTTG '3 | 58.9 | |
| Integrin β 3 sense | 5'AGA TTG GAG ACA CGG TGA GC '3 | 49.3 | 348 |
| Antisens | 5'ATT GAC CAC AGA GGC ACT CG '3 | 43.5 | |
| Integrin β 4 sense | 5'GAAGACCACTACATGCTGCG '3 | 59.2 | 300 |
| Antisense | 5'AGATCTGCCTGTAGACCTCG '3 | 56.7 | |
| β -actin* sense | 5'TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG '3 | 52.6 | 414 |
| Antisense | 5'CCA TCT CTT GCT CGA AGT CC '3 | 49.5 | |

* internal control

ภาคผนวก ข
สารละลายและบัฟเฟอร์

30% acrylamide/0.8% bisacrylamide

Acrylamide 30.0 g

N,N'-methylenebisacrylamide 0.8 g

Distilled water qs to 100 ml

(Filter the solution through a 0.45 μ m filter and store at 4°C in the dark. Discard after 30 days, as acrylamide gradually hydrolyzes to acrylic acid and ammonia)

DEPC-treated water

0.01% diethylpyrocarbonate (DEPC) in distilled water

(Shake vigorously, stand overnight, then autoclave)

0.5 M EDTA (pH 8.0)

Dissolve 95.05 g of Na₂EDTA in approximately 400 ml H₂O. Adjust pH to 8.0 with 6 N NaOH. Then bring volume to 500 ml and autoclave

EtBr (10 mg/ml)

Dissolve 100 mg EtBr in 10 ml H₂O. Stir well and store at 4°C in an amber bottle.

5X MOPS buffer

0.2 M MOPS pH 7.0

0.05 M sodium acetate

0.005 M EDTA pH 8.0

Distilled water qs to 1,000 ml

RNA sample buffer:

10.0 μ l deionized formamide

3.5 ml 37% formaldehyde

2.0 ml MOPS 5X buffer

Dispense into 500 μ l aliquots and store at -20°C in tightly sealed screw cap tubes.

Can be stored for up to 6 months.

RNA loading buffer

50% glycerol

1 mM EDTA

0.4% bromophenol blue

4x TrisCl/SDS, pH 6.8 (0.5 M Tris•Cl containing 0.4% SDS)

Tris base 6.05 g

Distilled water qs to 100 ml

(Adjust to pH 6.8 with 1 N HCl, filter the solution through a 0.45 μ m filter, add 0.4 g SDS, and store at 4°C up to 1 month.)

4x TrisCl/SDS, pH 8.8 (1.5 M Tris•Cl containing 0.4% SDS)

Tris base 91 g

Distilled water qs to 500 ml

(Adjust to pH 8.8 with 1 N HCl, filter the solution through a 0.45 μ m filter, add 2 g SDS, and store at 4°C up to 1 month.)

10X Tris-buffered saline (TBS)

200 mM Tris.Cl, pH 7.5

5 M NaCl

(Store at 4°C for several months)

Towbin Transfer buffer (TTB) (pH ~8.3-8.4)

Tris base 3.03 g
Glycine 14.40 g
Methanol 200.00 ml
Distilled water qs to 1,000 ml

Tween 20/TBS (TTBS)

0.05% Tween 20 in TBS, pH 7.5
(Store at 4°C for several months)

ประวัตินักวิจัย

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อภาษาไทย นงนิต์ อีระวัฒนสุข

ชื่อภาษาอังกฤษ Nongnit Teerawatanasuk

รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -

คุณวุฒิ ภ.บ (เกียรตินิยมอันดับ 1), Ph.D. (Pharmacology)

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

สถานที่ทำงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

โทรศัพท์ 045-288382-3

โทรสาร 045-288384

ประวัติการศึกษา

| ปีที่จบการศึกษา | ระดับปริญญา | ชื่อปริญญา | สาขา | สถาบันการศึกษา | ประเทศ |
|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|--------|
| 2541 | เอก | Ph.D | Pharmacology | Indiana University | USA |
| 2533 | โท | วทม. | เภสัชวิทยา | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |
| 2525 | ตรี | ภ.บ. | เภสัชศาสตร์ | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

pharmacology, molecular biology, pharmaceutical biotechnology

ผลงานวิชาการ

Teerawatanasuk N., Skalnik DG, and Carr LG. CCAAT displacement

protein (CDP) negatively regulates transcription of the human *tryptophan hydroxylase* gene. *Journal of Neurochemistry* 72, 1999, 29-39.

Teerawatanasuk N, and Carr LG. CBF/NF-Y activates transcription of the

human *tryptophan hydroxylase* gene through an inverted CCAAT box. *Molecular Brain Research* 55, 1998, 61-70.

Teerawatanasuk N, Reed GE, Eichholtz S, Carr LG. The mouse

tryptophan hydroxylase (mTHP) promoter interacts with members of the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily. *Alcoholism* 21(197), 1997: 75A.

- Teerawatansuk N, Sripanidkulchai B. Anti-angiogenesis: New approaches in cancer treatment.
Srinagarind Medical Journal. 2001;16:292-301.
- Teerawatanasuk N. Role of COX-2 inhibitors in cancer prophylaxis and treatment.
The Journal of Pharmacology. 2002 (Inpress)

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อภาษาไทย บังอร ศรีพานิชกุลชัย

ชื่อภาษาอังกฤษ Bung-orn Sripanidkulchai

รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ

คุณวุฒิ ภ.บ (เกียรตินิยมอันดับ 1), Ph.D. (Cell Biology)

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

สถานที่ทำงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

โทรศัพท์ 045-288382-3

โทรสาร 045-288384

ประวัติการศึกษา :

| ปีจบการศึกษา | ระดับปริญญา | ชื่อปริญญา | สาขา | สถาบันการศึกษา | ประเทศ |
|--------------|-------------|------------|--------------|------------------|--------|
| 2529 | เอก | Ph.D | Cell biology | U of Alabama | USA |
| 2517 | โท | วทม. | ชีวเคมี | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |
| 2515 | ตรี | ภ.บ. | เภสัชศาสตร์ | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- biochemistry, cell biology

ผลงานวิชาการ

- 1) บังอร ศรีพานิชกุลชัย , อัญชลี ตัดตะวะศาสตร์ , พิสมัย เหล่าภัทรเกษม, อารมย์ ตัดตะวะศาสตร์ และกิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย.ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของพืชสมุนไพรท้องถิ่น 8 ชนิด. วารสารวิจัย มข. (submitted 2000).
- 2) Sripanidkulchai , B.,C. Furihata, K. Hirose, and T. Matsushima, Detection of DNA single-strand breaks in hamster liver treated with carcinogen. Thai J. Toxicology 7 : 23-30, 1991.
- 3) Sripanidkulchai, B., U. Tattawasat, P. Laupatarakasem, U. Vinitketkumneun, C. Furihata and T. Matsushima. Anticarcinogenic Effects of Thai Herbal Medicine Proceeding of the Frist Cancer Research Symposium, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 1 : 103-117, 1991.
- 4) บังอร ศรีพานิชกุลชัย, สมทรง ณ นคร, วริมา วงศ์พานิชย์ และพรณวิภา ธิัญญคุปต์. การสำรวจพฤติกรรมการใช้สมุนไพรรักษาอาการปัสสาวะขัดในเขตอำเภอพล จังหวัดขอนแก่น. วารสารวิจัย มข. 5(1) : 2543 หน้า 4-10.

- 5) Sripanidkulchai, B., Wongpanich, V., Laupatarakasem, P., Suwansaksri, J., and Jirakulsomchok, D. Studies on diurectic effects of selected Thai inditenuous medicinal plants. *J. Ethno Pharmacology* (submitted 2000).
- 6) Sripanidkulchai, B., and J.M. Wyss. A comparative analysis of (3H)-paraaminoclonidine binding to renal tissues of hypertensive and normotenmsive rats. *J. Sci. Soc. Thailand* 14:263-276, 1998.
- 7) Sripanidkulchai, B., and J.M. Wyss. The development of renal α_2 -adrenoceptors and their corelation to catecholaminergic innervation, *Brain Res.* 400 : 91-100, 1987.
- 8) Sripanidkulchai, B., R. Dawson, S. Oparil and J.M. Wyss. Two (3H) -p-aminoclonidine binding sites in the rat kidney. *Am J. Physiol.* 252 : F283-F290, 1987.
- 9) Wyss, J.M., and B. Sripanidkulchai. An autoradiographic analysis of the time of origin of neurons in the hypothalamus of cat. *Brain Res* 353 : 89-98, 1984.
- 10) Wyss, J.M., and B. Sripanidkulchai. The developmetn of ammon horn and the fascia dentata in the cat : a (3H) - Thymidine analysis. *Brain Res*, 350 : 185-198, 1984.
- 11) Wyss, J.M., B. Sripanidkulchai and T. Hickey. An analysis of the time of origin of neurons in the entorhinal and subicular cortecess of the cat. *J, Comp. Neurol.* 221 : 341-357, 1983.

ชื่อภาษาไทย วิจิตร เกิดผล
 ชื่อภาษาอังกฤษ Wichit Kirgpon
 รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -
 ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
 สถานที่ทำงาน

ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์
 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ประวัติการศึกษา

| ปีที่จบการศึกษา | ระดับปริญญา | ชื่อปริญญา | สาขา | สถาบันการศึกษา | ประเทศ |
|-----------------|-------------|------------|-----------------|--------------------------|--------|
| 25 | เอก | Ph.D | Pharmacy | U of Southern California | USA |
| 25 | โท | วทม. | ฟิสิกส์การแพทย์ | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |
| 25 | ตรี | ภ.บ. | เภสัชศาสตร์ | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- เภสัชรังสี ฟิสิกส์การแพทย์ทางรังสี เวชศาสตร์นิวเคลียร์

ผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่

- 1) Study of SGPT and SGOT level in rat liver expored with Co060
 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก
- 2) In ^{113m} labled monoclonal antibodies for tumer of imaging.
 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก
- 3) A program for calculation of intracavitary radiation dose delevered by Ralstron Co-60 after loading unit.
 สถานภาพในการทำวิจัย: ผู้วิจัยหลัก
- 4) Development of Computer Software for Radiotherapy System.
 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก
- 5) Calcium metaboliain in stunting children in Khon Kaen, Thailand. 1986-1990.
 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก
- 6) Thyroid Hormones (TSH, T3, T4) in thyroiditis and autoimmune diseases Patient (1989-1990)
 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก
- 7) Study of thyroid hormone levels and serum Ca levels in the normal juveniles (1989-1990)
 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก

- 8) Treatment of radiation Proctitis by using stabilized Aloe Gel in addition of
Conservative method. 1993-1995.

สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยหลัก

ชื่อภาษาไทย นาง ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา
 ชื่อภาษาอังกฤษ Mrs. Chutinun Prasitpuriprecha
 รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -
 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
 สถานที่ทำงาน

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190
 โทรศัพท์ 045-288382-3
 โทรสาร 045-288384



ประวัติการศึกษา

| ปีที่จบการศึกษา | ระดับปริญญา | ชื่อปริญญา | สาขา | สถาบันการศึกษา | ประเทศ |
|-----------------|-------------|------------|-------------|-----------------------|--------|
| 2534 | โท | ภ.ม. | จุลชีววิทยา | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | ไทย |
| 2530 | ตรี | ภ.บ. | เภสัชศาสตร์ | มหาวิทยาลัยมหิดล | ไทย |

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- ภูมิคุ้มกันวิทยา จุลชีววิทยา ไวรัสวิทยา

ผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่

- 1) ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา, อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ, วรัชญา ศิลาอ่อน, จันทรวดี โล่เสถียรกิจ, เพียงเพ็ญ อธิสตา. ความคงตัวและประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์. วารสารวิชาการ ม.อบ. : 2544,3:14-24.