



รายงานการวิจัย

บทบาทหน้าที่ของโปรตีนเหมือนไคตินเนส (YKL-40)
ในการส่งเสริมการเจริญพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี (ระยะที่ 2)

**Roles of Chitinase-1-Like 3 Proteins (YKL-40) in
tumor progression of Cholangiocarcinoma ;phase 2**



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

บทบาทหน้าที่ของโปรตีนเหมือนไคติเนส (YKL-40)
ในการส่งเสริมการเจริญพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี (ระยะที่ 2)

**Roles of Chitinase-1-Like 3 Proteins (YKL-40) in
tumor progression of Cholangiocarcinoma ;phase 2**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร.ชุตินา ตลับนิล
สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สามารถบรรลุเสร็จสิ้นตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ คำนัน ดร.ชุตินา ตลับนิล หัวหน้าโครงการขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์.ดร. วิภา สุจินต์ และ นางสาวสุนิสา ทองสม ผู้ร่วมวิจัย ที่ได้มีส่วนร่วมในการออกแบบการทดลอง ปฏิบัติการทดลองและการวิเคราะห์ผลทดลองต่างๆที่ได้กล่าวไว้ในรายวิจัเล่มนี้

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ ศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสพิศ วงศ์คำ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างทำการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556

ชุตินา ตลับนิล

สิงหาคม 2558



บทคัดย่อภาษาไทย

โปรตีน YKL-40 ในซีรัมที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปกติสามารถตรวจพบได้ในมะเร็งหลายๆชนิดและมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีหรือระยะรอดชีพสั้นในผู้ป่วยมะเร็ง โดยหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-40 มีบทบาทในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อนำอาหารมาเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ในการศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบโปรตีน YKL-40 ในซีรัมที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติและยังพบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีปริมาณโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้นกว่าค่าปกติมีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพสั้น จากการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าโปรตีน YKL-40 ในซีรัมที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นนี้มีแหล่งผลิตมาจากเซลล์หลายๆชนิดได้แก่เซลล์ตับ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 พบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกที่ต่ำกว่าเซลล์ตับและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อมะเร็ง ด้วยเหตุนี้จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ศึกษาบทบาทของโปรตีน YKL-40 ในด้านการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีผ่านการกระตุ้นของโปรตีน YKL-40 ที่มีแหล่งผลิตจากภายนอกและ/หรือภายในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยผู้วิจัยได้ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 (recombinant YKL-40; rYKL-40) และนำไปทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบโปรตีน rYKL-40 สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้น รวมทั้งมีผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีมีความสามารถในการยึดเกาะและเคลื่อนที่ได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย ในขณะที่การทดสอบบทบาทหน้าที่ของโปรตีน YKL-40 ที่มีแหล่งผลิตมาจากภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเอง ผลการทดลองที่เกิดขึ้นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาการกระตุ้นด้วยโปรตีน r YKL-40 คือ การแบ่งตัวของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์แบบอิสระจากการยึดเกาะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าหากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 มากขึ้นจะมีผลให้เซลล์มีคุณสมบัติในการดื้อยาโดยเฉพาะยาเคมีบำบัดชนิด ซิสปลาติน (cisplatin) โดยสรุปการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-40 มีบทบาทในด้านการส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีทั้งจากการกระตุ้นจากภายนอกและภายในเซลล์ และยังส่งเสริมการดื้อต่อยาเคมีบำบัดด้วย ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน YKL-40 ในซีรัมหรือในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่บอกระดับการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี และโปรตีน YKL-40 อาจจะถูกนำมาพัฒนาใช้เป็นยีนเป้าหมายสำหรับการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

Abstract

Elevated YKL-40 plasma concentration has been found in several malignancies and is associated with poor prognosis and short survival time of the cancer patients. It has also been shown that YKL-40 can stimulate the growth of tumor by regulating angiogenesis. We previously showed that YKL-40 plasma concentration is significantly increased in CCA patients. Overall survival is worst in patients with elevated YKL-40 plasma concentration. However YKL-40 is rarely expressed in CCA tumor cells, but highly expressed in liver cells and connective tissue at intratumoral stroma. In this study, we demonstrated further that YKL-40 has an autocrine and paracrine functions in CCA progression. We expressed and purified recombinant YKL-40 (rYKL-40) in mammalian system for investigating the paracrine effects. Purified rYKL-40 protein significantly enhanced growth, cells adhesion, and migration of CCA cells. Similar effects were seen in CCA cells with exogenous YKL-40 overexpression that cell proliferation, anchorage-independent growth, and migration of CCA cells were increased. Moreover, overexpression of YKL-40 also led to an increased resistance to cisplatin. In summary, the present study showed that YKL-40 had an autocrine and paracrine functions to promote CCA progression and chemoresistance of CCA cells. Hence, YKL-40 expression level in plasma or CCA cells may use as a marker for monitoring disease progression and chemotherapeutic response in CCA and YKL-40 may serve as a potential therapeutic molecular target for treating CCA.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	5
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	5
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	8
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	9
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์	
วิจารณ์ผลการวิจัย	15
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	20
ประวัติผู้วิจัย	24



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ผลการกระตุ้นด้วย recombinant YKL-40 protein (rYKL-40) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	10
ภาพที่ 2	การแสดงออกของโปรตีน pERK1/2, ERK1/2 และ pAKT ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน rYKL-40 80 ng/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	11
ภาพที่ 3	ผลการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้น โดยรูปแบบวิธี overexpression	13
ภาพที่ 4	เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้นแบบถาวร ส่งเสริมการคือต่อยาซิสปลาติน (cisplatin)	14



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โปรตีนเหมือนไคตินเนส หรือ chitinase-like proteins (CLPs) ถูกค้นพบครั้งแรกในสารคัดหลั่งจากเนื้อเยื่อบุคติดปกติและในซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้ออหิวาต์แอฟริกา โดย CLPs เป็นกลุ่มของโปรตีนในแฟมิลี 18 โกลโคซิล ไฮโดรเลส ที่มีโครงสร้าง (β/α)₈ TIM barrel domain เหมือนเอนไซม์ไคตินเนส (Houston et al., 2003) ที่มีร่องจับกับไคตินได้แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทได้ เนื่องจากมีกรดอะมิโน Glu ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น (Fusetti et al. 2003) ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนเหมือนไคตินเนสที่เพิ่มขึ้นผิดปกติในซีรัมของผู้ที่มีภาวะอหิวาต์แอฟริกาหรือผู้ป่วยมะเร็ง โดยโปรตีนเหมือนไคตินเนสนี้คือ YKL-40 (หรือรู้จักในชื่อ chitinase-3-like-1 และ human cartilage glycoprotein-39) โปรตีนนี้เป็นไกลโคโปรตีนที่จับกับ heparin sulfate แบบจำเพาะ และมีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa มีลำดับของกรดอะมิโนด้านปลาย N (N-terminus) สามตัวเรียงกันคือ tyrosine-lysine-leucine หรือ Y-K-L และโปรตีนนี้ค้นพบครั้งแรกจากการศึกษา *In vitro* โดยพบว่าการหลั่งออกมามากโดย osteosarcoma cell line MG63 (Johansen et al., 1992) และจากการศึกษาหลายชิ้นพบว่าปริมาณ YKL-40 ที่เพิ่มขึ้นผิดปกติในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งหรือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีหรือมีระยะการรอดชีพสั้น ดังนั้น Johansen et al. (2006) ได้เสนอให้ใช้ YKL-40 เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของโรคมะเร็งชนิด solid tumor โดย ณ ปัจจุบันระดับการแสดงออกของ YKL-40 ในซีรัมถูกนำมาใช้เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค (prognostic biomarker) ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งสมอง มะเร็งรังไข่ และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น (Johansen et al., 2006; Johansen et al., 2008; Yamac et al., 2008; and Høgdall et al., 2009) ณ ปัจจุบันทางผู้วิจัยได้ตรวจพบว่ามียกระดับของโปรตีน YKL-40 เพิ่มสูงในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (ค่าเฉลี่ย 169.5 ng/mL) เมื่อเทียบกับระดับของโปรตีน YKL-40 ในกลุ่มคนปกติ (ค่าเฉลี่ย 46.92 ng/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับระดับของโปรตีน YKL-40 ในซีรัมพบผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระดับ YKL-40 มากกว่า 100 ng/mL จะมีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (ค่ามัธยฐานของระยะรอดชีพ หรือ median overall survival 207 วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระดับ YKL-40 น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 ng/mL (ค่ามัธยฐานของระยะรอดชีพ 336 วัน) นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณรอบๆมะเร็งท่อน้ำดี จากผลการแสดงออกของ YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณ YKL-40 ที่สูงเพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี น่าจะมีแหล่งสร้างและผลิตมาจากเซลล์หลายชนิด (Thongsom et al., under review by European Journal of Cancer)

อย่างไรก็ตามหน้าที่ทางชีวภาพ (biological functions) ของ YKL-40 ต่อการเกิดและการพัฒนาของมะเร็งนั้นยังไม่แน่ชัด แต่จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า YKL-40 มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (cell proliferation) การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ (differentiation) และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) เป็นต้น (Eurich et al. 2009; Shao et al., 2009; Lee et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบหลักฐานที่แสดงถึงหน้าที่ของ YKL-40 ในการส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็ง โดยพบว่าระดับของโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้จะเพิ่มขึ้นตามการพัฒนาการของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการที่มีการเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ หรือ tumor angiogenesis โดยการเหนี่ยวนำร่วมกันระหว่างตัวรับบนผิวเซลล์ syndecan-1 และ integrin $\alpha v \beta 3$ และกระตุ้นกลไกภายในผ่าน focal adhesion kinase (FAK) และ MAP kinase/ Erk 1/2 ในเซลล์ endothelial (Shao et al., 2009)

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อยอดจากศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทางผู้วิจัยได้พบว่ามีระดับของโปรตีนเหมือนโคตินเนสที่มีชื่อเรียกว่า YKL-40 เพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นมูลเหตุให้ทางผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของ YKL-40 ในมะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาดังกล่าวในมะเร็งท่อน้ำดีและผู้วิจัยตระหนักว่าโรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่สำคัญที่เกิดขึ้นมากทางภาคอีสานของประเทศไทย และเป็นมะเร็งที่มีอัตราการตายสูง การวินิจฉัยทำได้ยากเพราะไม่มีตัวบ่งชี้ของโรคที่แน่นอน ผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ในระยะที่โรคลุกลามมากแล้ว (Gatto et al., 2010) ดังนั้นการศึกษาระดับของโปรตีนเหมือนโคตินเนสคือ YKL-40 และหน้าที่การทำงาน จะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่และนำไปใช้ในการวินิจฉัยหรืออธิบายกลไกการเจริญพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี และอาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้ในอนาคตอย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ (biological functions) ของโปรตีน YKL-40 กับลักษณะของเซลล์มะเร็งที่เปลี่ยนแปลง (phenotypic change) ที่ส่งผลให้มีความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation) หรือ การเคลื่อนของเซลล์ (migration)
2. เพื่อศึกษากระบวนการและกลไกการกระตุ้น (signaling pathway) ของโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษายาทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) ได้แก่ การแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation) หรือ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และกลไกการทำงานของโปรตีน YKL-40 เป็นต้น โดยเป็นการศึกษาในรูปแบบหลอดทดลอง โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การศึกษายาทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน YKL-40 ในมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการกระตุ้นด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 (recombinant YKL-40 protein ; rYKL-40)
 - 1.1 การผลิตโปรตีน rYKL-40 ในเซลล์ HEK293T cell ด้วยรูปแบบ mammalian expression model และการทำให้โปรตีน YKL-40 บริสุทธิ์ (protein purification)
 - 1.2 การทดสอบลักษณะของเซลล์มะเร็งที่เปลี่ยนแปลง (phenotypic change) เมื่อมีการกระตุ้นด้วยโปรตีน rYKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี
 - การวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย โปรตีน rYKL-40 โดยวิธี cell proliferation assay
 - การวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย โปรตีน rYKL-40 โดยวิธี migration assay
 - 1.3 การตรวจหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกระตุ้นของโปรตีน YKL-40 ด้วยเทคนิค Western blotting โดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย โปรตีน rYKL-40 กับเซลล์ควบคุม
2. การศึกษายาทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน YKL-40 ในมะเร็งท่อน้ำดี ในรูปแบบ overexpression model
 - 2.1 โคลนยีน human YKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยเทคนิค overexpression และติดตามประสิทธิภาพของการแสดงออกของยีน YKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ในระดับ mRNA และโปรตีนด้วยวิธี quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) และ Western blotting ตามลำดับ
 - 2.2 การทดสอบลักษณะของเซลล์มะเร็งที่เปลี่ยนแปลง (phenotypic change) เมื่อมีปริมาณโปรตีน YKL-40 มากขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี
 - การวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ YKL-40 มากขึ้นเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมด้วยวิธี cell proliferation assay
 - การวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ YKL-40 มากขึ้นเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมด้วยวิธี migration assay
 - 2.3 การตรวจหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกระตุ้นของโปรตีน YKL-40 ด้วยวิธี Western blotting โดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ YKL-40 เพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่ได้หลังจากเสร็จสิ้นโครงการงานวิจัยนี้คือโปรตีน YKL-40 ในซีรัมที่มี ปริมาณเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหรือการแสดงออกของยีน YKL-40 มากกว่าปกติในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี มีผลสามารถกระตุ้นการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีในด้านการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยองค์ความรู้ใหม่นี้จะนำไปพัฒนาการใช้โปรตีน YKL-40 เป็นสารบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) หรือเป็นโปรตีนเป้าหมาย (target gene) เพื่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการและผลงานการตีพิมพ์

- 1) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 2 ครั้ง ในรูปแบบของโปสเตอร์ ได้แก่
 - งานประชุมวิชาการ THE JOINT 7TH AOHUPO CONGRESS AND 9TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE PROTEIN SOCIETY OF THAILAND จัดขึ้นวันที่ 6-8 สิงหาคม 2557 ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร โดยนำเสนอในเรื่อง Human YKL-40 promotes malignant phenotype and is associated with prognosis of patients with cholangiocarcinoma (รายละเอียดตามเอกสารใน ภาคผนวก ก)
 - งานประชุมวิชาการ THE 10TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE PROTEIN SOCIETY OF THAILAND จัดขึ้นวันที่ 15-17 กรกฎาคม 2558 ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร โดยนำเสนอในเรื่อง Autocrine and paracrine functions of YKL-40 is associated with tumor progression in cholangiocarcinoma (รายละเอียดตามเอกสารใน ภาคผนวก ก)
- 2) ผลงานการตีพิมพ์:
 - Thongsom S, Chaocharoen W, Silsirivanit A, Wongkham S, Sripan B, Choe H, Suginta W, Talabnin C. (2016). YKL-40/chitinase-3-like protein 1 is associated with poor prognosis and promotes cell growth and migration of cholangiocarcinoma. *Tumour Biol.* (doi:10.1007/s13277-016-4838-z).

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 2 ชนิดได้แก่ KKU-M055 และ KKU-M213 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และตู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12 Nutrient ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum (FBS), streptomycin (100 µg/mL) และ amphotericin B (50 µg/mL) นอกจากนี้เซลล์เพาะเลี้ยง HEK293T cells ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. พนิดา ชันแก้วหล้า สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี โดยจะนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 (recombinant YKL-40; rYKL-40) โดย HEK293T cells จะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีองค์ประกอบของ 10% FBS, streptomycin (100 µg/mL) และ amphotericin B (50 µg/mL)

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การโคลนยีนและการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ (recombinant YKL-40 protein; rYKL-40)

พลาสมิดรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 (*CH3L1/pCMV/hygro-His construct*) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอของยีน YKL-40 ซึ่งต่อเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ (Sino Biological Inc. Beijing, China) ถูกนำเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง HEK293T จำนวน 1.5×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 10 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตรโดยมีตัวนำพา Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (condition medium) จะถูกนำไปปั่นเพื่อเอาเศษเซลล์ออก ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะนำไปสกัดโปรตีน rYKL-40 และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Ni-NTA beads (GenScript USA Inc., NJ, USA) เมื่อได้โปรตีน rYKL-40 ที่บริสุทธิ์แล้ว หลังจากนั้นศึกษาแบบแผนของโปรตีนที่แยกได้บริสุทธิ์บน 12% sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วย Novagen® BCA Protein Assay Kit จากบริษัท EMD Millipore (Billerica, MA) โปรตีน rYKL-40 ที่ได้นี้จะถูกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หากยังไม่มีเมื่อนำไปใช้ในการทดสอบ

2. การโคลนพลาสมิดรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (cell transfection)

พลาสมิดรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 (*CHI3L1/pCMV6-flag tag construct*) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอของยีน YKL-40 ซึ่งต่อเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ (Origene, Singapore) ถูกนำเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M055 และ KKU-M213 จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 2 มิลลิลิตร ในเพลทเพาะเลี้ยงแบบ 6 ช่อง (6-well plate) ด้วย Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) จากนั้นเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M055 และ KKU-M213 นี้จะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ถูกนำไปวิเคราะห์หาการแสดงออกของโปรตีน การทดสอบการวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation assay) การวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Transwell migration assay) และการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์แบบอิสระจากการยึดเกาะ (anchorage-dependent growth assay) ในกรณี KKU-M055 ที่มีการผลิตโปรตีน YKL-40 แบบถาวร เมื่อนำเอาพลาสมิดรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 เข้าสู่เซลล์แล้ว เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มียา G418 (Invitrogen) เป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่มีกรนำเอาพลาสมิดรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 ออกไป

3. การวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation assay)

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 2.5×10^3 เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มีและไม่มีกรเติม rYKL-40 ที่ความเข้มข้น 80 ng/mL ในเพลทแบบช่อง 96 ช่อง (96-well plate) เมื่อเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อัตราการแบ่งตัวของเซลล์จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี MTS assay โดยใช้สาร CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent ของบริษัท Promega (Madison, WI, USA) ระดับของสีเหลืองส้มที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเซลล์กับสาร CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร การทดสอบนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อนำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติต่อไป

4. การวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Transwell migration assay)

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 1×10^5 เซลล์ถูกเลี้ยงในเพลทแบบช่อง 24 ช่อง โดยแต่ละช่องมีภาชนะด้านบนเลี้ยงเซลล์ซึ่งภาชนะดังกล่าวนี้มีช่องขนาด 8.0 μm เพื่อให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่รอดออกจากช่องด้านบนลงสู่ช่องด้านล่างที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ 600 ไมโครลิตรที่เติมและไม่เติมโปรตีน rYKL-40 หลังจาก 6 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ช่องด้านบนจะถูกนำมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ โดยใช้สาลีเซ็ดเอาเซลล์ที่อยู่ด้านบนภายในช่องออกก่อน ส่วนเซลล์ที่อยู่ที่ยกั้นช่องด้านบนถูกทำให้คงสภาพด้วย 3.7% (v/v) formaldehyde และใช้ 100% ethanol เพื่อให้ผนังเซลล์เป็นรูเพื่อให้ติดสีย้อม crystal violet จากนั้นจำนวน

เซลล์ถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับทั้งหมด 6 fields แล้วนำค่าที่ได้มาเฉลี่ย เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่ถูกต้อง การทดสอบนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อนำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติต่อไป

5. การวัดอัตราการยึดเกาะพื้นผิวของเซลล์ (Adhesion assay)

โปรตีน rYKL-40 1 ไมโครกรัมหรือโปรตีนควบคุม bovine serum albumin ถูกนำมาเคลือบที่ก้นเพลทแบบ 96 ช่อง และนำเข้าตู้อบอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 5×10^4 เซลล์ถูกเติมเข้าไปในช่องที่มีการเคลือบโปรตีนทั้งสองแบบดังกล่าว หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมงผู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เซลล์ที่ไม่มีการยึดเกาะติดกับโปรตีนดังกล่าวถูกล้างออก และจำนวนเซลล์ที่ยึดติดเกาะกับโปรตีนที่ก้นเพลทถูกวิเคราะห์ด้วย MTS assay ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ดังกล่าวข้างต้น และจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคำนวณด้วยสมการ

$$\text{Adhesion (\% of control)} = (A_{492} \text{ of YKL-40 coated}) / (A_{492} \text{ of 1\% BSA coated}) \times 100$$

การทดสอบนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อนำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติต่อไป

6. การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์แบบอิสระจากการยึดเกาะ (anchorage-dependent growth assay)

KKU-M055 ที่มีการผลิตโปรตีน YKL-40 แบบถาวร ถูกนำมาทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์แบบอิสระจากการยึดเกาะ โดยเพลทแบบ 6 ช่องจะถูกเติมที่ก้นเพลทด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีวุ้นผสมร้อยละ 0.5 หรือ 0.5% agarose medium และนำเข้าตู้อบอุ่น 37 องศาเซลเซียส รอจนวันแข็ง จากนั้นเซลล์จำนวน 1×10^4 เซลล์ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีวุ้นผสมให้ได้ร้อยละ 0.35 ถูกเติมด้านบนของ 0.5 % agarose gel medium และรอจนแข็ง ตามด้วยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 1 มิลลิลิตรและเติมทุก 2 วันจนครบ 14 วันหรือจนกระทั่งสามารถเห็นโคโลนี เมื่อเห็นเซลล์โตเป็นโคโลนีจะนำเพลทดังกล่าวไปย้อมด้วยสี crystal violet เพื่อให้สะดวกต่อการนับและการบันทึกผล การทดสอบนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อนำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติต่อไป

7. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน (Western blot analysis)

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ rYKL-40 ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง HEK293T และการแสดงออกของ YKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการนำเอาพลาสมิดรีคอมบีแนนท์โปรตีน YKL-40 เข้าสู่เซลล์ โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ HEK-293T ที่มีการแสดงออกของโปรตีน rYKL-40 และเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ทำให้มีการแสดงออกของยีน YKL-40 ถูกนำมาศึกษาแบบแผนของโปรตีนบน 10% SDS-PAGE และหลังจากการแยกโปรตีน โปรตีนบนแผ่นเจลถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ต่อด้วยการแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 5% (w/v) skimmed milk และ 0.05% (v/v) Tween 20 (0.05% PBST)

เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อป้องกันปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ หลังเวลา 1 ชั่วโมงนำแผ่น nitrocellulose membrane ดังกล่าวมาแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) skimmed milk และ 0.05% PBST ที่มีแอนติบอดีตัวสอบ rabbit anti-human YKL-40 polyclonal antibody (Quidel, San Diego, CA) หรือ monoclonal mouse anti-human GAPDH (Chemicon, Temecula, CA) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose membrane ถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแช่ต่อใน horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies ได้แก่ horse anti-mouse (Vector Laboratories, Burlingame, CA) หรือ goat anti-rabbit IgG (GenScript)] โดยจะเจือจางในอัตราส่วน 1: 5,000 ด้วย 0.05% PBST ที่มี 1% (w/v) skimmed milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 0.05% PBST จากนั้นตรวจสอบแถบโปรตีนด้วย ECL chemiluminescence kit และผลการแสดงออกของโปรตีนจะปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (x-ray film)

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม pAkt, Erk1/2 และ pErk1/2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการกระตุ้นด้วย rYKL-40 และเซลล์ควบคุมนั้น หลังการกระตุ้นเซลล์ถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเซลล์ถูกทำให้แตกโดย lysis buffer ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 5% (v/v) glycerol and protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN) เป็นเวลา 20 นาทีโดยแช่ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นตัวอย่างเซลล์ถูกนำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงดังกล่าวจะนำไปวัดความเข้มข้นด้วยวิธี BCA Protein assay kit (Pierce Biotechnology) และถูกนำมาศึกษาแบบแผนของโปรตีนบน 10% SDS-PAGE และการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนดังเช่นได้กล่าวมาข้างต้น แต่จะแตกต่างที่แอนติบอดีตัวสอบได้แก่ rabbit anti-human pAkt หรือ Erk1/2 หรือ pErk1/2 polyclonal antibodies (Cell signaling, Beverly, MA)

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ การเคลื่อนที่แบบ migration ของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์แบบ anchorage-dependent growth แต่ละการทดสอบจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งจากนั้นจะทำการเปรียบเทียบโดย student-t-test ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 16.0 ซึ่งหากผลการศึกษามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะต้องให้ค่า P value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ผลการทดลองที่แสดงด้วยกราฟเส้นหรือกราฟแท่งจะถูกวิเคราะห์ด้วย GraphPad Prism 5.0. ซึ่งมาจากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จาก western blot จะนำไปหาความเข้มของแถบโปรตีนแล้วนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ค่าทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่ม treatment และกลุ่มควบคุม

บทที่ 3

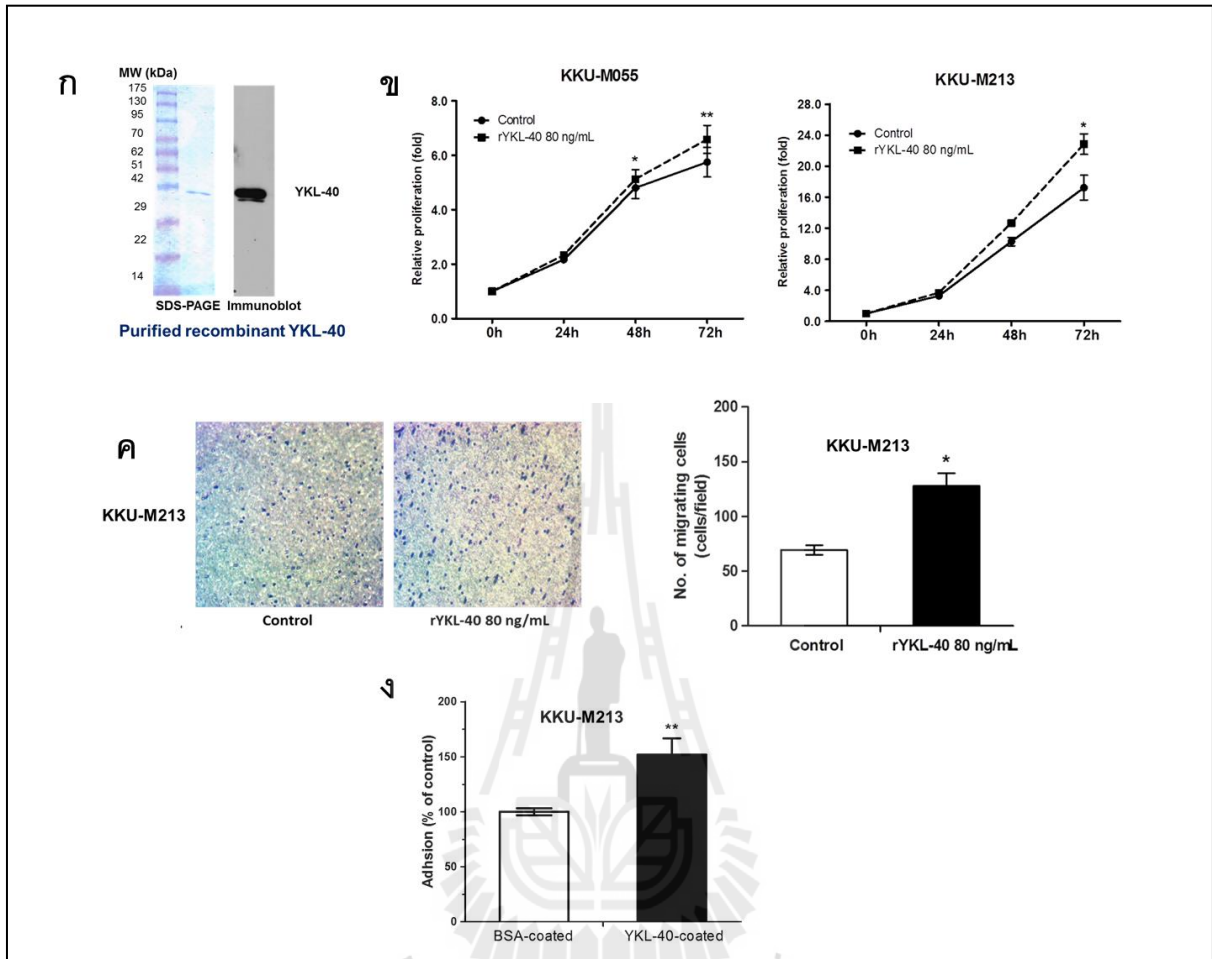
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน YKL-40 ในมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์ YKL-40 (recombinant YKL-40 protein ; rYKL-40)

เพื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน YKL-40 ที่พบปริมาณสูงในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการผลิตโปรตีน recombinant YKL-40 (rYKL-40) จากเซลล์เพาะเลี้ยง HEK239T cell (ภาพที่ 1ก) เพื่อใช้ในการกระตุ้นและทดสอบบทบาทหน้าที่ของโปรตีน YKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ KKU-M055 และ KKU-M213 โดยการศึกษาเป็นการจำลองเสมือนเหตุการณ์ที่พบในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาการกระตุ้นด้วยโปรตีน rYKL-40 ที่ความเข้มข้น 80 ng/mL ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีคือ KKU-M055 และ KKU-M213 พบว่ามีการแบ่งตัวของเซลล์ KKU-M055 และ KKU-M213 เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (KKU-M055, $P=0.005$ และ KKU-M213, $P=0.038$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 1ข) ในขณะที่การวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี transwell migration assay เซลล์ KKU-M213 เมื่อได้รับการกระตุ้นจากโปรตีน rYKL-40 80 ng/mL ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ไม่มีปัจจัยของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มารบกวน พบ KKU-M213 มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้มากขึ้นถึง 1.8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.036 (ภาพที่ 1ค) อย่างไรก็ตามการวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผู้วิจัยทำการทดสอบในเซลล์ KKU-M055 ด้วยแต่เนื่องจากเซลล์ KKU-M055 มีคุณลักษณะที่มีการเคลื่อนที่ได้น้อยมาก จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงในการตรวจวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์นี้

เนื่องจากการกระตุ้นด้วยโปรตีน rYKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีสามารถเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยเฉพาะ KKU-M213 ให้ผลชัดเจนกว่า KKU-M055 ดังนั้น cell adhesion assay จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีน rYKL-40 สามารถจับได้กับตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ KKU-M213 และมีผลกระตุ้นกลไกภายในเซลล์ ผลการศึกษาพบจำนวนเซลล์ KKU-M213 ในหลอดทดลองที่มี rYKL-40 ประมาณ 1.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ KKU-M213 ในหลอดทดลองควบคุมที่มี bovine serum albumin หรือ BSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.007$, ภาพที่ 1ง) และยังพบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน rYKL-40 ในเซลล์ KKU-M213 จะชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน Akt ที่ 24 ชั่วโมง และ Erk1/2 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2)

จากข้อมูลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-40 ในซีรัมที่มีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี น่าจะส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์และความสามารถเคลื่อนที่และบุกรุกเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการพัฒนาและการแพร่กระจายของมะเร็ง

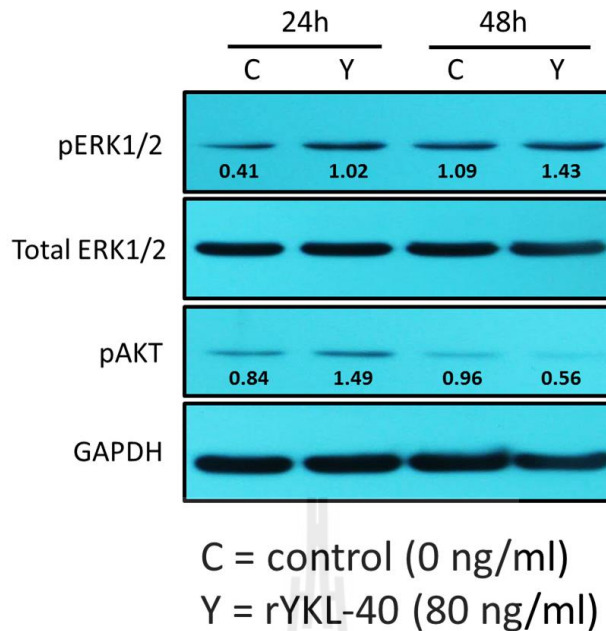


ภาพที่ 1. ผลการกระตุ้นด้วย recombinant YKL-40 protein (rYKL-40) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

- ผลการแสดงออกของโปรตีน rYKL-40 จากอาหารเลี้ยงเซลล์ 293T HEK ที่นำเอา pCMV-YKL-40 construct plasmid เข้าสู่เซลล์
- การกระตุ้นด้วย recombinant YKL-40 protein (rYKL-40) 80 ng/mL ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M055 และ KKKU-M213 ส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เวลา 72 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- การกระตุ้นด้วย recombinant YKL-40 protein (rYKL-40) 80 ng/mL ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M213 ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ (ภาพซ้าย, ภาพตัวอย่างแสดงเซลล์เพาะเลี้ยงที่เคลื่อนที่อยู่ด้านล่างของช่องเลี้ยงเซลล์; ภาพขวา, กราฟแสดงจำนวนเซลล์จากการนับจำนวน 6 fields ภายใต้กล้องจุลทรรศน์)
- เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M213 สามารถยึดเกาะติดกับโปรตีน rYKL-40 ที่เคลือบกันเพลทได้มากกว่ากันเพลทที่เคลือบด้วย Bovine Serum Albumin ที่เป็นโปรตีนควบคุม

กราฟแสดงช่วงค่าความผิดพลาด หรือ Error bars จากค่าบวกและลบ Standard Error Mean จากการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

* แสดงมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$), หรือ ** แสดงมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ด้วย student's t- test



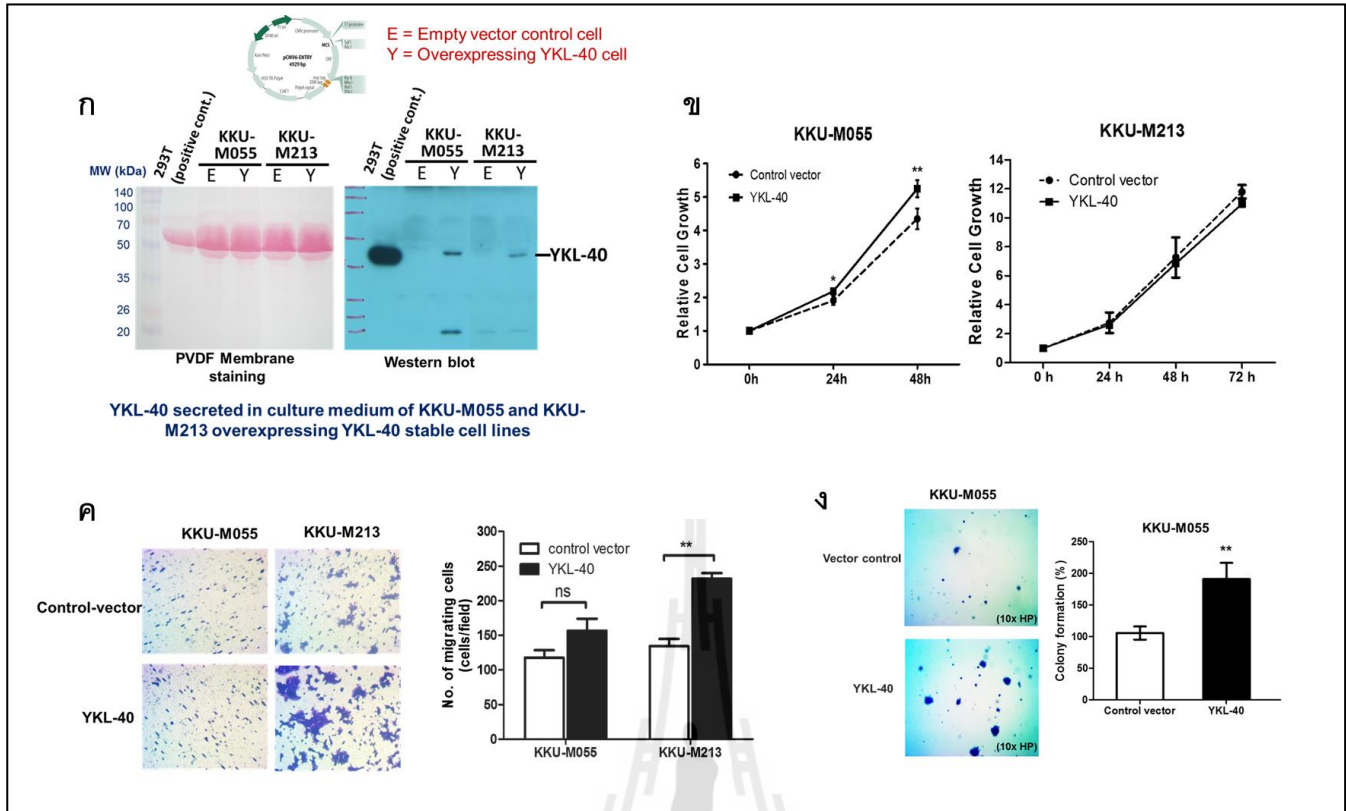
ภาพที่ 2 การแสดงออกของโปรตีน pERK1/2, ERK1/2 และ pAKT ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อมีการกระตุ้นด้วยโปรตีน rYKL-40 80 ng/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2. การศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน YKL-40 ในมะเร็งท่อน้ำดี ในรูปแบบ overexpression model

ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีพบโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแต่จะแสดงออกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณรอบๆมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน YKL-40 ที่ผลิตจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี สามารถหลั่งออกมาและ/หรือกลับมากกระตุ้นเซลล์มะเร็งผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ แล้วส่งผลการเพิ่มความสามารถแบ่งตัวของเซลล์และการเคลื่อนของมะเร็งท่อน้ำดีได้หรือไม่ ผู้วิจัยได้นำเอาชิ้น YKL-40 ในรูปของ mammalian expression vector ใส่เข้าไปในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M055 และ KKU-M213 พบเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีสามารถสร้างโปรตีน YKL-40 ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3ก) ผลการศึกษารoles บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) ของโปรตีน YKL-40 ที่มีผลต่อลักษณะของเซลล์มะเร็งที่เปลี่ยนแปลง (phenotypic change) พบ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 มากขึ้นจากวิธี gene overexpression มีความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ 72 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.003$) ขณะที่ความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ KKU-M213 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ไม่มีความแตกต่างจากเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3ข) แต่เมื่อวัดอัตราการ

เคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี transwell migration assay พบเฉพาะเซลล์ KKU-M213 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 มากขึ้น สามารถในการเคลื่อนที่ได้มากขึ้นถึง 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ในระยะเวลา 6 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0018$, ภาพที่ 3ค)

เนื่องจากเซลล์ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 มากขึ้นจากวิธี gene overexpression ดังกล่าวข้างต้นมีการผลิตโปรตีน YKL-40 แบบชั่วคราว ดังนั้นผู้วิจัยได้พัฒนาเซลล์ KKU-M055 ที่สามารถผลิตโปรตีน YKL-40 จำนวนมากแบบถาวร เพื่อใช้ในการทดสอบ anchorage-dependent growth assay ที่ต้องทำการวิเคราะห์เป็นระยะเวลานาน ประมาณ 14 วัน เพื่อยืนยันว่าโปรตีน YKL-40 มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาพบจำนวนโคโลนีในเซลล์ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 แบบถาวร มากกว่าจำนวนโคโลนีในเซลล์ควบคุม (KKU-M055 ที่มีการผลิตโปรตีน YKL-40 ปกติ) (ภาพที่ 3ง) และนอกจากนี้เมื่อนำเซลล์ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 แบบถาวร ไปทดสอบการดื้อยาเคมีบำบัดจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ doxorubicin cisplatin และ piperlongumine โดยยาทั้ง 3 ชนิดนี้มีกลไกการทำงานที่ชักนำให้เซลล์ตายแตกต่างกัน โดยพบว่าในเวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบยาแต่ละชนิดในเซลล์ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 แบบถาวรและเซลล์ควบคุม ผลการดื้อยาพบได้ในการทดสอบของซิสปลาติน (cisplatin) โดยเซลล์ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 แบบถาวร มี IC_{50} เท่ากับ 18.40 ± 2.04 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่มี IC_{50} เท่ากับ 8.55 ± 1.46 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4ก) และผลการดื้อยา cisplatin ถูกยืนยันด้วยผลของการศึกษา cell cycle analysis ซึ่งพบเซลล์ sub-G1 จำนวนร้อยละ 23.98 เมื่อเทียบกับการตายของเซลล์ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 แบบถาวร ที่คิดเป็นร้อยละ 9.4 เมื่อทดสอบด้วยซิสปลาติน (cisplatin) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ แต่อย่างไรก็ตาม cisplatin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เซลล์ตายเช่นเดียวกับ KKU-M055 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 แบบถาวรและเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 4ข)

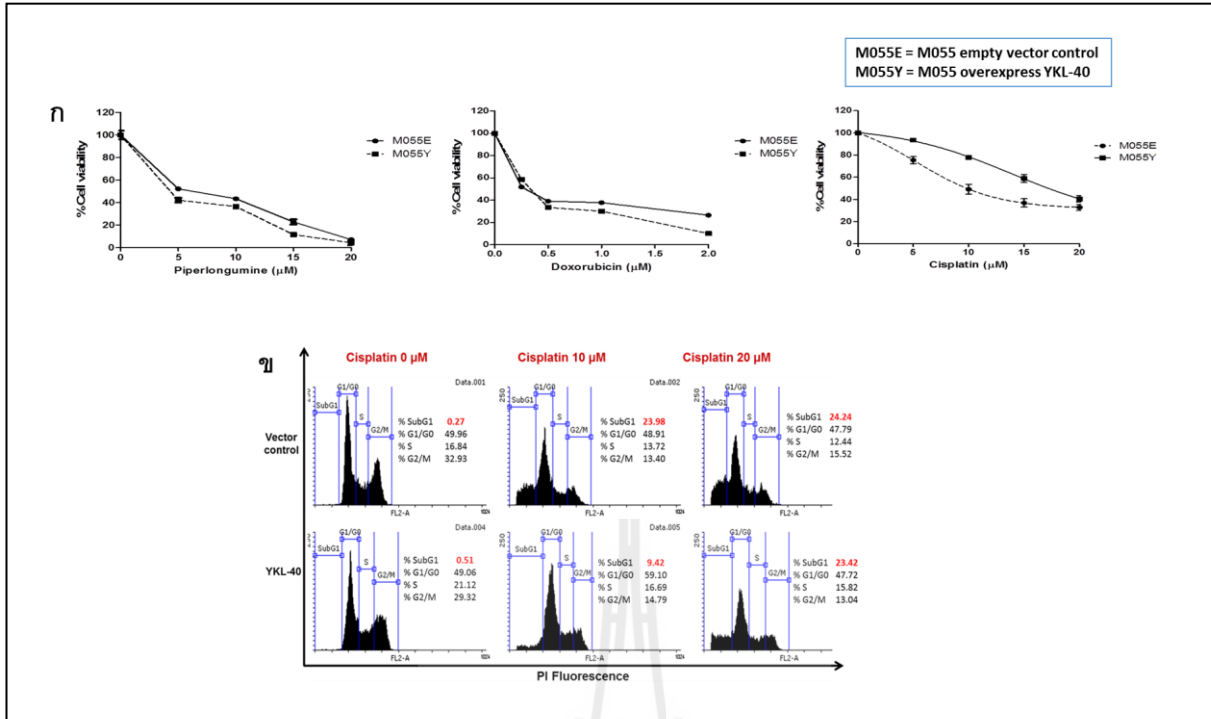


ภาพที่ 3 ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้น โดยรูปแบบวิธี overexpression

- ก. ผลการแสดงผลของโปรตีน YKL-40 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่นำเอา pCMV6-YKL-40 construct plasmid เข้าสู่เซลล์
- ข. เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M055) มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้น มีผลส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เวลา 72 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- ค. เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M213) มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้น ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ (ภาพซ้าย, ภาพตัวอย่างแสดงเซลล์เพาะเลี้ยงที่เคลื่อนที่อยู่ด้านล่างของช่องเลี้ยงเซลล์; ภาพขวา, กราฟแสดงจำนวนเซลล์จากการนับจำนวน 6 fields ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์)
- ง. เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M055) มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้นแบบถาวร ส่งเสริมการเจริญเติบโตแบบอิสระจากการยึดเกาะ

กราฟแสดงช่วงค่าความผิดพลาด หรือ Error bars จากค่าบวกและลบ Standard Error Mean จากการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

* แสดงมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), หรือ ** แสดงมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ด้วย student's t- test



ภาพที่ 4 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้นแบบถาวร ส่งเสริมการคือต่อยา cisplatin

- ก. ผลการทดสอบอัตราการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M055) ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้นแบบถาวร เมื่อได้รับยา piperlongumine doxorubicin และ cisplatin
- ข. การศึกษา cell cycle analysis ภายใตเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M055) ที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 เพิ่มขึ้นแบบถาวรทดสอบด้วย cisplatin ความเข้มข้น 0, 10, และ 20 uM

บทที่ 4

ข้อวิจารณ์

โปรตีน YKL-40 มีบทบาทหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อเป็นแหล่งอาหารให้กับเซลล์มะเร็ง (Shao et al., 2009) โดยการศึกษาในมะเร็งสมอง (glioblastoma) พบโปรตีน YKL-40 กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งสร้างและหลั่งสารกระตุ้นการสร้างหลอดเลือด (angiogenic factors) ได้แก่ vascular endothelial growth factors หรือ VEGF โดยโปรตีน VEGF มีผลกระตุ้นเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelial cell) ให้มีการแบ่งตัวของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์เพิ่มขึ้นเพื่อสร้างหลอดเลือดใหม่ (Francescone et al., 2011) แต่บทบาทหน้าที่ของโปรตีน YKL-40 ที่มีผลโดยตรงกับเซลล์มะเร็งนั้นยังคงไม่ชัดเจนมากนัก ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 สามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยตรง ซึ่งส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ การเคลื่อนที่และการยึดเกาะของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) ด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 ที่มีผลส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Ngernyuang et al., 2014) เมื่อศึกษาเกี่ยวกับกลไกภายในเซลล์เมื่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 พบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 น่าจะสามารถจับกับตัวรับบนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ จากผลการศึกษาของการยึดเกาะของเซลล์ (cell adhesion assay) และส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ในกลุ่ม Akt และ Erk เพิ่มขึ้น ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์นี้น่าจะอธิบายได้ว่าโปรตีน YKL-40 มีผลต่อการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีผ่านกลไกที่เรียกว่า Akt/Erk pathway โดยกลไก mitogen-activated protein (MAP) kinase Erk (MAPK/Erk) และ PI3K-AKT-dependent pathway ถือเป็นกลไกหลักที่พบได้ในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดี (Utispan et al., 2012) ที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวจับบนผิวเซลล์อย่างจำเพาะและส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็งในด้านการแบ่งตัวของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ จากข้อมูล ณ ขณะนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-40 มีลักษณะการกระตุ้นแบบพาราไครน์ (paracrine fashion) และเนื่องจากโปรตีน YKL-40 เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกภายในเซลล์หรือสามารถคัดหลั่งออกจากเซลล์ หลากๆชนิดรวมทั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วย ดังนั้นโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีน่าจะมีบทบาทในการกระตุ้นอยู่ภายในและภายนอกเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 มากขึ้นภายในเซลล์มีผลส่งเสริมความสามารถของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YKL-40 จากภายนอกเซลล์ ดังนั้นการกระตุ้นของโปรตีน YKL-40 ในมะเร็งท่อน้ำดีน่าจะมีทั้งแบบพาราไครน์และออโตไครน์ (paracrine and autocrine fashions) นอกจากนี้ยังพบคุณสมบัติในการดื้อยาเคมีบำบัดซิสปลาติน (cisplatin) เพิ่มขึ้นด้วย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการให้รังสีแกมมา (γ -irradiation) ต่อเซลล์มะเร็งสมอง (glioblastoma) และมีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 และ ปกป้องเซลล์มะเร็งจากการชักนำให้ตายด้วยรังสีแกมมา และ

ส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่ในลักษณะพาราไครน์ (Francescone et al., 2011) จากข้อมูลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-40 มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นโปรตีน YKL-40 อาจจะนำไปใช้เป็นยีนเป้าหมายในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต หรือในอีกด้านหนึ่งโปรตีน YKL-40 อาจนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการติดตามการรักษาหรือใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป



บทที่ 5

บทสรุป

สรุปและข้อเสนอแนะ

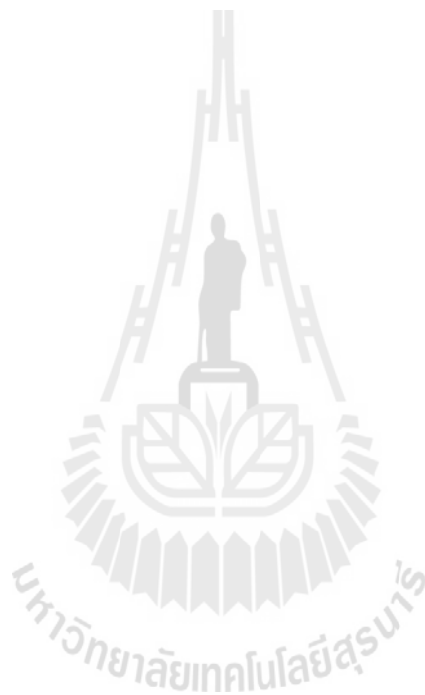
โปรตีน YKL-40 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทหน้าที่ต่อการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี ในด้านการส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการดื้อยาเคมีบำบัด ผ่านกระบวนการกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบพาราไครน์และอโตไครน์ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปการวิเคราะห์ชนิดของตัวรับโปรตีน YKL-40 บนผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่จำเพาะ เป็นส่วนที่สำคัญ ซึ่งจะช่วยให้เราสามารถค้นหากลไกภายในที่จำเพาะที่เกิดจากการตอบสนองจากการกระตุ้นด้วยโปรตีน YKL-40 และข้อมูลนี้น่าจะนำมาสู่การรักษาที่จำเพาะและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น และเนื่องจากเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกโปรตีน YKL-40 มากขึ้น มีคุณสมบัติคือยาซิสปลาติน(cisplatin) ดังนั้นหากเราทำการวิเคราะห์การดื้อยาเคมีบำบัดตัวอื่นๆ ที่ได้มีการนำมาใช้ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีอยู่ น่าจะช่วยให้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากสามารถเลือกชนิดของยาเคมีบำบัดที่จำเพาะเหมาะสมต่อผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ที่แตกต่างกันได้



บรรณานุกรม

1. Eurich, K., Segawa, M., Toei-Shimizu, S., and Mizoguchi, E. (2009). Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World. J. Gastroenterol.* 15: 5249-5259.
2. Francescone, R.A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., Yan, W., Bentley, B., Shao, R., (2011). Role of YKL-40 in the Angiogenesis, Radioresistance, and Progression of Glioblastoma. *Journal of Biological Chemistry.* 286, 15332-15343.
3. Fusetti F, Pijning T, Kalk KH, Bos E, Dijkstra BW. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39 (2003). *J Biol Chem*;278: 37753-60.
4. Gatto, M. and Alvaro, D. (2010). New insights on cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 2: 136-145.
5. Høgdall, E. V. S., Ringsholt, M., Høgdall, C. K., Christensen, I. J., Johansen, J. S., Kjaer, S. K., Blaakaer, J., Ostenfeld-Møller, L., Price, P. A., and Christensen, L. H. (2009). YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. *BMC. Cancer.* 9: 8.
6. Houston, D. R., Recklies, A. D., Krupa, J. C., and van Aalten, D. M. F. (2003). Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 30206–30212.
7. Johansen, J. S., Williamson, M. K., Rice, J. S., and Price, P. A. (1992). Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J. Bone. Miner. Res.* 7: 501-512.
8. Johansen, J. S., Jensen, B. V., Roslind, A., Nielsen, D., and Price, P. A. (2006). Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients. *Cancer Epidermiol Biomark Prev* 15(2): 194-202.
9. Johansen, J. S., Bojesen, S. E., Mylin, A. K., Frikke-Schmidt, R., Price, P. A., and Nordestgaard, B. G. (2008). Elevated plasma YKL-40 predicts increased risk of gastrointestinal cancer and decreased survival after any cancer diagnosis in the general population. *J. Clin. Oncol.* 27: 1-8.
10. Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., He, C. H., Takyar, S., and Elias, J. A. (2011). Role of chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* 73: 479-501.
11. Ngernyuang, N., Francescone, RA., Jearanaikoon, P. (2014). Chitinase 3 like 1 is associated with tumor angiogenesis in cervical cancer *The international journal of biochemistry & cell biology.* 51: 45-52.
12. Shao, R., Hame, K., Petersen, L., Cao, J. Q., Arenas, R. B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene.* 28(50): 4456–4468.

13. Yamac, D., Ozturk, B., Coskun, U., Tekin, E., Sancak, B., Yildiz, R., and Atalay, C. (2008). Serum YKL-40 levels as a prognostic factor in patients with locally advanced breast cancer. *Adv. Ther.* 25(8): 801-809.
14. Utispan, K., Sonongbua, J., Thuwajit, P. (2012). Periostin activates integrin alpha5beta1 through a PI3K/AKTdependent pathway in invasion of cholangiocarcinoma *International journal of oncology.* 41: 1110-1118



ภาคผนวก ก



Human YKL-40 promotes malignant phenotype and is associated with prognosis of patients with cholangiocarcinoma

Sunisa Thongsom¹, Wethaka Chaocharoen¹, Atith Silsilvanit², Sopot Wongkham², Choe Han³, Wipa Suginta^{1,*}, Chutima Talabnin^{1,*}

¹Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, Schools of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand; ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khonkaen, 40002, Thailand; ³Department of Physiology, University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, 138-736, Korea; E-mail: wipa@sut.ac.th; chutima.sub@sut.ac.th

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of the bile duct epithelium. CCA is a devastating cancer with a high incidence in Northeast Thailand. YKL-40 or chitinase-3-like-1 (CH3L1) is a secreted glycoprotein, which is commonly expressed in stromal cells and highly expressed in several types of solid cancers. In this study, we determined YKL-40 expression in plasma and tumor tissues of CCA patients by ELISA and immunohistochemistry. Correlations between YKL-40 expression in plasma and tumor tissues, clinicopathological features and patient survival were investigated. YKL-40 plasma concentrations were significantly increased in CCA patients as compared to those in the control group. Overall survival was worst in patients with elevated YKL-40 plasma concentration. Immunohistochemical staining of YKL-40 in 34 CCA tissues indicated that YKL-40 was rarely expressed in CCA tumor cells, but was highly expressed in liver cells and connective tissue at intratumoral stroma. Univariate analysis showed that patients with high expression of YKL-40 in CCA tumor cells were associated with poor prognosis parameter (non-papillary type). To determine the biological function whether YKL-40 promotes malignant phenotypic changes in CCA, we expressed and purified recombinant YKL-40 in mammalian system for investigation of CCA cell proliferation and migration. We demonstrated that tumor growth and migration were significantly increased ($p < 0.05$) in CCA cell lines with recombinant YKL-40 added. These data indicated that YKL-40 may associate with CCA progression and poor patient outcome and YKL-40 may serve as an alternative biomarker for the monitoring of disease progression in CCA patients.

Methods and results

1. Elevated YKL-40 plasma concentration and poor patient survival.

YKL-40 plasma concentrations were determined in 41 healthy controls and 57 CCA patients using a commercial YKL-40 ELISA kit (Eitestake Biotech, Shanghai, China).

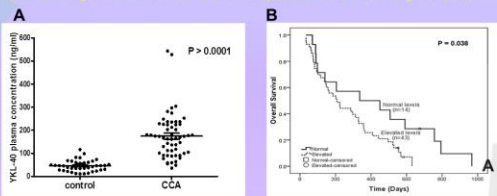


Fig 1. (A) Plasma YKL-40 levels in 57 CCA patients were significantly higher than in 41 healthy control ($P < 0.0001$). (B) Kaplan-Meier survival curves showing the association between YKL-40 plasma concentration and overall survival in 57 patients with CCA. The YKL-40 plasma concentration was dichotomized according to the 25th percentile level in CCA subjects (cutoff value 100.7 ng/mL). P-values were calculated by using the log-rank test.

2. YKL-40 intratumoral expression and clinicopathological features.

YKL-40 expression was determined by immunohistochemistry (IHC) in CCA tissues. Polyclonal antibody rabbit anti-human YKL-40 (Quidel Corporation, Santa Clara, CA) was used as a primary antibody against human YKL-40. Anti-rabbit IgG Envision (Dako, Carpinteria, CA) was used as secondary antibody.

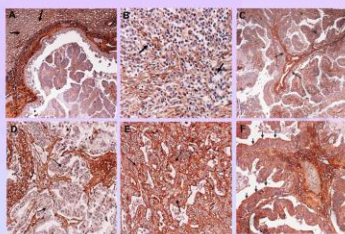


Fig 2. Distribution and expression of YKL-40 in CCA tissues detected by immunohistochemical staining. (A) YKL-40 expressed in liver cells (x4 HP). (B) YKL-40 expressed in connective tissue at intratumoral stroma (x4 HP). (C) Negative YKL-40 immunostaining in CCA tumor cells (x10 HP). (D) YKL-40 positive with cytoplasmic reactivity of CCA tumor cells (x10 HP). (E) YKL-40 positive with membranous/cytoplasmic reactivity of CCA tumor cells, especially the luminal surface or apical site (black arrows) (x10 HP).

Table 1. YKL-40 intratumoral expression in cholangiocarcinoma tissues in relation to clinicopathological features of the patients

Variable	Number	YKL-40 intratumoral staining (%)		P value
		Negative	Positive	
Age (years)				
< 56	19	4 (21.1)	15 (78.9)	0.051
≥ 56	15	8 (53.3)	7 (46.7)	
Sex				
Male	19	7 (36.8)	10 (53.2)	0.832
Female	15	5 (33.3)	12 (86.7)	
Tumor Stage				
III	17	4 (41.2)	13 (58.8)	0.473
III & IV	17	6 (29.4)	10 (70.6)	
Histology Type				
Papillary	12	8 (66.7)	4 (33.3)	0.005
Non-Papillary	22	4 (18.2)	18 (81.8)	

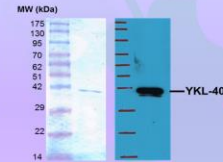
P-values rendered in bold are statistically significant ($P < 0.05$)

Acknowledgements

This research was financially supported by the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Scholarship Program, Thailand. We also thank Liver Tumor and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand for participating in collection of patient data and tumor samples.

3. Recombinant YKL-40 protein promotes cell proliferation and migration of CCA cell lines

Purified recombinant YKL-40 (rYKL-40) protein (MW: 40 kDa) was expressed in 293T cells by using expression vector pCIS2.0. The rYKL-40 protein was purified by using ion-exchange chromatography and showed expression in 293T cells. The rYKL-40 protein (MW: 40 kDa) was used to study YKL-40 effect on the proliferation of CCA cell lines.



YKL-40 effect on Cell proliferation

CCA cell lines M055 and M213 cells were treated with rYKL-40 (80 ng/ml) and determined the cell proliferation by using MTT assay (Eitestake Biotech, China).

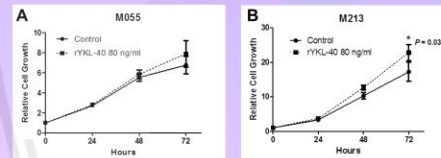


Fig. 3. Effect of YKL-40 on cell proliferation. rYKL-40 80 ng/ml enhanced the proliferation of M055 and M213 (CCA cells) as compared with those of control (A and B). However, only KKU-M213 proliferation treated with 80 ng/ml of recombinant YKL-40 at 72h was found to be statistically significant (A). Error bars represent \pm SEM (triplicated experiments).

YKL-40 effect on Cell migration

M213 cells were treated with rYKL-40 (80 ng/ml) and determined the cell migration by transwell migration assay. M213 cells were loaded into the upper chamber of a transwell medium with or without YKL-40 (80 ng/ml) condition. After 6 hours of incubation, cells were fixed and stained. Average cells numbers were calculate from 4 different fields in each sample.

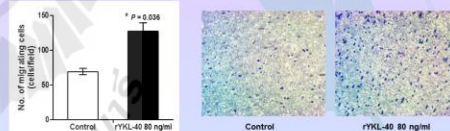


Fig. 4. Effect of YKL-40 on cell migration. rYKL-40 at 80 ng/ml significantly induced the cell migration in M213 cells. Error bars represent \pm SEM (triplicated experiments).

Conclusions and Discussion

The plasma concentrations of YKL-40 were significantly increased in CCA patients compared to the healthy control group. YKL-40 plasma concentration was significantly increased in the late stage of the disease. CCA patients with elevated plasma YKL-40 concentration were associated with short overall survival. Moreover, high expression of intratumoral YKL-40 was associated with poor prognosis parameter (non-papillary type). We also investigated a possible role of YKL-40 in CCA development in vitro by generated the recombinant YKL-40. The results show that recombinant YKL-40 at 80 ng/ml significantly increased the proliferation and migration of M213 cells when compare with those control. Based on the information on this study imply us that YKL-40 have a promoting role in CCA development and progression.

References

1. Sunisa Thongsom, Wethaka Chaocharoen, Atith Silsilvanit, Sopot Wongkham, Choe Han, Wipa Suginta, Chutima Talabnin. YKL-40 as a Biomarker in Cancer Patients? *Cancers* 2019; 11(2):183-189. doi:10.3390/c11020183
2. Nigamjyoti K, Trivedi, S. K., Jaisankaran, T., Debasing, J., Sanyal, A., Das, S., Pan, R. and Choudhury, T. (2014). Chitinase 3-like 1 is associated with tumor angiogenesis in gastric cancer. *The International journal of oncology* 45: 49-52.

Autocrine and paracrine functions of YKL-40 promote tumor progression and chemoresistance in cholangiocarcinoma cell lines

Sunisa Thongsom¹, Chutima Talabnri¹, Wethaka Chaocharoen¹, Atit Silsilvanit², Sopot Wongkham², Wipa Sugintia^{1*}, Han Choe³

¹ Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand;

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khonkaen, 40002, Thailand;

³ Department of Physiology, College of Medicine, University of Ulsan, Seoul, 138-736, Korea; E-mail: hchoe@ulsan.ac.kr; wipa@sut.ac.th



Abstract

Elevated YKL-40 plasma concentration has been found in several malignancies and is associated with poor prognosis and short survival time of cancer patients. It has also been shown that YKL-40 can stimulate the growth of tumor by regulating angiogenesis. We previously showed that YKL-40 plasma concentration is significantly increased in cholangiocarcinoma (CCA) patients. Overall survival is worse in patients with elevated YKL-40 plasma concentration. However, YKL-40 is rarely expressed in CCA tumor cells, but highly expressed in liver cells and connective tissue at intratumoral stroma. In this study, we demonstrated that YKL-40 has autocrine and paracrine functions in CCA progression. We purified recombinant YKL-40 from mammalian cell expression system to investigate the paracrine effects. Purified recombinant YKL-40 protein significantly enhanced growth, adhesion, and migration of CCA cells. YKL-40 overexpression in CCA cells showed similar effects in proliferation, anchorage-independent growth, and migration of CCA cells. Moreover, overexpression of YKL-40 also led to an increased resistance to cisplatin. The present study showed that YKL-40 had autocrine and paracrine functions to promote CCA progression and chemoresistance of CCA cells. Hence, YKL-40 expression level in plasma or CCA cells may be a marker for predicting disease progression and chemotherapeutic response of CCA, and the YKL-40 may be a potential therapeutic molecular target for treating CCA.

Methods and results

YKL-40 expression in CCA

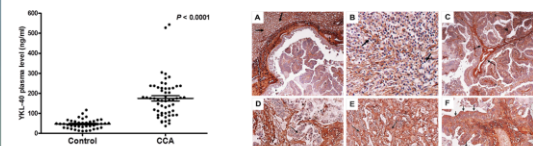


Fig. 1 Plasma YKL-40 levels in CCA patients were significantly higher than those of healthy controls ($p < 0.0001$). YKL-40 in plasma was determined by using commercial YKL-40 ELISA kit (BlueGene Biotech Co., Ltd., Shanghai, China). The median plasma YKL-40 levels in 57 CCA patients and 41 healthy control were 169.5 ng/ml (36.45–543.4 ng/ml) and 46.92 ng/ml (11.2–116.7 ng/ml), respectively

Fig. 2 Distribution and expression of YKL-40 in CCA tissues detected by immunohistochemical staining. (A) Hepatocytes (x4 HP), (B) Infiltrating immune cells (x10 HP), (C) Connective tissue at intratumoral stroma (x4 HP), (D) Negative YKL-40 immunostaining in CCA tumor cells (x10 HP), (E) YKL-40 positive with cytoplasmic reactivity of CCA tumor cells (x10 HP), (F) YKL-40 positive with membranous/cytoplasmic reactivity of CCA tumor cells especially the luminal surface or apical site (black arrows) (x10 HP).

Autocrine functions of YKL-40 in CCA cells

Generation of cancer cell lines stably expressing YKL-40

The full length of YKL-40 cDNA was subcloned into a pCMV6-entry vector. Selection with 700 µg/mL of G418 was initiated 48 hours after transfection, and the drug-resistant cell populations were used for subsequent studies after selection for 2 weeks

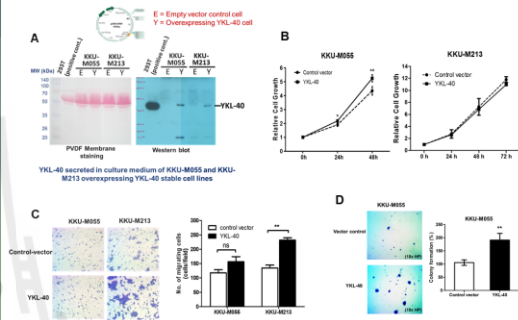


Fig. 4 YKL-40 overexpression in CCA cells promote anchorage-independent growth and migration of CCA cells

A) Quantitative expression analysis of YKL-40 by SDS-PAGE and western blotting in KKKU-M055 and KKKU-M213 cell transfected by pCMV6-YKL-40 construct plasmid.
B) Proliferation assay. KKKU-M055 and KKKU-M213 cells were transfected with pCMV6-YKL-40 constructs or control vector. Cell proliferation was determined at 0, 24, 48 and 72 hours using MTS assay.
C) Cell migration assay using transwell in KKKU-M055 and KKKU-M213 transfected by pCMV6-YKL-40 constructs or control vector. (left panel, representative pictures of invasion chambers; right panel, average counts from six random microscopic fields).
D) Anchorage-independent growth using soft agar colony formation in stable YKL-40 overexpressing KKKU-M055 cells. (left panel, representative pictures of invasion chambers; right panel, average counts from six random microscopic fields).
Error bars represent \pm SEM from the experiments done in triplicate * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test.

Paracrine functions of YKL-40 in CCA cells

Generation of recombinant YKL-40 protein (rYKL-40)

The pCMV/hygro-His plasmid, containing full-length YKL-40 (Sino biological Inc, Beijing, China) was transfected into 293T HEK cells for 48 hours. After transfection, culture medium containing secreted rYKL-40 was harvested and followed by affinity purification using Ni-NTA column (Genscript)

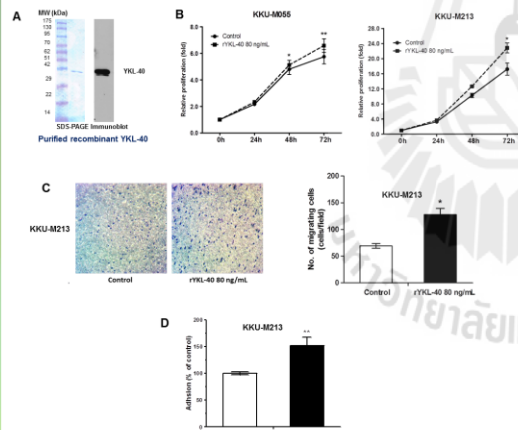


Fig. 3 Added rYKL-40 enhances CCA cell proliferation, migration and adhesion.

A) Quantitative expression analysis of rYKL-40 by SDS-PAGE and western blotting in 293T HEK cell transfected by pCMV-YKL-40 construct plasmid.
B) Proliferation assay. KKKU-M055 and KKKU-M213 cells were culture in complete medium with presence of rYKL-40 80 ng/ml, or PBS. Cell proliferation was determined at 0, 24, 48 and 72 hours using MTS assay.
C) Cell migration assay using transwell in KKKU-M213 cells treated with rYKL-40 80 ng/ml or PBS. (left panel, representative pictures of invasion chambers; right panel, average counts from six random microscopic fields).
D) Cell adhesion assays of KKKU-M213 cells in different culture coating surfaces including rYKL-40 or BSA. Cells adhered onto BSA-coated plate were used as controls.
Error bars represent \pm SEM from the experiments done in triplicate * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test.

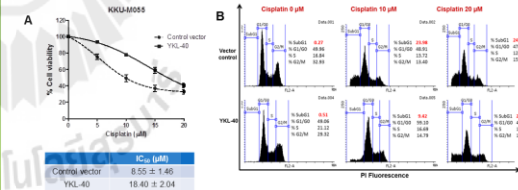


Fig. 5 Overexpression of YKL-40 in KKKU-M055 increases chemoresistance to cisplatin. Cells were treated with cisplatin for 24 h, cells viability was determined using SRB assay

A) Stable YKL-40 overexpressing KKKU-M055 cell resisted to cisplatin by increasing IC₅₀ of cisplatin from 8.55 µM to 18.40 µM.
B) Cell cycle analysis using flow cytometer showed overexpressed YKL-40 reduced subG1 phase when treated with cisplatin.
Error bars represent \pm SEM from the experiments done in triplicate

Conclusions and Discussion

Recombinant YKL-40 protein and YKL-40 overexpressing stable cell lines have been used to investigate the paracrine and autocrine effects of YKL-40 in CCA. The results showed that YKL-40 has both the paracrine and autocrine function to promote CCA cell proliferation, anchorage-independent growth, migration and chemoresistance. Thus, our study highlighted important roles of YKL-40 in CCA development and progression, and may provide substantial clues for novel strategies treatment against CCA.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Scholarship Program, The Thailand Research Fund, and Suranaree University of Technology. We also thank the Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for participating in collection of patient data and tumor samples.

ประวัติผู้วิจัย

ดร.ชุตินา ตลับนิล เป็นอาจารย์สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อวันที่ 13 เมษายน พ.ศ. 2525 สถานที่เกิดจังหวัดนครราชสีมา การศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2547 และระดับปริญญาเอก ปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (ชีวเคมีทางการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2553 หลังจบการศึกษาระดับปริญญาเอก ทำงานเป็นนักวิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติประเทศสิงคโปร์ (National Cancer Centre Singapore) เป็นเวลา 18 เดือน ก่อนมารับตำแหน่งเป็นอาจารย์ สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ สถานที่ติดต่อ อาคารวิชาการ 2 ชั้น 4 ห้อง C2 406 สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทร. 044 224 254 แฟกซ์ 044 224 648 หรือ Email: chutima.sub@sut.ac.th, chutima_kku@yahoo.com

ผลงานตีพิมพ์ (ย้อนหลัง 5 ปี)

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ
Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, Chur-in S, Pugkhem A, Talabnin C, Wongkham S. (2012) Cholangiocarcinoma: Experience of Srinagarind Hospita. Srinagarind Med J, 27, pp 331-9
- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ
Subimerb C, Wongkham C, Khuntikeo N, Leelayuwat C, McGrath MS, Wongkham S. (2014) Transcriptional Profiles of Peripheral Blood Leukocytes Identify Patients with Cholangiocarcinoma and Predict Outcome. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15, pp. 4217-4224.
- Chusorn P., Namwat N., Loilome W., Techasen A., Pairojkul C., Khuntikeo N., Dechakhamphu A., Talabnin C., Chan-On W., Ong C. K., Teh BT., Yongvanit P. (2013) Overexpression of microRNA-21 regulating PDCD4 during tumorigenesis of liver fluke-associated cholangiocarcinoma contributes to tumor growth and metastasis. Tumor biol, 34 (3), pp. 1579-1588
- Bhudhisawasdi, V., Pugkhem, A., Talabnin, C., Khuntikeo, N., Seow, OT., Chur-in, S., Wongkham, S. (2012). Evaluation of postoperative adjuvant chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma patients with R1 and R2 resections. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, (13), KKKU supplement pp.169-174.
- Ong, C.K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J.R., Allen, G.E., Ng, C.C.Y., Wong, B.H., Myint, S.S., Rajasegaran, V., Heng, H.L., Gan, A., Zang,

- Z.J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M.H., Huang, D., Ong, P., Chan-On, W., Cao, Y., Qian, C.-N., Lim, K.H., Ooi, A., Dykema, K., Furge, K., Kukongviriyapan, V., Sripa, B., Wongkham, C., Yongvanit, P., Futreal, P.A., Bhudhisawasdi, V., Rozen, S., Tan, P., Teh, B.T. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nature Genetics*, 44 (6), pp. 690-693.
- Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M.-L., Teague, J., Bignell, G., Butler, A., Cho, J., Dalglish, G.L., Galappaththige, D., Greenman, C., Hardy, C., Jia, M., Latimer, C., Lau, K.W., Marshall, J., McLaren, S., Menzies, A., Mudie, L., Stebbings, L., Largaespada, D.A., Wessels, L.F.A., Richard, S., Kahnoski, R.J., Anema, J., A.tuveson, D., Perez-Mancera, P.A., Mustonen, V., Fischer, A., Adams, D.J., Rust, A., Chan-On, W., Subimerb, C., Dykema, K., Furge, K., Campbell, P.J., Teh, B.T., Stratton, M.R., Futreal, P.A. (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*, 469 (7331), pp. 539-542.
- Subimerb, C., Pinlaor, S., Lulitanond, V., Khuntikeo, N., Okada, S., McGrath, M.S., Wongkham, S. (2010). Circulating CD14⁺CD16⁺ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma (2010) *Clinical and Experimental Immunology*, 161 (3), pp. 471-479.
- Subimerb, C., Pinlaor, S., Khuntikeo, N., Leelayuwat, C., Morris, A., McGrath, M.S., Wongkham, S. (2010). Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma (2010) *Molecular Medicine Reports*, 3 (4), pp. 597-605.