



รายงานการวิจัย

การแสดงออกของยีน Ring finger protein 43 (RNF43) ในมะเร็งท่อน้ำดี (Expression of Ring finger protein 43 (RNF43) in cholangiocarcinoma)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รายงานการวิจัย

การแสดงออกของยีน Ring finger protein 43 (RNF43) ในมะเร็งท่อน้ำดี
(Expression of Ring finger protein 43 (RNF43) in cholangiocarcinoma)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร.ชุตินา ตลับนิล
สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

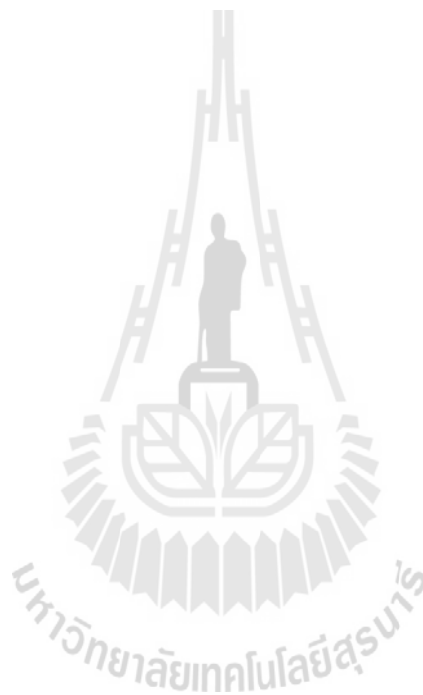
งานวิจัยครั้งนี้สามารถบรรลุเสร็จสิ้นตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ คิดถึง คร.ชุตติมา ตลับนิล หัวหน้าโครงการขอขอบพระคุณ ศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอนุเคราะห์เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสพิศ วงศ์คำ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างทำการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556

ชุตติมา ตลับนิล

มกราคม 2559



บทคัดย่อภาษาไทย

Ring finger protein 43 (*RNF43*) คือ RING-type E3 ubiquitin ligase ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ที่เรียกว่า Wnt/ β -catenin signaling pathway โดย *RNF43* จะทำหน้าที่ในการทำลายตัวรับสัญญาณของวิถีนี้ที่เรียกว่า frizzled receptor การกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* ถูกรายงานในมะเร็งหลากหลายชนิดรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว พบว่ามีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็ง ในการศึกษาคั้งนี้ทางผู้วิจัยทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนกับอาการทางพยาธิคลินิกและระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับต่ำ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนนี้กับอาการทางพยาธิคลินิกใดๆ เช่น เพศ อายุ ลักษณะทางจุลพยาธิ ระยะของโรค และการแพร่กระจายของมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาคั้งนี้ทางผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระยะรอดชีพสั้นจะสัมพันธ์กับการมีการแสดงออกของยีนที่ต่ำ และยังพบอีกว่าการแสดงออกของยีน *RNF43* สามารถใช้เป็นตัวพยากรณ์โรคแบบอิสระ โดยไม่ขึ้นกับปัจจัยทางพยาธิอื่นๆ จากข้อมูลการศึกษาในคั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า *RNF43* มีการแสดงออกในระดับต่ำในมะเร็งท่อน้ำดี และการแสดงออกของยีน *RNF43* นี้ น่าจะถูกนำไปใช้เป็นตัวพยากรณ์โรคมะเร็งต่อไป

Abstract

Ring finger protein 43 (*RNF43*) is a RING-type E3 ubiquitin ligase that negatively regulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway by selectively ubiquitinating frizzled receptors at the plasma membrane and promotes its endocytosis and lysosome degradation. It has been shown that *RNF43* is frequently mutated in several type of cancer including CCA. In this study, we determined *RNF43* expression in CCA tissues and demonstrated the correlation between *RNF43* expression and clinicopathological features and prognosis of CCA patients. We found that *RNF43* had a reduced expression in CCA. However, there was no statistically significant association of *RNF43* expression and any clinicopathological features. Overall survival was worst in patients with downregulation of *RNF43* expression. In addition, multivariate survival analysis demonstrated that *RNF43* expression was an independent prognostic marker for monitoring CCA patients. These results indicate that *RNF43* is down regulated in CCA and may serve as a promising prognosis marker for CCA.



สารบัญ

| | หน้า |
|-----------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | จ |
| สารบัญภาพ | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย | 2 |
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย | |
| แหล่งที่มาของข้อมูล | 3 |
| วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล | 4 |
| วิธีวิเคราะห์ข้อมูล | 4 |
| บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล | |
| อภิปรายผล | 5 |
| บทที่ 4 ข้อวิจารณ์ | |
| วิจารณ์ผลการวิจัย | 10 |
| บทที่ 5 บทสรุป | |
| สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | 11 |
| บรรณานุกรม | 12 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก | 14 |
| ประวัติผู้วิจัย | 19 |



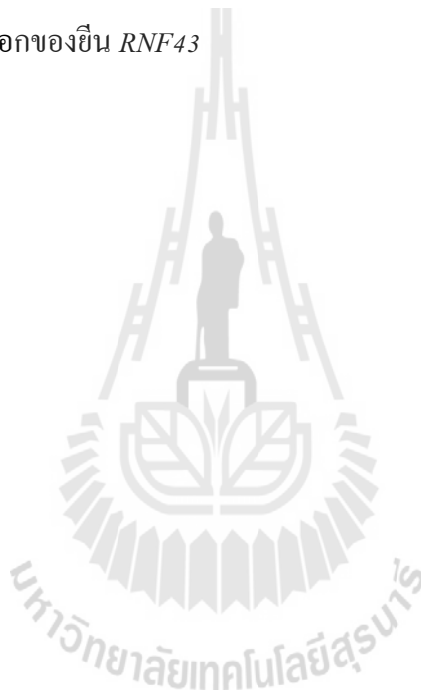
สารบัญตาราง

| | | หน้า |
|------------|--|------|
| ตารางที่ 1 | ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinicopathological features) ของมะเร็งท่อน้ำดี | 7 |
| ตารางที่ 2 | การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อระยะการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดย multivariate Cox proportional hazard regression analysis | 9 |



สารบัญภาพ

| | | หน้า |
|----------|---|------|
| ภาพที่ 1 | การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ในนิวเคลียสของเซลล์ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry A) เซลล์ตับ (หัวลูกศรสีดำ) ที่อยู่บริเวณรอยต่อกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี B) เซลล์เยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีบริเวณท่อน้ำดีที่มีการขยายตัว (Bile duct dilation with hyperplasia) C) เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ผลบวก D) เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ผลลบ | 5 |
| ภาพที่ 2 | Kplan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับการแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> | 8 |



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดี คือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดี อุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตของมะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก แต่พบอุบัติการณ์สูงที่สุดบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (1-7) เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) ที่มีอัตราการติดเชื้อสูงในบริเวณดังกล่าว โดยพยาธิดังกล่าวได้ถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่มที่ 1 (Group 1 carcinogen) จาก International Agency for Research on Cancer (IARC) ภายใต้องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) (8-10) มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีการเติบโตช้าแต่มีการลุกลามและการแพร่กระจายสูง เนื่องจากไม่มีอาการแสดงที่ชัดเจนในระยะแรกของโรค ผู้ป่วยจึงมารับการรักษาเมื่อมะเร็งเข้าสู่ระยะท้าย การรักษาด้วยการผ่าตัดถือเป็นการรักษาที่ให้ผลดีที่สุด และระยะรอดชีพเพิ่มขึ้นหากได้รับการให้ยาเคมีบำบัดหลังการผ่าตัด แต่เนื่องจากผู้ป่วยมาพบแพทย์ในระยะที่มีการแพร่กระจายหรือระยะท้ายของโรค การผ่าตัดหรือการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดจึงเป็นการรักษาเพื่อบรรเทาอาการของผู้ป่วยเท่านั้น (11)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของมะเร็งท่อน้ำดีมีเพิ่มมากขึ้น ณ ปัจจุบัน ทำให้ค้นพบยีนที่มีการกลายพันธุ์หลากหลายยีนที่เชื่อว่า มีผลต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีโดยเฉพาะยีน *TP53 Kras SMAD4* เป็นต้น (12-13) และด้วยการศึกษาทางพันธุกรรมโดยเทคนิคขั้นสูงที่เรียก whole exome recapture sequencing ในมะเร็งท่อน้ำดีที่มีปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ สามารถค้นพบยีนกลายพันธุ์ใหม่ๆหลายยีนที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดี โดยหนึ่งในกลุ่มของยีนกลายพันธุ์ใหม่คือยีน Ring finger protein 43 (*RNF43*) พบมีการกลายพันธุ์ประมาณ 9 % ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (12) และยังมีรายงานการกลายพันธุ์ของยีนนี้ในมะเร็งอีกหลายชนิดได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (14) มะเร็งตับอ่อน (15-16) มะเร็งรังไข่ (17-19) มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งมดลูก (20) เป็นต้น ยีน *RNF43* หรือ RING-type E3 ubiquitin ligase เป็นยีนที่มีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ที่เรียกว่า Wnt/ β -catenin signaling pathway โดย *RNF43* จะทำหน้าที่ควบคุมปริมาณตัวรับสัญญาณ (frizzled receptor) โดยเร่งให้มีการย่อยสลายตัวรับดังกล่าว (21) ยีน *RNF43* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (tumor suppressor gene) เนื่องจากหลายการศึกษาพบ ยีน *RNF43* มีการกลายพันธุ์และส่งผลให้ไม่มีหรือมีการแสดงออกของยีนลดลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคที่ไม่ดี จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อมะเร็งท่อน้ำดี ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง

งานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาการแสดงออกของยีน *RNF43* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับอาการทางคลินิกและระยะรอดชีพ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้พยากรณ์ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีหรือพยากรณ์การดำเนินของโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *RNF43* กับพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *RNF43* กับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาทางชีวเคมีในระดับ โมเลกุลดังนี้

1. ศึกษาการแสดงออกของ *RNF43* ในเนื้อเยื่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เทคนิค immunohistochemistry
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับพยาธิสภาพทางคลินิก หรือ การพยากรณ์โรค โดยการวิเคราะห์ทางสถิติ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่ได้หลังจากเสร็จสิ้น โครงการงานวิจัยนี้คือ การแสดงออกของยีน Ring finger protein 43 (*RNF43*) ที่ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี มีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จากข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกว่า การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อน่าจะนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีนี้ และจากผลการศึกษานี้จะถูกนำไปศึกษาต่อยอด เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ ในการอธิบายกลไกการเกิดและพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ ผลของงานวิจัยครั้งนี้ได้ถูกนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2 ครั้ง (รายละเอียดตามเอกสารใน ภาคผนวก ก)

- 1) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 1 ครั้ง ในรูปแบบของโปสเตอร์ (poster presentation) ได้แก่
 - งานประชุมวิชาการนานาชาติ 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) ซึ่งจัดขึ้นในระหว่างวันที่ 4-9 กรกฎาคม 2558 ณ เมือง เบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี โดยนำเสนอในชื่อ Reduced expression of RNF43 is associated with the presence of somatic mutation and poor prognosis of cholangiocarcinoma patients
- 2) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 1 ครั้ง ในรูปแบบของการนำเสนอปากเปล่า (oral presentation) ได้แก่
 - งานประชุมวิชาการนานาชาติ Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for Cancer Research ซึ่งจัดขึ้นในระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำเสนอในชื่อ Reduced expression of Ring finger protein 43 indicates a poor prognosis of cholangiocarcinoma

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ใช้เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ผ่านกระบวนการเตรียมและเก็บเนื้อเยื่อให้คงสภาพที่เรียกว่า paraffin-embedded blocks โดยเนื้อเยื่อมะเร็งดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1. ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 50 ตัวอย่าง ได้มาจากคนไข้ที่เข้ารับการรักษาด้วยการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทุกรายได้ลงนามยินยอมให้นำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปใช้เพื่อการวิจัย (จริยธรรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น;HE521209 และจริยธรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี; EC-57-25) และทุกตัวอย่างนี้ได้มีการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (Pathological examination) ยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี
2. ข้อมูลทางพยาธิคลินิก (clinicopathological features) ดังแสดงในตารางที่ 1 และระยะการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (survival time) ได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแต่ละรายจะถูกบันทึกจากวันที่ได้รับการผ่าตัดจนถึงวันที่ผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคแต่ต้องมากกว่า 30 วันขึ้นไป หรือจนถึงวันที่ 27 ตุลาคม 2557 โดยระยะเวลาการติดตามระยะรอดชีพของผู้ป่วยทั้งหมด เฉลี่ยอย่างน้อย 4 ปี ค่ามัธยฐาน 10 เดือนหรืออยู่ในช่วง 1-83 เดือน

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

การย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยตัวจับอย่างจำเพาะต่อยีน *RNF43* ด้วยวิธี **Immunohistochemistry** เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีถูกนำมารักษาสภาพด้วย 10 % ฟอร์มอลิน และเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจะถูกนำไปขึ้นรูปในพาราฟิน (formalin fixation and paraffin embedded section) หลังจากนั้นจะนำเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ขึ้นรูปฝังในพาราฟินนี้ไปตัดให้เป็นแผ่นเนื้อเยื่อบางๆ ขนาด 5 ไมโครเมตร เนื้อเยื่อแผ่นบางนี้ถูกนำมาตั้งบนแผ่นกระจก (glass slide) เพื่อจะนำไปใช้ในการย้อมสีต่อไป หลังจากกระบวนการตัดและตั้งเนื้อเยื่อแผ่นบางบนกระจกสไลด์แล้ว เนื้อเยื่อดังกล่าวถูกนำไปเข้ากระบวนการเอาพาราฟินออก (deparaffinization) และนำน้ำเข้า (rehydration) ด้วยไซลีน และ แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 100, 90 และ 70 ตามลำดับ จากนั้นเนื้อเยื่อมะเร็งถูกนำไปต้มใน 0.1 M citrate buffer pH 6.0 โดยอุ่นในไมโครเวฟเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้โปรตีนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์เปิดเผยออกมา หลังจากต้มรอให้เนื้อเยื่อเย็น และเติม 0.5% H₂O₂ ในเมทานอล เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิห้อง และเติม 20% normal horse serum เป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน เพื่อทำป้องกันการเกิดการย้อมสีแบบไม่จำเพาะ เมื่อครบเวลาเติม primary rabbit anti-human RNF43 polyclonal antibody ความเข้มข้น 1:100 ลงในเนื้อเยื่อและบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในภาชนะที่มีความชื้น วันถัดมาล้างเอาส่วนเกินของ primary rabbit anti-human RNF43 polyclonal antibody และตามด้วยการเติมสาร

Envision™/HRP, Rabbit (Dako, Carpinteria, CA) และ 3'3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride; Liquid DAB+ (Dako, Carpinteria, CA) เพื่อให้เกิดสีน้ำตาลแดงบริเวณที่มี primary rabbit anti-human RNF43 polyclonal antibody จับอยู่ เนื้อเยื่อนี้ถูกนำไปย้อมต่อด้วย hematoxylin เพื่อให้เห็นขอบเขตของเซลล์ ความจำเพาะของการย้อมนี้ ทางผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีควบคุมที่ให้ผลลบ โดยไม่เติม primary rabbit anti-human RNF43 polyclonal antibody จำนวน 1 ตัวอย่างและเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีควบคุมที่ให้ผลบวกจำนวน 2 ตัวอย่าง (W039 และ T157) ทุกรอบของการย้อม immunohistochemistry การแปลผลเนื่องจากผลบวกของการติดสีน้ำตาลแดงในนิวเคลียสมีลักษณะความเข้มของการติดสีเท่าๆกัน ดังนั้นการแปลผลจะถูกวิเคราะห์โดยร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ผลบวกต่อจำนวนเซลล์มะเร็งทั้งหมดที่ปรากฏในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีนั้น โดยจัดเป็นกลุ่มย่อยตามร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ผลการแสดงของยีน *RNF43* โดยมีเกณฑ์ในการให้เกรด 0 ถึง 3+ ดังนี้

0 = ไม่มีเซลล์ใดเลยติดสีน้ำตาลแดงที่นิวเคลียสของเซลล์ (0%) หรือ ผลลบ

1+ = พบเซลล์มะเร็งติดสีน้ำตาลแดงที่นิวเคลียสของเซลล์ (จำนวน 1% - 10 %)

2+ = พบเซลล์มะเร็งติดสีน้ำตาลแดงที่นิวเคลียสของเซลล์ (จำนวน 11% - 50%)

3+ = พบเซลล์มะเร็งติดสีน้ำตาลแดงที่นิวเคลียสของเซลล์ (จำนวน > 50% - 100%)

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *RNF43* จากการย้อมด้วยสารตัวจับจำเพาะถูกประเมินด้วยนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาจำนวน 2 ท่าน โดยแต่ละท่านไม่ได้รับการแจ้งรายละเอียดเกี่ยวกับอาการใดทางคลินิกเลย การนำผลการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยจำนวน 50 รายมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติ ทางผู้วิจัยได้แบ่งระดับของการแสดงออกเป็น 2 กลุ่มคือ การแสดงออกของยีน *RNF43* ต่ำ (low expression) เมื่อเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีนั้นให้เกรด 0 และ 1+ และกลุ่มการแสดงออกของยีน *RNF43* สูง เมื่อเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีนั้นให้เกรด 2+ และ 3+ (high expression)

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

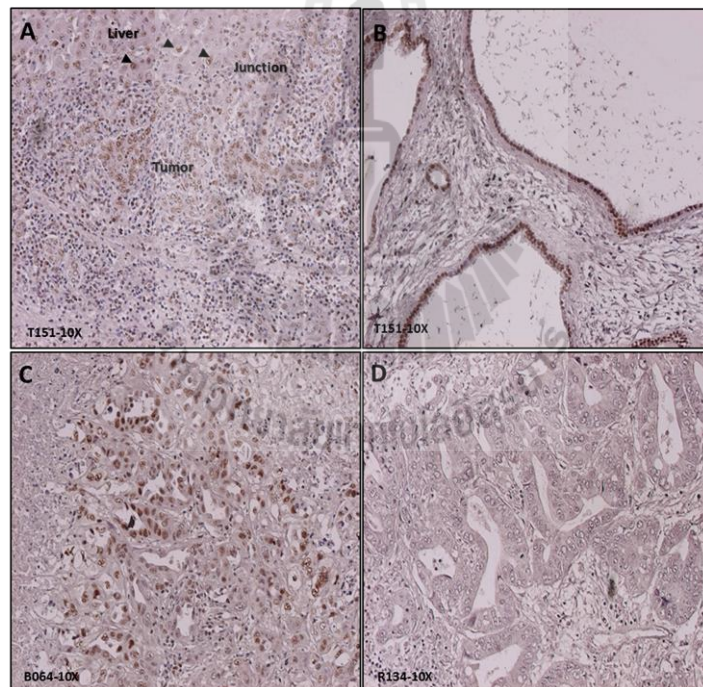
การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* กับอาการทางพยาธิคลินิก ถูกวิเคราะห์โดย chi-square test วิเคราะห์ระยะรอดชีพที่มีผลจากระดับการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่แตกต่างกันโดย Kaplan-Meier survival analysis และ เปรียบเทียบความแตกต่างของระยะรอดชีพของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่แตกต่างกันด้วย log-rank test โดยการวิเคราะห์ทางสถิติที่กล่าวมานี้ผ่านการวิเคราะห์โดย SPSS statistical software version 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). หากการวิเคราะห์ให้ผลมีนัยสำคัญทางสถิติ จะต้องมามีค่า $P < 0.05$

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การแสดงออกของยีน Ring finger protein 43 (*RNF43*) ที่ตำในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษาหาการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ทางผู้วิจัยสามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีได้จำนวน 50 ตัวอย่างโดยทั้งหมดนี้ถูกนำผ่านกระบวนการรักษาสภาพ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อจะถูกตัดให้มีขนาดหนา 5 ไมโครเมตรและนำไปยึดติดกับแผ่นกระจก (glass slide) และจะถูกนำไปย้อมด้วยวิธี Immunohistochemistry ซึ่งอาศัยตัวจับที่เรียกว่า antibody (rabbit anti-human *RNF43*) ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน *RNF43* ผลการศึกษาพบโปรตีน *RNF43* มีการแสดงออกในนิวเคลียสของเซลล์ตับ เซลล์เยื่อบุผนังท่อน้ำดีปกติ และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยไม่พบการแสดงออกในส่วนของไซโตพลาสซึมของเซลล์ใดๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 50 ตัวอย่าง พบจำนวน 18 ตัวอย่างที่ให้ผลการแสดงออกของยีน *RNF43* ในนิวเคลียส (เกรด +2 และ +3) คิดเป็น 36% และที่เหลืออีก 32 ตัวอย่างให้ผลลบคือมีการแสดงออกต่ำหรือไม่มีพบการแสดงออกเลย (เกรด 0 และ +1)



ภาพที่ 1 การแสดงออกของยีน *RNF43* ในนิวเคลียสของเซลล์ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry A) เซลล์ตับ (หัวลูกศรสีดำ) ที่อยู่บริเวณรอยต่อกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี B) เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีบริเวณท่อน้ำดีที่มีการขยายตัว (Bile duct dilation with hyperplasia) C) เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* สูง D) เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *RNF43*

2. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* และอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี

การวิเคราะห์ด้วยสถิติ chi-square test เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี โดยทางผู้วิจัยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็นสองกลุ่มโดยใช้การแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี กลุ่ม high expression คือผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีผลการย้อมเกรด 2+ และ 3+ ส่วนผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีผลการย้อมเกรด 0 และ 1+ จัดให้เป็นกลุ่ม low expression ผลการวิเคราะห์พบการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีในระดับสูงหรือต่ำไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาการทางพยาธิคลินิก ได้แก่ เพศ อายุ ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histological type) ระยะของโรค (Staging) การแพร่กระจายทางระบบน้ำเหลือง (Lymphatic invasion) และ การแพร่กระจายทางหลอดเลือด (Vascular invasion) ดังตารางที่ 1

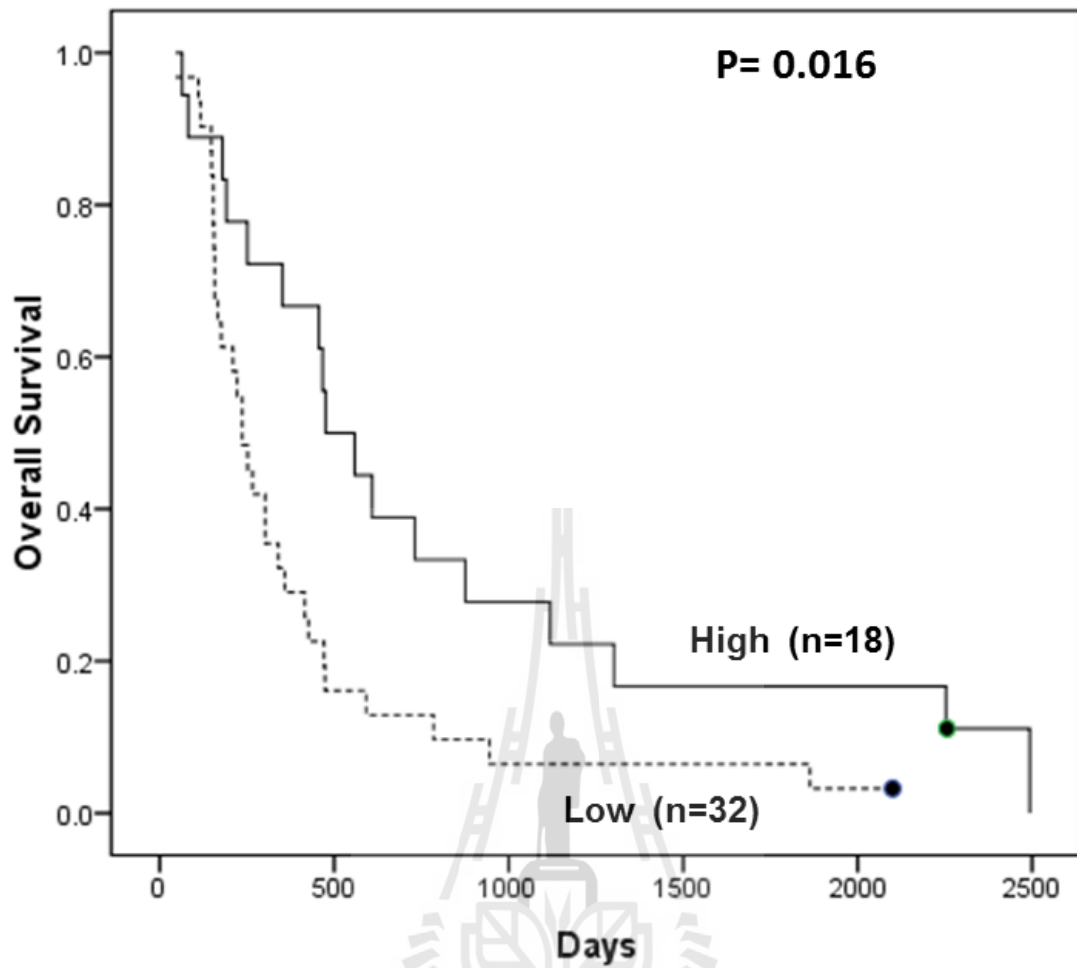
3. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* และระยะรอดชีวิต (overall survival time) ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ผลของการแสดงออกของยีน *RNF43* ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 49 รายจากจำนวนทั้งหมด 50 ราย ถูกนำมาวิเคราะห์กับระยะรอดชีวิต (survival analysis) ของผู้ป่วย โดยจำนวน 1 ราย ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อน 30 วันหลังจากได้รับการผ่าตัด (Preoperative dead) จะไม่นำมาวิเคราะห์เพื่อพิจารณาระยะรอดชีวิต Kaplan-Meier Curve พบผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* ต่ำหรือไม่มีการแสดงออกของยีน (*RNF43* negative) จำนวน 31 ราย (Median survival time = 237 ± 31 วัน) มีแนวโน้มของระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* สูงในเนื้อเยื่อมะเร็ง (*RNF43* positive) จำนวน 18 ราย (Median survival time = 475 ± 91 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.016$) ดังแสดงในภาพที่ 2 และเมื่อทดสอบโดย multivariate Cox proportional hazard regression analysis พบระยะรอดชีพที่สั้นลงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี มีความจำเพาะกับการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ต่ำหรือไม่มีการแสดงออก ($P=0.057$) โดยไม่มีผลจากปัจจัยทางพยาธิคลินิกอื่นๆ เช่น เพศ อายุ ลักษณะทางจุลพยาธิ ระยะของโรค และ ลักษณะการแพร่กระจายของมะเร็ง ดังแสดงตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinicopathological features) ของมะเร็งท่อน้ำดี

| ปัจจัยทางพยาธิคลินิก | การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> (<i>RNF43</i> expression) | | P value* |
|---|---|------------|----------|
| | ต่ำ (Low) | สูง (High) | |
| | (n = 32) | (n = 18) | |
| อายุ | | | |
| < 56 ปี | 14 | 6 | 0.470 |
| ≥ 56 ปี | 18 | 12 | |
| เพศ | | | |
| ชาย | 4 | 6 | 0.077 |
| หญิง | 28 | 12 | |
| ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histological type) | | | |
| Papillary type | 12 | 9 | 0.390 |
| Non-papillary type | 20 | 9 | |
| ระยะของโรค (Stage) | | | |
| I-II-III | 16 | 9 | >0.05 |
| IV | 16 | 9 | |
| การแพร่กระจายทางระบบน้ำเหลือง (Lymphatic invasion) | | | |
| มี | 24 | 12 | 0.529 |
| ไม่มี | 8 | 6 | |
| การแพร่กระจายทางหลอดเลือด (Vascular invasion) | | | |
| มี | 23 | 12 | 0.700 |
| ไม่มี | 9 | 6 | |

* P < 0.05 แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 2 Kaplan-Meier Curve แสดงระยะรอดชีพ (Overall survival time) ของผู้มะเร็งท่อน้ำดีกับการแสดงออกของยีน *RNF43*

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อระยะการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดย multivariate Cox proportional hazard regression analysis

| Variables | Univariate analysis ^a | | Multivariate analysis ^b | |
|--|--------------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|
| | Hazard ratio (95%CI) ^c | <i>P</i> | Hazard ratio (95%CI) | <i>P</i> ** |
| อายุ: ระหว่าง ≥ 56 ปี กับ < 56 ปี | 2.143 (0.986-4.656) | 0.049 | 1.746 (0.754-4.042) | 0.193 |
| เพศ: ระหว่าง ชาย กับ หญิง | 1.210 (0.666-2.198) | 0.530 | 1.206 (0.640-2.270) | 0.562 |
| ลักษณะทางจุลพยาธิ: ระหว่าง papillary vs. non-papillary | 1.739 (0.945-3.198) | 0.071 | 1.336 (0.656-2.720) | 0.424 |
| ระยะของโรค: ระหว่าง VI กับ I-III | 0.951 (0.529-1.709) | 0.865 | 0.803 (0.396-1.628) | 0.542 |
| การแพร่กระจายทางระบบน้ำเหลือง: ระหว่าง มี กับ ไม่มี | 1.067 (0.553-2.061) | 0.846 | 0.756 (0.339-1.688) | 0.495 |
| การแพร่กระจายทางหลอดเลือด: ระหว่าง มี กับ ไม่มี | 1.748 (0.920-3.320) | 0.083 | 1.822 (0.881-3.767) | 0.106 |
| การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i>: ระหว่าง ต่ำ กับ สูง | 2.142 (1.137-4.036) | 0.016 | 1.961 (0.981-3.920) | 0.057 |

^a Univariate analysis, Cox proportional hazards regression

^b Multivariate analysis, Cox proportional hazards regression

^c 95% CI, 95% confidence interval

** Partial likelihood ratio test

บทที่ 4

ข้อวิจารณ์

RING-type E3 ubiquitin ligase มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ ubiquitination เนื่องจากทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะผ่าน RING domain และนำส่ง ubiquitin สู่อำนาจโปรตีนเป้าหมายก่อนเข้าสู่กระบวนการสลายโปรตีนโดย proteasome ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับความผิดปกติของการแสดงออกของยีนหรือการกลายพันธุ์ของ RING-type E3 ubiquitin ligase หลายชนิด ในมะเร็งหลายชนิดโดยพบความผิดปกติของ RING-type E3 ubiquitin ligase ดังกล่าวสัมพันธ์กับการดำเนินการพัฒนาของมะเร็ง (22) เนื่องจาก RING-type E3 ubiquitin ligase มีผลต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการตายของเซลล์มะเร็งเหล่านั้น (23) ring finger protein 43 หรือ *RNF43* เป็นยีนที่จัดในกลุ่ม RING-type E3 ubiquitin ligase ที่พบมีการกลายพันธุ์ในมะเร็งหลากหลายชนิด หมายรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดี (12) ซึ่งพบว่าหากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* จะสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลง ในการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัยพบการแสดงออกของยีน *RNF43* สามารถตรวจพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ตับเซลล์เยื่อหุ้มท่อน้ำดี และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบอีกว่าการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มีระดับต่ำหรือไม่มีการแสดงออกเลย ซึ่งสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* กับอาการทางพยาธิคลินิก เช่น เพศ อายุ ลักษณะทางจุลพยาธิ ระยะของโรค การแพร่กระจายทางระบบน้ำเหลือง และการแพร่กระจายทางหลอดเลือด เป็นต้น จากผลการศึกษาทำให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกับมะเร็งสมองและตับอ่อน (16,24) เมื่อทำการทดสอบ Cox- regression analysis เพื่อค้นหาความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *RNF43* กับระยะรอดชีพ พบการแสดงออกของยีน *RNF43* ในการศึกษาครั้งนี้มีจำเพาะกับมะเร็งท่อน้ำดีโดยที่ไม่มีผลจากปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ เพศ อายุ ระยะของโรค ลักษณะทางจุลพยาธิ เป็นต้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 50 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่แล้วมาจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะท้ายของโรค จากข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่ต่ำลงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้อิสระเพื่อพยากรณ์โรคให้แก่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหลังผ่าตัดได้ และยีน *RNF43* น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญในการเจริญหรือพัฒนาของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นหน้าที่การทำงานของยีนนี้ในมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความสำคัญที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ของผู้วิจัย แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน ring finger protein 43 หรือ *RNF43* ที่ต่ำลงมีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* จะมีระยะรอดชีพที่สั้นลง (12) โดยข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* มีคุณสมบัติที่เรียกว่า tumor suppressor gene และอาจจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องในด้านการควบคุมการเจริญของเซลล์หรือการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยผลการศึกษานี้ ทำให้นำไปสู่การศึกษาต่อของทางผู้วิจัยในแง่บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของยีน *RNF43* เพื่อช่วยยืนยันความสำคัญของยีน *RNF43* ในมะเร็งท่อน้ำดี และอาจนำไปสู่การนำยีนนี้ไปเป็นยีนเป้าหมายในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป



บรรณานุกรม

1. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 2005; 366(9493):1303-14.
2. Khan SA, Emadossadaty S, Ladep NG, Thomas HC, Elliott P, Taylor-Robinson SD, et al. Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? *J Hepatol*. 2012; 56(4):848-54.
3. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*. 2004; 24(2):115-25.
4. Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol*. 2004; 40(3):472-7.
5. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*. 2001; 33(6):1353-7.
6. Shin HR, Oh JK, Lim MK, Shin A, Kong HJ, Jung KW, et al. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma and clonorchiasis in Korea. *J Korean Med Sci*. 2010; 25(7):1011-6.
7. Bertuccio P, Bosetti C, Levi F, Decarli A, Negri E, La Vecchia C. A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe. *Ann Oncol*. 2013; 24(6):1667-74.
8. Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop*. 2011; 120 Suppl 1:S158-68.
9. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med*. 2007; 4(7):e201.
10. IARC. Shistosomes, liver fluke and helicobactor pylori. International Agency for Research on cancer, World Health Organization; 1994
11. Bhudhisawasdi V, Talabnin C, Pugkhem A, Khuntikeo N, Seow OT, Chur-in S, et al. Evaluation of postoperative adjuvant chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma patients undergoing R1 and R2 resections. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13 Suppl:169-74.
12. Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet*. 2012; 44(6):690-3.
13. Churi CR, Shroff R, Wang Y, Rashid A, Kang HC, Weatherly J, et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PloS one* 2014; 9: e115383.

14. Chan-On W, Nairismagi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet.* 2013; 45(12):1474-8.
15. Wu J, Jiao Y, Dal Molin M, Maitra A, de Wilde RF, Wood LD, et al. Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(52):21188-93.
16. Sakamoto H, Kuboki Y, Hatori T, Yamamoto M, Sugiyama M, Shibata N, et al. Clinicopathological significance of somatic *RNF43* mutation and aberrant expression of ring finger protein 43 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* 2015; 28(2):261-7.
17. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Rowley SM, Christie M, Allan PE, et al. *RNF43* is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. *J Pathol.* 2013; 229(3):469-76.
18. Zou Y, Wang F, Liu FY, Huang MZ, Li W, Yuan XQ, et al. *RNF43* mutations are recurrent in Chinese patients with mucinous ovarian carcinoma but absent in other subtypes of ovarian cancer. *Gene.* 2013; 531(1):112-6.
19. Zou Y, Huang MZ, Liu FY, Yang BC, Wang LQ, Wang F, et al. Absence of and hotspot mutations in patients with various subtypes of ovarian carcinomas. *Biomed Rep.* 2015; 3(1):33-7.
20. Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, et al. *RNF43* is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet.* 2014; 46(12):1264-6.
21. Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, et al. Tumour suppressor *RNF43* is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature.* 2012; 488(7413):665-9.
22. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 2009; 78: 399-434.
23. Ding F, Xiao H, Wang M et al. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment. *Frontiers in bioscience* 2014; 19: 886-895.
24. Xi S, Zhang X, Chen H et al. Downregulation of ring-finger protein 43 in glioma associates with poor prognosis. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015; 8: 490-496.

ภาคผนวก ก



Reduced expression of RNF43 is associated with the presence of somatic mutation and poor prognosis of cholangiocarcinoma patients



Chutima Talabnin^{1*}, Patcharee Jantaworn¹, Sunisa Thongsom¹, Krajang Talabnin², Wipa Suginta¹, Sopit Wongkham²

¹Biochemistry/Electrochemistry Research Unit, School 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
³School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Abstract

Ring finger Protein 43 (RNF43) encodes an E3 ubiquitin-protein ligase that negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway. RNF43 reduces Wnt signals by selectively ubiquitinating frizzled receptors, thereby targeting these Wnt receptors for degradation. It has been shown that RNF43 is frequently mutated in cholangiocarcinoma (CCA). In this study, we determined RNF43 polymorphisms and expression in CCA tissues and demonstrated the correlation between RNF43 expression and RNF43 mutation status, RNF43 polymorphism, clinicopathological features and prognosis of CCA patients. We found that RNF43 had a reduced expression in CCA. The reduction of RNF43 mRNA expression was significantly correlated with the presence of RNF43 rs2257205 and RNF43 somatic mutation. In addition, the protein expression of RNF43 was also confirmed that all RNF43 somatic mutations in CCA are inactivated. Overall survival was worst in patients with low protein expression of RNF43. However, there was no statistically significant association of RNF43 mRNA or protein expression and any clinicopathological features or RNF43 polymorphism (RNF43 rs3744093 and rs2257205 genotypes) respectively. These results indicate that RNF43 mutation might cause down regulation of the expression of RNF43 and RNF43 may play a crucial role during development of CCA.

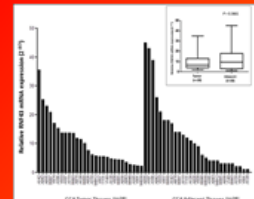


Figure 2. The RNF43 mRNA expression level is downregulated in CCA.

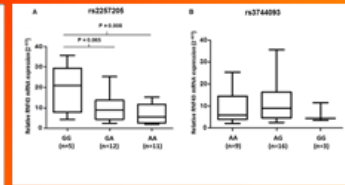


Figure 3. The association between RNF43 polymorphism and RNF43 mRNA expression levels. A, RNF43 rs2257205 influences the mRNA levels of RNF43, $P = 0.008$ between GA vs GG genotypes. $P = 0.008$ between AA vs GG genotypes. B, RNF43 rs3744093 status was not shown the association with RNF43 mRNA levels.

Materials and Methods

Sequencing Analysis
 Sequencing traces from all coding sequence (10 exons) of RNF43 genes in 50 CCA tissues and adjacent non-tumorous tissues of same patient were performed from our previous study (12). We obtained all sequencing traces to determine RNF43 polymorphisms. We compared our variants against the common polymorphisms present in dbSNP 131 and 132 databases. In order to validate any common SNPs.

Immunohistochemical Analysis
 Immunohistochemical staining was performed by an immunoperoxidase method using rabbit anti-human RNF43 polyclonal antibody (Sigma-Aldrich, Singapore). The section was visualized with 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride, Liquid DAB+ (Dako, Carpinteria, CA), counterstained with hematoxylin.

Quantitative real-time PCR analysis (qPCR)
 Total RNA was extracted from tumor tissues and adjacent non-tumorous tissues of same patient using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized using superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the instructions. Expression levels of RNF43 gene was determined by SYBR Green-based real time PCR in Light Cycler® 480 II machine (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA). The β -actin served as an internal control to adjust the amount of starting cDNA. The expression of RNF43 gene was calculated by the 2^{-CT} equation.

Results

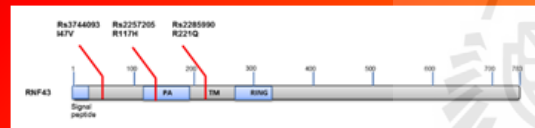


Figure 1. RNF43 polymorphisms in CCA and locations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the RNF43 gene. Red line indicates the positions of each RNF43 polymorphisms. PA, protease-associated finger domain; TM, transmembrane domain; and RING, ring finger domain.

Table 1. The association between RNF43 rs3744093 or rs2257205 genotypes and clinicopathological features (N=50)

| Variables | rs3744093 AA (n=22) | rs3744093 AG + GG (n=28) | P value | rs2257205 CC genotype (n=10) | rs2257205 CA + GG genotype (n=20) | P value |
|---------------------|------------------------|-----------------------------|---------|---------------------------------|--------------------------------------|---------|
| Age | | | | | | |
| ≤35 years | 5 | 8 | 0.62 | 4 | 6 | 0.29 |
| >35 years | 18 | 21 | | 8 | 14 | |
| Sex | | | | | | |
| Male | 10 | 17 | 0.206 | 7 | 10 | 0.289 |
| Female | 7 | 11 | | 6 | 10 | |
| Histological type | | | | | | |
| Ductal type | 6 | 10 | 0.16 | 2 | 10 | 0.761 |
| Neuropilillary type | 14 | 18 | | 8 | 10 | |
| Stage | | | | | | |
| pT0-T2 | 10 | 10 | <0.05 | 7 | 10 | 0.717 |
| T3 | 10 | 10 | | 6 | 10 | |
| Lymphatic invasion | | | | | | |
| Present | 7 | 7 | 0.268 | 5 | 10 | 0.229 |
| Absent | 10 | 11 | | 11 | 10 | |
| Vascular invasion | | | | | | |
| Present | 6 | 9 | <0.05 | 7 | 9 | 0.14 |
| Absent | 14 | 19 | | 7 | 10 | |

Conclusion

RNF43 expression was downregulated in CCA. RNF43 somatic mutations might be the cause decreasing in RNF43 expression. RNF43 might play crucial roles in cholangiocarcinogenesis and progression. Blocking the pathway may lead into an appropriate therapy for patients with CCA. Moreover, CCA patients with reduced RNF43 expression or the presence of RNF43 somatic mutations were associated with poor prognosis. Therefore both RNF43 expression levels and somatic mutations may serve as a prognostic marker of CCA.

Acknowledgments

This work was co-supported by the Young Research Grants, Thailand Research Fund (TRG5630041) for C. Talabnin, the National Research Council of Thailand, and The National Research Project, Suranaree University of Technology. We also thank the Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for the participation in collecting patient data and tumor samples.

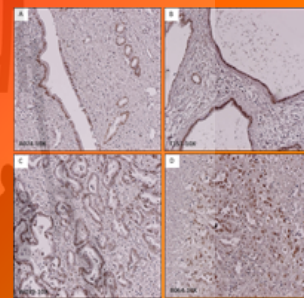


Figure 4. The nuclear immunoreactivity of RNF43 in CCA at the (A) small bile duct and (B) dilation of bile duct with hyperplasia and (C & D) tumor area of CCA (x10).

Table 2. The association between RNF43 expression and clinicopathological features (N=50)

| Variables | RNF43 expression Positive (n=22) | RNF43 expression Negative (n=28) | P value |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------|
| Age | | | |
| ≤35 years | 11 | 6 | 0.47 |
| >35 years | 10 | 12 | |
| Sex | | | |
| Male | 6 | 6 | 0.977 |
| Female | 10 | 12 | |
| Histological type | | | |
| Ductal type | 10 | 8 | 0.28 |
| Neuropilillary type | 10 | 8 | |
| Stage | | | |
| pT0-T2 | 10 | 8 | <0.05 |
| T3 | 10 | 8 | |
| Lymphatic invasion | | | |
| Present | 11 | 11 | 0.229 |
| Absent | 8 | 6 | |
| Vascular invasion | | | |
| Present | 10 | 10 | 0.7 |
| Absent | 8 | 6 | |
| RNF43 somatic mutation | | | |
| Present | 3 | 6 | 0.077 |
| Absent | 17 | 18 | |
| rs3744093 | | | |
| AA+AG | 10 | 7 | 0.719 |
| AG+GG | 10 | 11 | |
| rs2257205 | | | |
| CC+CA | 8 | 6 | 0.881 |
| CA+GG | 10 | 10 | |

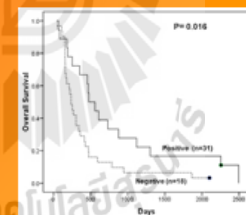


Figure 5. Cumulative overall survival was determined using Kaplan-Meier analysis for CCA patients with high expression of RNF43 (positive) had a better survival than those with a low expression of RNF43 (negative). Black circles indicate censor cases.

Table 3. Univariate and Multivariate analysis of factors associated with survival

| Variables | Univariate analysis ^a Hazard ratio (95%CI) ^b | P value | Multivariate analysis ^c Hazard ratio (95%CI) ^b | P value ^d |
|---|--|---------|--|----------------------|
| Age: ≤35 years vs >35 years | 1.13 (0.899-1.422) | 0.618 | 1.705 (0.782-3.806) | 0.162 |
| Sex: male vs female | 1.119 (0.569-2.199) | 0.751 | 1.029 (0.443-2.336) | 0.952 |
| Histological type: ductal type vs neuropilillary type CCA | 1.718 (0.812-3.192) | 0.271 | na | |
| Tumor: Stage T3 vs pT0-T2 | 0.851 (0.228-3.178) | 0.822 | na | |
| Lymphatic invasion: present vs absent | 1.027 (0.222-5.022) | 0.962 | na | |
| Vascular invasion: present vs absent | 1.718 (0.912-3.192) | 0.092 | na | |
| RNF43 expression: positive vs. negative | 0.407 (0.212-0.822) | 0.016 | 0.203 (0.071-0.566) | 0.006 |
| RNF43 rs2257205: variant vs wild type | 0.702 (0.248-2.148) | 0.529 | na | |
| RNF43 rs3744093: variant vs wild type | 0.719 (0.289-1.916) | 0.52 | na | |
| RNF43 somatic mutation: present vs. absent | 0.702 (0.289-1.916) | <0.001 | 0.712 (0.228-2.272) | 0.004 |

^aUnivariate analysis, Cox proportional hazards regression.
^b95% CI, 95% confidence interval.
^cna, not applicable. ^dna, not applicable. ^eCI, not applicable. ^fna, not applicable.

Oral presentation**Reduced expression of Ring Finger Protein 43 indicates a poor prognosis of cholangiocarcinoma**

Chutima Talabnin¹, Patcharee Janthavon¹, Sunisa Thongsom¹, Krajang Talabnin³,
Wipa Suginta¹, Sopit Wongkham²

¹Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School 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

³School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

e-mail address: chutima.sub@sut.ac.th

Ring finger Protein 43 (RNF43) encodes an E3 ubiquitin-protein ligase that negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway. RNF43 reduces Wnt signals by selectively ubiquitinating frizzled receptors, thereby targeting these Wnt receptors for degradation. It has been shown that RNF43 is frequently mutated in cholangiocarcinoma (CCA). In this study, we determined RNF43 polymorphisms and expression in CCA tissues and demonstrated the correlation between RNF43 expression and RNF43 mutation status, RNF43 polymorphism, clinicopathological features and prognosis of CCA patients. We found that RNF43 had a reduced expression in CCA. The downregulation of RNF43 mRNA expression was significantly correlated with the presence of RNF43 rs2257205 and RNF43 somatic mutation. In addition, the protein expression of RNF43 was also confirmed that all RNF43 somatic mutations in CCA are inactivated. Overall survival was worst in patients with downregulation of RNF43 protein expression. However, there was no statistically significant association of RNF43 mRNA or protein expression and any clinicopathological features or RNF43 polymorphism (RNF43 rs3744093 and rs2257205 genotypes) respectively. Preliminary studies on biological functions of RNF43 showed that knockdown of RNF43 lacking Wnt protein activation could induce G1-S arrest and inhibit cell migration in CCA cells. These results indicate that RNF43 somatic mutations might cause down regulation of the expression of RNF43 and RNF43 may play a crucial role during development of CCA.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Ring Finger Protein 43 (RNF43), Prognostic marker

Certificate of Attendance



This is to certify that

Dr. Chutima Talabnin

has attended

**“Frontier in Cancer Research I:
Systems Biology for Cancer Research”**

On 7-8 May 2015 at Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sopit Wongkham', is written over a faint watermark of the Khon Kaen University seal.

Professor Sopit Wongkham
Chairman, Organizing Committee



ที่ ศธ 0514.7.2.6/ว.434

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วันที่ ๙ เมษายน 2558

เรื่อง ขอเรียนเชิญประชุมวิชาการนานาชาติ Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for cancer research

เรียน ดร. ชุตินา ตลับนิล

สิ่งที่ส่งมาด้วย รายละเอียดการจัดประชุม

ด้วยภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กลุ่มวิจัยภายใต้การสนับสนุนของทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. และมหาวิทยาลัยขอนแก่น (RTA5780012) มีความประสงค์จะจัดประชุมวิชาการนานาชาติ ในหัวข้อ Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for cancer research ระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รายละเอียดตามเอกสารแนบท้าย) โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการเผยแพร่และพัฒนาเทคโนโลยีการวิจัยด้าน systems biology และการวิจัยโดยใช้ high-content imaging ให้กับนักวิจัยไทยที่สนใจการวิจัยด้านมะเร็ง เพื่อแลกเปลี่ยนเรียนรู้ และสร้างเครือข่ายระหว่างนักวิจัยไทยกับนักวิจัยนานาชาติ โดยข้าราชการ สังกัดกระทรวง ทบวง และ บุคลากรทั่วไป สามารถเข้าร่วมประชุมได้โดยไม่ถือเป็นวันลา และสามารถเบิกค่าเดินทางและค่าที่พักได้ตามสิทธิ์ ตามระเบียบของกระทรวงการคลังแต่ต้องได้รับอนุญาตจากผู้บังคับบัญชาก่อน

คณะกรรมการดำเนินการจัดประชุมจึงขอเรียนเชิญท่าน และผู้ร่วมงานวิจัยร่วมเสนอผลงานแบบวาจา และเข้าร่วมประชุมดังกล่าว โดยไม่มีค่าลงทะเบียน ทั้งนี้คณะผู้จัดประชุมจะสนับสนุนค่าเดินทางและที่พักระหว่างการประชุมของท่านและคณะผู้วิจัยของท่าน รวม 2 คน และโปรดประชาสัมพันธ์บุคลากรในหน่วยงานท่านให้ทราบด้วย โดยโปรดตอบรับด้วยการแจ้งชื่อ สังกัดและ e-mail มาที่ fcrlmeeting@gmail.com ภายใน 20 เม.ย. 2558 และส่งบทคัดย่อภายใน 27 เม.ย. 2558 รายละเอียดตามเอกสารแนบท้าย ขอขอบคุณ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์โสพิศ วงศ์คำ)

ประธานคณะกรรมการดำเนินงาน

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

โทรศัพท์/โทรสาร 0-4336-3265, 0-4334-8386

E-mail: fcrlmeeting@gmail.com

ประวัติผู้วิจัย

ดร.ชุตินา ตลับนิต (ทรัพย์อ้อมเอิบ) 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.

Cholangiocarcinoma: Experience of Srinagarind Hospital (2012) Srinagarind Med J, 27, pp 331-9

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

Subimerb C, Wongkham C, Khuntikeo N, Leelayuwat C, McGrath MS, Wongkham S.

Transcriptional Profiles of Peripheral Blood Leukocytes Identify Patients with Cholangiocarcinoma and Predict Outcome (2014) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15, pp. 4217-4224.

Chusorn P., Namwat N., Loilome W., Techaßen A., Pairojkul C., Khuntikeo N., Dechakhamphu

A., Talabnin C., Chan-On W., Ong C. K., Teh BT., Yongvanit P. Overexpression of microRNA-21 regulating PDCD4 during tumorigenesis of liver fluke-associated cholangiocarcinoma contributes to tumor growth and metastasis (2013) Tumor biology, 34 (3), pp. 1579-1588

Bhudhisawasdi, V., Pugkhem, A., **Talabnin, C.**, Khuntikeo, N., Seow, OT., Chur-in, S.,

Wongkham, S. Evaluation of postoperative adjuvant chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma patients with R1 and R2 resections (2012) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, (13), KGU 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. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma (2012) *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., Dalgliesh, 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. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma (2011) *Nature*, 469 (7331), pp. 539-542.

Subimerb, C., Pinlaor, S., Lulitanond, V., Khuntikeo, N., Okada, S., McGrath, M.S., Wongkham, S. 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. Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma (2010) *Molecular Medicine Reports*, 3 (4), pp. 597-605.

