



รายงานการวิจัย

สารชีวตัวชีวภาพคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี Glycan Biomarkers in Serum of Cholangiocarcinoma Patients



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

สารชีวตัวชีวภาพคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
Glycan Biomarkers in Serum of Cholangiocarcinoma Patients

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กระจ่าง ตลับนิล

สาขาวิชาพยาธิวิทยา

สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องสารชีวดีชีวภาพคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี สามารถสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ ข้าพเจ้า ดร.กระจ่าง ตลับนิล หัวหน้าโครงการวิจัย ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุตติมา ตลับนิล อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี Miss Mayumi Ishihara ผู้เชี่ยวชาญด้านไกลโคโปรตีน และ Dr. Parastoo Azadi ผู้เชี่ยวชาญด้าน Mass Spectrometry จาก Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia, USA ที่ให้คำปรึกษาทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในการศึกษา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558

กระจ่าง ตลับนิล
พฤษภาคม 2560

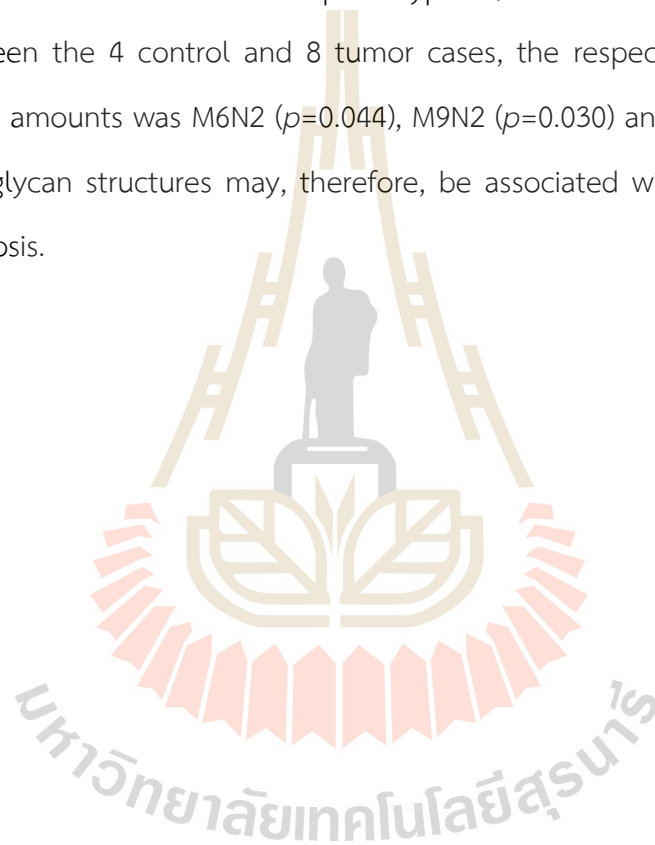


บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเติมสารคาร์โบไฮเดรตให้กับโปรตีนมีการรายงานในมะเร็งชนิดต่างๆ รวมถึงในมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์รูปแบบของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ที่มีการแสดงออกในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมของประชากรปกติ โดยอาศัยเทคนิค mass spectrometry ผลการศึกษาพบว่า รูปแบบสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ประกอบด้วย 9 โครงสร้าง โดยแบ่งเป็นโครงสร้างแบบ high-mannose types จำนวน 5 โครงสร้าง (M5N2, M6N2, M7N2, M8N2 และ M9N2) และโครงสร้างแบบ complex types จำนวน 4 โครงสร้าง (NeuAc1H2N2M3N2, NeuAc2H2N2M3N2, NeuAc2H2N3M3N2F และ NeuAc3H3N3M3N2F) พบว่า M7N2 มีการแสดงออกมากที่สุดในกลุ่มของโครงสร้างแบบ high-mannose types (control $12.12 \pm 2.54\%$ vs. tumor $9.27 \pm 2.66\%$) และ NeuAc2H2N2M3N2 มีการแสดงออกมากที่สุดในกลุ่มของโครงสร้างแบบ complex types (control $61.17 \pm 2.55\%$ vs. tumor $64.68 \pm 4.23\%$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ($n=8$) กับซีรัมของประชากรปกติ ($n=4$) พบว่าการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด M6N2 ($p=0.044$) และ NeuAc3H3N3M3N2F ($p=0.002$) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้าม สารคาร์โบไฮเดรตชนิด M9N2 ($p=0.030$) มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตที่เปลี่ยนแปลงในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของสารคาร์โบไฮเดรตกับการดำเนินโรค ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการพยากรณ์โรคของมะเร็งท่อน้ำดีได้

Abstract

Alterations in protein glycosylation have been reported in various cancers, including cholangiocarcinoma (CCA). Using nanospray ionization-linear ion trap mass spectrometry (NSI-MSⁿ), we demonstrated the comparative structural glycomics of the *N*-linked glycans in serum from CCA patients compared with healthy controls. Five high-mannose types and 4 complex types of *N*-linked glycans were detected. M7N2 was the most abundant structure among the high-mannose types (control 12.12±2.54% vs. tumor 9.27±2.66%), while NeuAc2H2N2M3N2 predominated the complex types (control 61.17±2.55% vs. tumor 64.68±4.23%). Between the 4 control and 8 tumor cases, the respective 3 *N*-glycans with significantly different amounts was M6N2 ($p=0.044$), M9N2 ($p=0.030$) and NeuAc3H3N3M3N2F ($p=0.002$). These 3 glycan structures may, therefore, be associated with tumor progression and useful for diagnosis.



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ข
สารบัญ	ค
สารบัญรูป	ค
สารบัญตาราง	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี	5
วิธีดำเนินการวิจัย	5
สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล	6
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
โครงสร้างสารคาร์โบไฮเดรตชนิด <i>N</i> -glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัม ประชากรปกติ	9
การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด <i>N</i> -glycans ในซีรัมของผู้ป่วย มะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ	12
ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด <i>N</i> -glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็ง ท่อน้ำดีกับลักษณะทางพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิก	12
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	14
บรรณานุกรม	16
ภาคผนวก	
ผลงานการตีพิมพ์	22
ประวัติผู้วิจัย	30

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.	รูปแบบสารคาร์โบไฮเดรตชนิด <i>N</i> -glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และซีรัมของประชากรปกติโดย NSI-MS	9
รูปที่ 2.	การวิเคราะห์อนุพันธ์ (MS^2) โครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตแบบ high-mannose types และ complex types จากซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	10



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. การแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด <i>N</i> -glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ	11
ตารางที่ 2. ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด <i>N</i> -glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับลักษณะทางพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิก (n = 8)	13



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดีทั้งภายในและภายนอกตับแต่ไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดีและ Papilla of Vater (1) จากการศึกษาของ Parkin และหน่วยมะเร็งของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น พบว่าโรคมะเร็งท่อน้ำดีมีอุบัติการณ์สูงมากที่สุดในโลกที่จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย โดยเกิดในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง คือ 88.1 ต่อ 100,000 ในชาย และ 36.7 ต่อ 100,000 ในหญิง และเกิดในกลุ่มคนอายุ 45-65 ปี (2, 3) จากการศึกษา ณ ปัจจุบันพบว่าการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) และการรับประทานอาหารประเภทหมักดอง เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม และปลาเจ่า ซึ่งมีสารประกอบ N-nitroso compound และ Nitrosamine โดยข้อมูล ดังกล่าวได้รับการสนับสนุนโดยงานวิจัยทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง (4-7)

การวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มต้นทำได้ยาก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษาก็ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในระยะท้าย การรักษาด้วยการผ่าตัดและรังสีรักษามักไม่ได้ผล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการหาสารชี้วัดชีวภาพ (Biomarkers) และวิธีการตรวจคัดกรองโรคในระยะแรก (Early detection) เพื่อช่วยในการวินิจฉัยและการพยากรณ์การรักษาของโรคมะเร็งท่อน้ำดี

ณ ปัจจุบันพบว่าสารคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะสารไกลโคโปรตีนมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง (8) การศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบว่าคาร์โบไฮเดรตแอนติเจน S121 มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคและจำเพาะกับมะเร็งท่อน้ำดี (9) การศึกษาในสัตว์ทดลองพบการแสดงออกของแอนติเจน S121 ในเซลล์ของเนื้อเยื่อทางเดินน้ำดีในระยะแรกของการเป็นมะเร็งและมีการแสดงออกของแอนติเจนมากขึ้นเมื่อมีการเจริญของเนื้อเยื่อมะเร็ง (10) การศึกษาในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค Immunohistochemistry พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของสารคาร์โบไฮเดรต GlcNAc (11) และ เอนไซม์ O-GlcNAc transferase ที่ใช้ในกระบวนการ O-linked glycosylation (12) การศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค Sandwich ELISA พบคาร์โบไฮเดรต epitope CA-S27 มีความเกี่ยวข้องกับ การดำเนินโรคและอาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคได้ (13) มีการศึกษาโดยเทคนิค lectin microarray เพื่อ ตรวจหาสารไกลโคโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งอาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ (14) ล่าสุดมีการ ศึกษาโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า การแสดงออกของ

สารคาร์โบไฮเดรตมีความแตกต่างกันในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ (Histological types) ของมะเร็งท่อน้ำดี และสัมพันธ์กับการดำเนินโรค (15)

การศึกษารูปแบบของสารคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอาจนำไปสู่การค้นพบสารชีวตัวชีวภาพในการวินิจฉัยระยะแรกของมะเร็งท่อน้ำดีและอาจเป็นเป้าหมายตัวใหม่ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบของสารคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
2. เพื่อหารูปแบบของสารคาร์โบไฮเดรตที่มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งท่อน้ำดี

3. ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาทางชีวเคมีในระดับโมเลกุลดังนี้

1. ศึกษาโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยอาศัยเทคนิค Mass spectrometry และ HPLC
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของสารคาร์โบไฮเดรตที่พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแต่ละประเภทเปรียบเทียบกับประชากรปกติ

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การแสดงผลของโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตที่เปลี่ยนแปลงในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-glycans กับการดำเนินโรค สารคาร์โบไฮเดรต M6N2 และ NeuAc3H3N3M3N2F ซึ่งมีการแสดงออกที่มีนัยสำคัญทางสถิติอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารชีวตัวชีวภาพ (biomarkers) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการและผลงานการตีพิมพ์

- 1) การนำเสนอผลงานวิจัย:

นำเสนอในรูปแบบวาจา (Oral presentation) ในการประชุมวิชาการ Frontier in Cancer Research II: “Glycomics and Proteomics in Biomedicine: Basic to Advance Application” จัดขึ้นวันที่ 18-19 พฤษภาคม 2559 ณ อาคารเวชวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำเสนอในหัวข้อเรื่อง “Increased expression of NeuAc3H3N3M3N2F tri-antennary N-glycans in cholangiocarcinoma serum”

2) ผลงานการตีพิมพ์:

Talabnin K, Talabnin C, Ishihara M, Azadi P. Increased expression of the high-mannose M6N2 and NeuAc3H3N3M3N2F tri-antennary N-glycans in cholangiocarcinoma. *Oncol Lett.* 2018; 15: 1030-1036. (รายละเอียดในภาคผนวก)



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดี ซึ่งรวมถึงท่อน้ำดีในและภายนอกตับแต่ไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดีและ Papilla of Vater (1) มากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งชนิด adenocarcinoma ซึ่งแบ่งตามลักษณะของเนื้อเยื่อมะเร็งได้ 4 ชนิด ได้แก่ (1) adenocarcinoma (2) papillary adenocarcinoma (3) intestinal-type adenocarcinoma และ (4) mucinous adenocarcinoma (16) มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 2 ในกลุ่มของมะเร็งตับโดยคิดเป็นร้อยละ 30 ของกลุ่มมะเร็งตับจากทั่วโลกและมีอัตราการตายสูงเนื่องจากการตรวจวินิจฉัยพบในระยะท้ายของการเป็นโรคมะเร็ง (17, 18) อุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั้งในยุโรปและสหรัฐอเมริกา (19-21) โดยมีอุบัติการณ์ในสหรัฐอเมริกาโดยประมาณอยู่ที่ 2000-3000 รายต่อปี (22) ในยุโรปอุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งตับมีแนวโน้มลดลงแต่พบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีมีแนวโน้มสูงขึ้นร้อยละ 9 จากข้อมูลในปัจจุบันพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีสูงที่สุดในโลกคือพื้นที่ลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่างของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งมีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

สาเหตุของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบเรื้อรังและการอุดตันของท่อน้ำดีจากจากการเป็นโรค เช่น โรค Primary sclerosing cholangitis โรค hepatolithiasis การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* หรือ *Clonorchis sinensis* (23, 24) ในเอเชียการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย ลาว และมาเลเซีย ขณะที่การติดเชื้อ *C. sinensis* พบในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และเวียดนาม (25, 26) ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมีการรายงานกันอย่างแพร่หลายทั้งในเชิงระบาดวิทยาและในสัตว์ทดลอง ในปี ค.ศ. 1994 พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้ถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งชนิด type I carcinogen โดย International Agency for Research in Cancer (IARC) ซึ่งจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Helicobacter pylori* เชื้อแบคทีเรียก่อโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (27)

การรักษามะเร็งท่อน้ำดีประกอบด้วย การผ่าตัดตับ (liver resection) การปลูกถ่ายอวัยวะ (transplantation) และรังสีรักษา (Radio therapy) (28-30) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการพยากรณ์โรคของมะเร็งท่อน้ำดีถือว่าไม่ดี โดยมีอัตราการรอดชีวิต 5 ปีหลังการรักษา (5-year survival rates) น้อยกว่าร้อยละ 20 (31-34) การรักษาที่ได้ผลดีสามารถพบได้ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแบบ perihilar cholangiocarcinoma ด้วยการรักษาแบบ neo-adjuvant therapy ร่วมกับการผ่าตัดมีอัตราการรอดชีวิต 5 ปีหลังการรักษาร้อยละ 65 (35) การตรวจวินิจฉัยในระยะแรกของมะเร็งนำไปสู่การผ่าตัดที่ประสบความสำเร็จและเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย (31, 36, 37)

ในประเทศไทยมีการประมาณจำนวนผู้เสียชีวิตจากมะเร็งท่อน้ำดีเฉพาะในภาคอีสานมากกว่า 20,000 คนต่อปี (38) โดยอัตราการตายมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความยากของการตรวจวินิจฉัยในระยะ

เริ่มต้น ของมะเร็งซึ่งการรักษาโดยการผ่าตัดมีโอกาสรักษาประสบความสำเร็จ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งในระยะท้าย มะเร็งท่อน้ำดีมักพบในผู้ป่วยอายุมากกว่า 40 ปี และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ทำให้นอกจากผู้ป่วยจะได้รับผลกระทบจากการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ครอบครัวของผู้ป่วยก็ได้รับผลกระทบทั้งทางเศรษฐกิจและสังคม (39)

กระบวนการเติมสารคาร์โบไฮเดรต (Glycosylation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนโดยพบประมาณ 50% ของโปรตีนที่พบในคน (40, 41) กระบวนการเติมสารคาร์โบไฮเดรตให้โปรตีนแบ่งได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ (1) N-linked glycosylation (2) O-linked glycosylation (3) C-glycosylation (42) และ (4) S-linked glycosylation (พบเฉพาะในแบคทีเรีย) (43, 44)

N-linked glycosylation พบบนกรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asn) ในลำดับกรดอะมิโน Asn-X-Ser/Thr โดย X คือ กรดอะมิโนใดๆ ยกเว้น โพรลีน (Proline) กระบวนการ N-linked glycosylation เกิดขึ้นบริเวณ rough endoplasmic reticulum (RER) ที่มีการเติมโมเลกุลของน้ำตาล $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ให้สารตั้งต้น dolichol pyrophosphate ได้เป็นโครงสร้าง $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$ (45-47). N-Glycans สามารถแบ่งตามชนิดและการจัดเรียงตัวของน้ำตาลบนโครงสร้างหลักได้เป็น 3 ชนิด คือ (1) high-mannose type (2) antennary complex type และ (3) hybrid type (47)

O-linked glycosylation พบบนกรดอะมิโนเซอรีน (Ser) หรือ ทรีโอนีน (Thr) โดยการเติมน้ำตาลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) แมนโนส (mannose) ฟิวโคส (fucose) กลูโคส (glucose) กาแลคโตซามีน (N-acetylgalactosamine) หรือ xylose บนกรดอะมิโนเซอรีนหรือทรีโอนีน (Ser/Thr) (46, 47) โครงสร้างเริ่มต้นที่พบมากที่สุดคือการเติม N-acetylgalactosamine ด้วยพันธะ α -glycosidic linkages บน Ser/Thr เกิดขึ้นขณะที่โปรตีนถูกขนส่งผ่าน Golgi apparatus ในกระบวนการขนส่งสารโปรตีน โครงสร้าง O-glycans จะถูกต่อด้วยน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) หรือ กาแลคโตซามีน (N-acetylgalactosamine) กรดเซียลิก (sialic acid) และ/หรือ น้ำตาลฟิวโคส (fucose) mucin type O-glycosylation อาจเป็นสารชี้วัดชีวภาพของโรคมะเร็งที่สำคัญเนื่องจากมีความเกี่ยวข้องของ O-linked glycosylation ในกระบวนการเกาะติดของเซลล์ (cell adhesion) การลุกลามของเซลล์ (invasion) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) (48) C-glycosylation เกิดจากการเติมน้ำตาลแมนโนสให้กรดอะมิโนทริฟโตแพน (Trp) นอกจากนี้โครงสร้างของน้ำตาลทั้งหลายอาจมีการเติมหมู่ซัลเฟต (Sulfation) หรือฟอสเฟส (Phosphorylation) เพื่อการดัดแปลงโครงสร้างของโมเลกุล

การวิเคราะห์สารคาร์โบไฮเดรตในไกลโคโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry ทำได้โดยการแยกสารคาร์โบไฮเดรตออกจากโปรตีนด้วยเอนไซม์ เช่น PNGaseF (สำหรับ N-glycans) หรือใช้ปฏิกิริยาเคมี (สำหรับ O-glycans) (49) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer เพื่อให้กระบวนการแตกตัวเป็นไอออนของสารคาร์โบไฮเดรตมีประสิทธิภาพมากขึ้น สารคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการต่างๆ ได้แก่ permethylation (50, 51) หรือ methylation (52, 53) หรือ derivatization (54, 55) ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer สารคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้าง

แตกต่างกันก็จะให้ค่าสัดส่วน mass/charge (m/z) ที่แตกต่างกันสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาชนิดและองค์ประกอบของน้ำตาลในโมเลกุลของสารคาร์โบไฮเดรตที่ทำการศึกษาได้

การแสดงออกของกระบวนการเติมสารคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากจินที่ผิดปกติ ภาวะ มะเร็งและการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของโปรตีน ตำแหน่งของการเติมสารคาร์โบไฮเดรตบนโปรตีนและโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตสามารถถูกเปลี่ยนแปลงในระยะ เริ่มต้นหรือในขณะของการดำเนินโรค ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนแปลงของกรดเซียลิกและน้ำตาลแลกโตสใน โรคมะเร็ง (56) มีการศึกษาตัวชี้วัดชีวภาพทั้งในส่วนของโครงสร้างและการแสดงออกของไกลโคโปรตีนหรือ เฉพาะส่วนของคาร์โบไฮเดรตเพื่อช่วยในการวินิจฉัยและการรักษาอย่างแพร่หลายทั้งในพลาสมา (57, 58) ซีรัม (59, 60) เนื้อเยื่อ (61, 62) และสารคัดหลั่ง (63, 64) มีการรายงานความสัมพันธ์ของ N-linked glycoproteins ในมะเร็งต่อมลูกหมาก (65, 66) มะเร็งเต้านม (67, 68) และมะเร็งรังไข่ (69, 70) มีการศึกษา O-linked glycoproteins ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ (71) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (72) และมะเร็ง กระเพาะอาหาร (73) มีการศึกษา N- และ O-linked glycans เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดชีวภาพของโรคมะเร็งอย่าง แพร่หลาย (74-76)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

สารโซเดียมโบโรไฮไดด์ (NaBH_4) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ได้มาจากบริษัทซิกมา (Sigma-Aldrich) สารไกลโคโปรตีนและสารเคมีอื่นๆ ได้มาจากแหล่งจำหน่ายสารเคมีมาตรฐาน

2. วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและประชากรปกติ

ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 8 รายและซีรัมของประชากรปกติจำนวน 4 ราย ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เลขที่ HE521209

การเตรียมโปรตีนจากตัวอย่างซีรัม

เตรียมตามวิธีของ Talabnin *et al.* (77) โดยใช้ 20 μL ของตัวอย่างซีรัมในแต่ละรายถูกสกัดด้วยสารคลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 4:8:3 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชม. จากนั้นทำการปั่นสารสกัดเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที ตะกอนโปรตีนที่ได้จะถูกทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนและเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

การเตรียมสารไกลโคเปปไทด์และสารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-glycans

ตะกอนโปรตีนจากตัวอย่างซีรัมจำนวน 1 mg จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และไคมোটริปซิน (chymotrypsin) ที่อุณหภูมิ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ นาน 18 ชม. ในทรिซบัฟเฟอร์ (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2, containing 1 mM CaCl_2) สารไกลโคเปปไทด์ที่ถูกย่อยจะถูกนำไปผ่าน Sep-Pak C18 cartridge column ตามวิธีของ Aoki *et al.* (78) จากนั้นสารไกลโคเปปไทด์จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ PNGaseF จำนวน 2 μL (7.5 U/mL) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 μL of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5) ที่ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ นาน 18 ชม. สารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-glycans จะถูกแยกจากเปปไทด์และเอนไซม์โดยการสกัดผ่าน Sep-Pak C18 cartridge

การตรวจวิเคราะห์ด้วย Nanospray Ionization-Linear Ion Trap Mass Spectrometry

การตรวจวิเคราะห์ด้วย NSI-MSⁿ ตามวิธีของ Aoki *et al.* (78) สารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-glycans จากการเติมหมู่เมทิล (permethylation) ตามวิธีของ Anumula and Taylor (79) จะถูกละลายใน 1 mM NaOH ใน 50% เมทานอลและทำการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง linear ion trap mass spectrometer (LTQ; Thermo Scientific) โดยใช้ nanospray source โดยทำการตรวจวิเคราะห์ใน positive ion mode และตรวจ MS/MS spectra ที่ 28 % collision energy โดยใช้ total ion mapping (TIM) ซึ่งถูกควบคุมโดยโปรแกรม Xcalibur (software version 2.0) อนุพันธ์ของสารคาร์โบไฮเดรต (fragmentation) ที่ได้จาก MS/MS spectra จะถูกวิเคราะห์และเรียกชื่อตามวิธีของ Domon และ Costello (80).

หลักการวิเคราะห์โครงสร้างสารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-glycans

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-glycans ทำได้โดยอ้างอิงหลักการดังนี้ (1) วิเคราะห์จาก NSI-MS parent mass ion (2) วิเคราะห์จาก NSI-MS/MS fragmentation ion และ (3) วิเคราะห์เปรียบเทียบกับโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตมาตรฐานและข้อจำกัดของแอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารคาร์โบไฮเดรตในมนุษย์ ปริมาณการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดจะถูกรายงานในรูปของร้อยละ (% Total Profile) โดยเทียบจากค่า signal intensity ของสารคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ตรวจพบ

3. สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

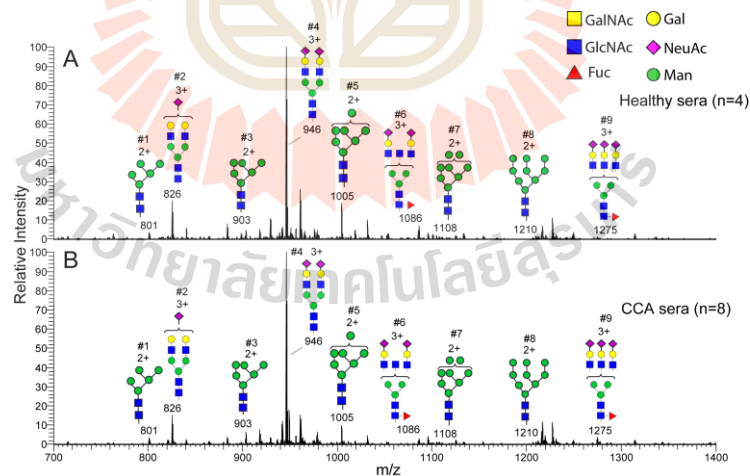
ปริมาณการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด (% Total profile) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมของประชากรปกติรายงานในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (means \pm SD) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยใช้ independent *t* test วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตกับพยาธิวิทยาและอาการแสดงทางคลินิกโดยใช้ X^2 test การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดทำโดยโปรแกรม SPSS (IBM SPSS 19) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

บทที่ 4

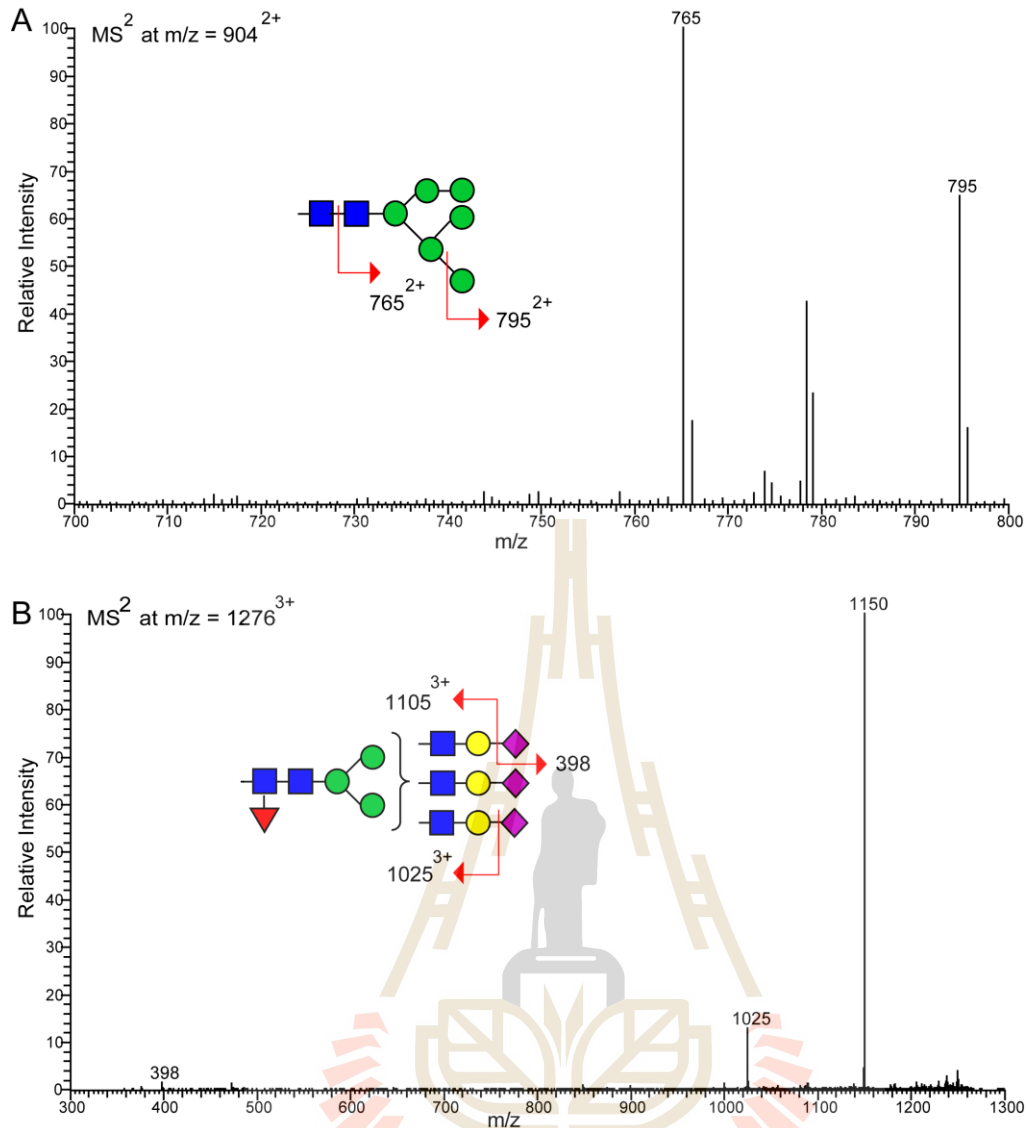
ผลการวิจัย

1. โครงสร้างสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมประชากรปกติ

รูปแบบสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติแสดงดังรูปที่ 1 สารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ประกอบไปด้วย 9 โครงสร้าง โดยแบ่งย่อยโครงสร้างเป็นแบบ high-mannose types ($M_{5-9}N_2$) จำนวน 5 โครงสร้าง ได้แก่ M_5N_2 , M_6N_2 , M_7N_2 , M_8N_2 และ M_9N_2 (Structure 1, 3, 5, 7 และ 8 ตามลำดับ) และโครงสร้างแบบ complex types จำนวน 4 โครงสร้าง ($NeuAc_{1-3}Hex_{2-3}HexNAc_{2-3} + M_3N_2F_{0-1}$) ได้แก่ $NeuAc_1H_2N_2M_3N_2$, $NeuAc_2H_2N_2M_3N_2$, $NeuAc_2H_2N_3M_3N_2F$ และ $NeuAc_3H_3N_3M_3N_2F$ (Structure 2, 4, 6 และ 9 ตามลำดับ) โดยโครงสร้างแบบ high-mannose types ที่ตรวจพบจะมีโครงสร้างตั้งแต่ M_5N_2 - M_9N_2 ส่วนโครงสร้างแบบ complex types พบโครงสร้างในรูปของ bi-antennary structures ($NeuAc_1H_2N_2M_3N_2$ และ $NeuAc_2H_2N_2M_3N_2$) และ tri-antennary structures ($NeuAc_2H_2N_3M_3N_2F$ และ $NeuAc_3H_3N_3M_3N_2F$) โดยมีน้ำตาลกาแล็กโทส (Gal) และกรดเซียลิก (NeuAc) เป็นน้ำตาลตัวสุดท้ายของโครงสร้าง ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ และรูปที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ห่อนุพันธ์โครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตแบบ high-mannose types และ complex types



รูปที่ 1. รูปแบบสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติโดย NSI-MS พบโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตแบบ high-mannose types จำนวน 5 โครงสร้าง และโครงสร้างแบบ complex types จำนวน 4 โครงสร้าง โดยตรวจพบโครงสร้างที่ระดับประจุ 2+ และ 3+ รูปกราฟิกของโครงสร้างและโมเลกุลของน้ำตาลแสดงตามระบบของ the Consortium for Functional Glycomics (<http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf>).



รูปที่ 2. การวิเคราะห์อนุพันธ์ (MS²) โครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตแบบ high-mannose types และ complex types จากซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จากรูปแสดงอนุพันธ์ของ parent ion ที่ m/z = 904²⁺ ของโครงสร้างแบบ high-mannose type (A) และ parent ion ที่ m/z = 1276³⁺ ของโครงสร้างแบบ complex type (B) อนุพันธ์ของ parent ion ที่ m/z = 904²⁺ (Structure 3) fragments ใน MS² ให้ m/z = 765²⁺ (loss of reducing end GlcNAc, Δm/z = 139²⁺), และ m/z = 795²⁺ (loss of terminal man, Δm/z = 109²⁺). อนุพันธ์ของ parent ion ที่ m/z = 1276³⁺ (Structure 9) fragments ใน MS² ให้ m/z = 1105³⁺ และ 1025³⁺ (loss of terminal NeuAc (1st) และ NeuAc (2nd), Δm/z = 125³⁺ ตามลำดับ) และ m/z = 398 (terminal NeuAc with Na⁺)

ตารางที่ 1. การแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ

Structures	Group [§]	n	Relative abundance (%)		<i>p</i> values
			Mean	± SD	
1 M5N2	N	4	2.45	± 0.24	0.247
	T	8	2.19	± 0.39	
2 NeuAc1H2N2M3N2	N	4	14.21	± 2.18	0.248
	T	8	12.58	± 2.17	
3 M6N2	N	4	3.13	± 0.56	*0.044
	T	8	3.91	± 0.55	
4 NeuAc2H2N2M3N2	N	4	61.17	± 2.55	0.162
	T	8	64.68	± 4.23	
5 M7N2	N	4	12.12	± 2.54	0.106
	T	8	9.27	± 2.66	
6 NeuAc2H2N3M3N2F	N	4	3.99	± 0.50	0.554
	T	8	3.53	± 1.45	
7 M8N2	N	4	0.89	± 0.36	0.168
	T	8	0.66	± 0.20	
8 M9N2	N	4	1.21	± 0.25	*0.030
	T	8	0.84	± 0.24	
9 NeuAc3H3N3M3N2F	N	4	0.80	± 0.30	*0.002
	T	8	2.36	± 0.68	

[§] N, Healthy sera; T, CCA sera

* *p* < 0.05, considered significant difference

2. การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และซีรัมของประชากรปกติ

ด้วยเทคนิค mass spectrometry สามารถวิเคราะห์โครงสร้างและศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติโดยพบว่าสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ที่มีโครงสร้างแบบ high-mannose type, M6N2 (structure 3, $p=0.044$) และโครงสร้างแบบ tri-antennary complex type, NeuAc3H3N3M3N2F (structure 9, $p=0.002$) มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมของประชากรปกติ ในทางตรงกันข้ามโครงสร้างสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans แบบ high-mannose type, M9N2 (structure 8, $p=0.044$) มีการแสดงออกที่ลดลง (ตารางที่ 1.)

3. ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับลักษณะทางพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิก

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตทั้ง 3 โครงสร้างที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับประชากรปกติโดย univariate analysis พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ M6N2 (structure 3) และ NeuAc3H3N3M3N2F (Structure 9) มีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีอายุน้อยกว่า 60 ปี ($p=0.028$ และ $p=0.005$ ตามลำดับ) และไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการแสดงออกของ M9N2 (Structure 8) กับอายุ เพศ ชนิดของเนื้อเยื่อมะเร็ง (histologic types) ระดับขั้นของมะเร็ง (tumor stages) และการแพร่กระจาย (vascular or lymphatic invasion) (ตารางที่ 2.)

ตารางที่ 2. ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่กับลักษณะทางพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิก (n = 8)

Variables	M6N2 expression			M9N2 expression			NeuAc3H3N3M3N2F expression		
	Low	High	<i>p</i> -value	Low	High	<i>p</i> -value	Low	High	<i>p</i> -value
Age (y)									
<60	1	3	0.028*	1	3	0.157	0	4	0.005*
≥60	4	0		3	1		4	0	
Sex									
Male	3	2	0.850	2	3	0.465	3	2	0.465
Female	2	1		2	1		1	2	
Histologic type									
Papillary	2	0	0.206	1	1	1.000	2	0	0.102
Nonpapillary	3	3		3	3		2	4	
Stage									
III	2	1	0.850	2	1	0.465	2	1	0.465
IV	3	2		2	3		2	3	
Lymphatic Invasion									
Present	3	1	0.465	2	2	1.000	2	2	1.000
Absent	2	2		2	2		2	2	
Vascular Invasion									
Present	2	0	0.206	2	0	0.102	2	0	0.102
Absent	3	3		2	4		2	4	

* $p < 0.05$, considered statistically significant

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การเพิ่มปริมาณการแสดงออกของสารไกลโคโพรตีนมีการรายงานในกลุ่มของโรคติดต่อ กลุ่มของโรคเรื้อรัง รวมถึงในกลุ่มของโรคมะเร็ง สารคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเป็นสารชีวตัวชีวภาพ (biomarkers) ของโรค การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับซีรัมของประชากรปกติโดยอาศัยเทคนิค mass spectrometry

จากผลการทดลองพบว่า ในจำนวนผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 8 รายและประชากรปกติ 4 ราย สารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycan ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ M6N2 (structure 3, $p=0.044$), M9N2 (structure 8, $p=0.030$) และ NeuAc3H3N3M3N2F (structure 9, $p=0.002$) โดย M6N2 และ NeuAc3H3N3M3N2F มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ส่วน M9N2 มีการแสดงออกลดลง การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโครงสร้างสารคาร์โบไฮเดรตแบบ high-mannose type สอดคล้องกับที่มีรายงานในโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม (breast cancer) (81, 82) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) (83) การเพิ่มขึ้นของ M6N2 แสดงถึงกลไกการเติมสารคาร์โบไฮเดรต (glycosylation) ที่ไม่สมบูรณ์ของ *N*-linked glycosylation และสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งท่อน้ำดี

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ core fucosylated tri-antennary *N*-glycans; NeuAc3H3N3M3N2F (Structure 9) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของสารคาร์โบไฮเดรตที่พบได้ในโรคมะเร็งและมีรายงานในมะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม (breast cancer) (81) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) (83) มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) (84) และ มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) (85) มีการรายงานความสัมพันธ์ของโครงสร้างแบบ core fucosylated กับการแพร่กระจาย (metastasis) ของมะเร็ง (86) และลักษณะโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตแบบ tri-antennary *N*-glycans ยังมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งและถูกใช้เป็นสารชีวตัวชีวภาพ (tumor biomarker) ในการติดตามโรคมะเร็ง (87) สารคาร์โบไฮเดรต NeuAc3H3N3M3N2F ที่พบการแสดงออกมากขึ้นในมะเร็งท่อน้ำดี บ่งบอกถึงความสัมพันธ์และการมีบทบาทกับการดำเนินโรค

สารคาร์โบไฮเดรต M9N2 ที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงกระบวนการ glycosylation ที่มีการตัดโครงสร้างแบบ high-mannose type ของ M9N2 และเพิ่มการสร้างโครงสร้างแบบ complex และ hybrid type มากขึ้นในมะเร็งท่อน้ำดี การลดลงของสารคาร์โบไฮเดรตแบบ high-mannose

type *N*-glycans มีรายงานในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) (88) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) (89) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของ high-mannose type *N*-glycans; M6N2 และ M9N2 ในมะเร็งท่อน้ำดีแสดงถึงความซับซ้อนของกระบวนการ *N*-linked glycosylation ของสารคาร์โบไฮเดรตกับการดำเนินโรค

จากข้อมูลโครงสร้างและปริมาณการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตในมะเร็งท่อน้ำดีสามารถอ้างถึงการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ *N*-linked glycosylation การเพิ่มขึ้นของโครงสร้างแบบ tri-antennary structures แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มเอนไซม์ glycosyltransferases ที่สำคัญ ได้แก่ GnT-III, GnT-IV และ GnT-V โดยเฉพาะ GnT-V ที่มีความสัมพันธ์กับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง (cancer metastasis) และ GnT-III ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการเจริญของมะเร็ง (cancer suppression) (87) การพบโครงสร้างสารคาร์โบไฮเดรตที่มี terminal sialic acid (NeuAc) จำนวนมากในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แสดงถึงการแสดงออกที่มากขึ้นของกลุ่มเอนไซม์ sialyl-transferase ได้แก่ ST3Gal และ ST6Gal ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทความสำคัญในการดำเนินโรคของมะเร็ง (90)

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycan ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิก โดยพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ M6N2 และ NeuAc3-H3N3M3N2F มีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีอายุต่ำกว่า 60 ปี ความสัมพันธ์ของอายุกับการเปลี่ยนแปลงของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycan มีการรายงานในคนเชื้อสายยุโรป (Belgians และ Italians) (91) และคนเชื้อสายจีน (Chinese) (92) โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่พบน้อยมากในกลุ่มคนที่อายุน้อยกว่า 40 ปี การเปลี่ยนแปลงของ *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอาจมีผลมาจากทั้งการเป็นมะเร็งและอายุของผู้ป่วย

กล่าวโดยสรุป การเปลี่ยนแปลงของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด *N*-glycans ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแสดงถึงการมีบทบาทของสารคาร์โบไฮเดรตในการเจริญและพัฒนาของมะเร็ง สารคาร์โบไฮเดรต M6N2 และ NeuAc3H3N3M3N2F ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี อาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารชีวตัวชีวภาพ (biomarkers) ของมะเร็งท่อน้ำดีได้



บรรณานุกรม

1. Vatanasapt V, Uttaravichien T, Mairiang EO, Pairojkul C, Chartbanchachai W and Haswellelkins M: Cholangiocarcinoma in North-East Thailand. *Lancet* 335: 116-117, 1990.
2. Vatanasapt V, Sriamporn S and Vatanasapt P: Cancer control in Thailand. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 32: S82-S91, 2002.
3. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L and Young J (eds): *Cancer Incidence in Five Continents*. Vol VII. IARC Sci Pub, Lyon, France, 1997.
4. Thamavit W, Bhamarapavati N, Sahaphong S, Vajrasthira S and Angsubhakorn S: Effects of Dimethylnitrosamine on Induction of Cholangiocarcinoma in Opisthorchis-Viverrini-Infected Syrian Golden-Hamsters. *Cancer Research* 38: 4634-4639, 1978.
5. Elkins DB, Mairiang E, Sithithaworn P, *et al*: Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with Opisthorchis viverrini infection in humans. *Am J Trop Med Hyg* 55: 295-301, 1996.
6. Sripa B, Sithithaworn P and Sirisinha S: Opisthorchis viverrini and opisthorchiasis: the 21st century review. *Acta Trop* 88: 169-170, 2003.
7. Thamavit W, Pairojkul C, Tiwawech D, Shirai T and Ito N: Strong promoting effect of Opisthorchis viverrini infection on dimethylnitrosamine-initiated hamster liver. *Cancer Lett* 78: 121-125, 1994.
8. Kim EH and Misek DE: Glycoproteomics-based identification of cancer biomarkers. *Int J Proteomics* 2011: 601937, 2011.
9. Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, *et al*: A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer* 117: 3393-3403, 2011.
10. Sawanyawisuth K, Silsirivanit A, Kunlabut K, Tantapotin N, Vaeteewoottacharn K and Wongkham S: A novel carbohydrate antigen expression during development of Opisthorchis viverrini-associated cholangiocarcinoma in golden hamster: a potential marker for early diagnosis. *Parasitol Int* 61: 151-154, 2012.
11. Indramanee S, Silsirivanit A, Pairojkul C, Wongkham C and Wongkham S: Aberrant glycosylation in cholangiocarcinoma demonstrated by lectin-histochemistry. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 Suppl: 119-124, 2012.
12. Phoomak C, Silsirivanit A, Wongkham C, Sripa B, Puapairoj A and Wongkham S: Overexpression of O-GlcNAc-transferase associates with aggressiveness of mass-forming cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 Suppl: 101-105, 2012.
13. Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, *et al*: CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 104: 1278-1284, 2013.
14. Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, *et al*: Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. *Anal Chem* 87: 7274-7281, 2015.
15. Talabnin K, Talabnin C, Ishihara M, Azadi P, Wongkham S and Sripa B: Differential Expression of O-glycoprotein Glycans in Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 17: 691-695, 2016.
16. Sirica AE: Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 41: 5-15, 2005.
17. Yao D, Kunam VK and Li X: A review of the clinical diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *J Int Med Res* 42: 3-16, 2014.
18. Zeng X and Tao H: Diagnostic and prognostic serum marker of cholangiocarcinoma (Review). *Oncol Lett* 9: 3-8, 2015.

19. Khan SA, Emadossadaty S, Ladeb NG, *et al*: Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? *J Hepatol* 56: 848-854, 2012.
20. Bertuccio P, Bosetti C, Levi F, Decarli A, Negri E and La Vecchia C: A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe. *Ann Oncol* 24: 1667-1674, 2013.
21. Ghouri YA, Mian I and Blehacz B: Cancer review: Cholangiocarcinoma. *J Carcinog* 14: 1, 2015.
22. Yalcin S: Diagnosis and management of cholangiocarcinomas: a comprehensive review. *Hepatogastroenterology* 51: 43-50, 2004.
23. Sirica AE, Lai GH, Endo K, Zhang Z and Yoon BI: Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 22: 303-313, 2002.
24. Gores GJ: Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 37: 961-969, 2003.
25. Kullavanijaya P, Tangkijvanich P and Poovorawan Y: Current status of infection-related gastrointestinal and hepatobiliary diseases in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30: 96-105, 1999.
26. Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR, Mairiang P, *et al*: Parasite-associated morbidity: liver fluke infection and bile duct cancer in northeast Thailand. *Int J Parasitol* 24: 833-843, 1994.
27. IARC: IARC Monographs on the evaluation of carcinogen risks to human. International Agency for Research on Cancer 61: 1994.
28. Lubezky N, Facciuto M, Harimoto N, Schwartz ME and Florman SS: Surgical treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma in the USA. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 22: 124-130, 2015.
29. Khan SA, Davidson BR, Goldin R, *et al*: Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 51 Suppl 6: VI1-9, 2002.
30. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, *et al*: Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 61: 1657-1669, 2012.
31. Yusoff AR, Razak MM, Yoong BK, Vijeyasingam R and Siti ZM: Survival analysis of cholangiocarcinoma: a 10-year experience in Malaysia. *World J Gastroenterol* 18: 458-465, 2012.
32. Pattanathien P, Khuntikeo N, Promthet S and Kamsa-Ard S: Survival rate of extrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgical treatment in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 321-324, 2013.
33. Thunyaharn N, Promthet S, Wiangnon S, Suwanrungruang K and Kamsa-ard S: Survival of cholangiocarcinoma patients in northeastern Thailand after supportive treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 7029-7032, 2013.
34. Sriputtha S, Khuntikeo N, Promthet S and Kamsa-Ard S: Survival rate of intrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgical treatment in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 1107-1110, 2013.
35. Darwish Murad S, Kim WR, Harnois DM, *et al*: Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers. *Gastroenterology* 143: 88-98 e83; quiz e14, 2012.
36. Silsirivanit A, Sawanyawisuth K, Riggins GJ and Wongkham C: Cancer biomarker discovery for cholangiocarcinoma: the high-throughput approaches. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21: 388-396, 2014.
37. Tsuchikawa T, Hirano S, Okamura K, *et al*: Advances in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 369-374, 2015.

38. Bundhamcharoen K, Odton P, Phulkerd S and Tangcharoensathien V: Burden of disease in Thailand: changes in health gap between 1999 and 2004. *BMC Public Health* 11: 53, 2011.
39. Khuntikeo N, Chamadol N, Yongvanit P, *et al*: Cohort profile: cholangiocarcinoma screening and care program (CASCAP). *BMC Cancer* 15: 459, 2015.
40. Apweiler R, Hermjakob H and Sharon N: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et biophysica acta* 1473: 4-8, 1999.
41. Wong CH: Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J Org Chem* 70: 4219-4225, 2005.
42. Wei X and Li L: Comparative glycoproteomics: approaches and applications. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8: 104-113, 2009.
43. Floyd N, Vijayakrishnan B, Koeppe JR and Davis BG: Thiyl glycosylation of olefinic proteins: S-linked glycoconjugate synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 7798-7802, 2009.
44. Lote CJ and Weiss JB: Identification in urine of a low-molecular-weight highly polar glycopeptide containing cysteinyl-galactose. *The Biochemical journal* 123: 25P, 1971.
45. Morelle W, Canis K, Chirat F, Faid V and Michalski JC: The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics* 6: 3993-4015, 2006.
46. Ohtsubo K and Marth JD: Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-867, 2006.
47. Rakus JF and Mahal LK: New technologies for glycomics analysis: toward a systematic understanding of the glycome. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 4: 367-392, 2011.
48. Hollingsworth MA and Swanson BJ: Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4: 45-60, 2004.
49. Carlson DM: Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *The Journal of biological chemistry* 243: 616-626, 1968.
50. Costello CE, Contado-Miller JM and Cipollo JF: A glycomics platform for the analysis of permethylated oligosaccharide alditols. *J Am Soc Mass Spectrom* 18: 1799-1812, 2007.
51. Atwood JA, 3rd, Cheng L, Alvarez-Manilla G, Warren NL, York WS and Orlando R: Quantitation by isobaric labeling: applications to glycomics. *J Proteome Res* 7: 367-374, 2008.
52. Ciucanu I and Kerek F: A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131: 209-217, 1984.
53. Schabussova I, Amer H, van Die I, Kosma P and Maizels RM: O-methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. *International journal for parasitology* 37: 97-109, 2007.
54. Nakano M, Higo D, Arai E, *et al*: Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive N-glycan analysis of glycoproteins as 9-fluorenylmethyl derivatives. *Glycobiology* 19: 135-143, 2009.
55. Walker SH, Lilley LM, Enamorado MF, Comins DL and Muddiman DC: Hydrophobic derivatization of N-linked glycans for increased ion abundance in electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 22: 1309-1317, 2011.
56. DairOlio F: Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *Journal of Clinical Pathology: Clinical Molecular Pathology* 49: M126-M135, 1996.
57. Rehman J and Rahman MA: Studies on glycosylated plasma proteins in diabetic patients. *J Pak Med Assoc* 41: 16-18, 1991.

58. Zhou Y, Aebersold R and Zhang H: Isolation of N-linked glycopeptides from plasma. *Anal Chem* 79: 5826-5837, 2007.
59. Klein A, Carre Y, Louvet A, Michalski JC and Morelle W: Immunoglobulins are the major glycoproteins involved in the modifications of total serum N-glycome in cirrhotic patients. *Proteomics Clin Appl* 4: 379-393, 2010.
60. Saldova R, Wormald MR, Dwek RA and Rudd PM: Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. *Dis Markers* 25: 219-232, 2008.
61. Chen R, Jiang X, Sun D, *et al*: Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res* 8: 651-661, 2009.
62. Parekh RB, Tse AG, Dwek RA, Williams AF and Rademacher TW: Tissue-specific N-glycosylation, site-specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition of rat Thy-1. *Embo J* 6: 1233-1244, 1987.
63. Pan S, Wang Y, Quinn JF, *et al*: Identification of glycoproteins in human cerebrospinal fluid with a complementary proteomic approach. *J Proteome Res* 5: 2769-2779, 2006.
64. Vakhrushev SY, Mormann M and Peter-Katalinic J: Identification of glycoconjugates in the urine of a patient with congenital disorder of glycosylation by high-resolution mass spectrometry. *Proteomics* 6: 983-992, 2006.
65. Reiter RE, Gu Z, Watabe T, *et al*: Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1735-1740, 1998.
66. Saldova R, Fan Y, Fitzpatrick JM, Watson RW and Rudd PM: Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiology* 21: 195-205, 2011.
67. Orazine CI, Hincapie M, Hancock WS, Hattersley M and Hanke JH: A proteomic analysis of the plasma glycoproteins of a MCF-7 mouse xenograft: a model system for the detection of tumor markers. *J Proteome Res* 7: 1542-1554, 2008.
68. Haakensen VD, Steinfeld I, Saldova R, *et al*: Serum N-glycan analysis in breast cancer patients--Relation to tumour biology and clinical outcome. *Mol Oncol* 10: 59-72, 2016.
69. Machado E, Kandzia S, Carilho R, Altevogt P, Conradt HS and Costa J: N-Glycosylation of total cellular glycoproteins from the human ovarian carcinoma SKOV3 cell line and of recombinantly expressed human erythropoietin. *Glycobiology* 21: 376-386, 2011.
70. Alley WR, Jr., Vasseur JA, Goetz JA, *et al*: N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *J Proteome Res* 11: 2282-2300, 2012.
71. Brockhausen I, Yang J, Lehotay M, Ogata S and Itzkowitz S: Pathways of mucin O-glycosylation in normal and malignant rat colonic epithelial cells reveal a mechanism for cancer-associated Sialyl-Tn antigen expression. *Biol Chem* 382: 219-232, 2001.
72. Premaratne P, Welen K, Damber JE, Hansson GC and Backstrom M: O-glycosylation of MUC1 mucin in prostate cancer and the effects of its expression on tumor growth in a prostate cancer xenograft model. *Tumour Biol* 32: 203-213, 2011.
73. Gomes C, Almeida A, Ferreira JA, *et al*: Glycoproteomic analysis of serum from patients with gastric precancerous lesions. *J Proteome Res* 12: 1454-1466, 2013.
74. An HJ, Franz AH and Lebrilla CB: Improved capillary electrophoretic separation and mass spectrometric detection of oligosaccharides. *J Chromatogr A* 1004: 121-129, 2003.
75. Misek DE, Patwa TH, Lubman DM and Simeone DM: Early detection and biomarkers in pancreatic cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 5: 1034-1041, 2007.

76. Pinho SS and Reis CA: Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15: 540-555, 2015.
77. Talabnin K, Aoki K, Saichua P, *et al*: Stage-specific expression and antigenicity of glycoprotein glycans isolated from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol* 43: 37-50, 2013.
78. Aoki K, Perlman M, Lim JM, Cantu R, Wells L and Tiemeyer M: Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *The Journal of biological chemistry* 282: 9127-9142, 2007.
79. Anumula KR and Taylor PB: A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem* 203: 101-108, 1992.
80. Domon B and Costello CE: Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 27: 1534-1543, 1988.
81. Liu X, Nie H, Zhang Y, *et al*: Cell surface-specific N-glycan profiling in breast cancer. *PLoS One* 8: e72704, 2013.
82. de Leoz ML, Young LJ, An HJ, *et al*: High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Mol Cell Proteomics* 10: M110 002717, 2011.
83. Sethi MK, Thaysen-Andersen M, Smith JT, *et al*: Comparative N-glycan profiling of colorectal cancer cell lines reveals unique bisecting GlcNAc and alpha-2,3-linked sialic acid determinants are associated with membrane proteins of the more metastatic/aggressive cell lines. *J Proteome Res* 13: 277-288, 2014.
84. Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, *et al*: Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J Proteome Res* 7: 2222-2233, 2008.
85. Schwedler C, Kaup M, Weiz S, *et al*: Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery. *Anal Bioanal Chem* 406: 7185-7193, 2014.
86. Dennis JW, Laferte S, Waghorne C, Breitman ML and Kerbel RS: Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236: 582-585, 1987.
87. Taniguchi N and Kizuka Y: Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res* 126: 11-51, 2015.
88. Kronewitter SR, De Leoz ML, Strum JS, *et al*: The glycolyzer: automated glycan annotation software for high performance mass spectrometry and its application to ovarian cancer glycan biomarker discovery. *Proteomics* 12: 2523-2538, 2012.
89. Ozcan S, Barkauskas DA, Renee Ruhaak L, *et al*: Serum glycan signatures of gastric cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 7: 226-235, 2014.
90. Dall'Olio F, Malagolini N, Trinchera M and Chiricolo M: Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1840: 2752-2764, 2014.
91. Vanhooren V, Laroy W, Libert C and Chen C: N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology* 9: 351-356, 2008.
92. Ding N, Nie H, Sun X, *et al*: Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing* 40: 568-575, 2011.



ภาคผนวก
ผลงานการตีพิมพ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Increased expression of the high-mannose *M6N2* and *NeuAc3H3N3M3N2F* tri-antennary *N*-glycans in cholangiocarcinoma

KRAJANG TALABNIN^{1,2}, CHUTIMA TALABNIN^{2,3}, MAYUMI ISHIHARA⁴ and PARASTOO AZADI⁴

¹School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000;

²Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002;

³School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand; ⁴Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

Received October 17, 2016; Accepted October 3, 2017

DOI: 10.3892/ol.2017.7384

Abstract. Changes in protein glycosylation have been reported in various types of cancer, including cholangiocarcinoma (CCA). Nanospray ionization-linear ion trap mass spectrometry (NSI-MSⁿ) was used in the present study to determine the comparative structural glycomics of the *N*-linked glycans in the serum of patients with CCA compared with healthy controls. A total of 5 high-mannose and 4 complex *N*-linked glycans were detected. Mannose₇-*N*-acetyl-glucosamine₂ was the most abundant structure among the high-mannose types (control 12.12±2.54 vs. CCA 9.27±2.66%), whereas NeuAc2H2N2M3N2 predominated the complex types (control 61.17±2.55 vs. CCA 64.68±4.23%). The expression of 3 different *N*-glycans differed significantly between the CCA cases and controls. These included mannose₆-*N*-acetyl-glucosamine₂ (P=0.044), mannose₉-*N*-acetyl-glucosamine₂ (P=0.030) and NeuAc3H3N3M3N2F (P=0.002). These three glycan structures may therefore be associated with tumor progression in CCA and may be useful for its diagnosis.

Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA), a cancer of the bile duct, is a major health problem in Northeastern Thailand and Southeast Asia. It is associated with infestation by the liver fluke *Opisthorchis viverrini* (1). The incidence of CCA is high in East and Southeast Asia and its incidence is also increasing in England, the USA and Australia (2,3). Diagnoses of CCA are usually made when the disease is advanced or disseminated,

meaning that the prognosis of patients is poor; therefore, novel target biomarkers are required to enable early diagnosis of CCA, as well as increase the therapeutic efficacy of treatments for CCA.

Protein glycosylation is the most common post-translational modification that occurs in human proteins (4,5). It is important in cell and tissue development, host-pathogen interactions, inflammation and malignancy (6). Alterations in protein glycosylation have been reported in various diseases, including different types of cancer (7). Identifying altered cancer-associated glycoproteins may facilitate the development of potential biomarkers of cancer or novel targets for treatment.

A number of *in vitro* and *in vivo* molecular studies investigating glycoproteins in CCA have been performed. It has been demonstrated that the expression of sialyl-Lewis^A in the tissues of patients with CCA is associated with poor prognosis (8). Furthermore, a study using monoclonal antibodies against serum glycoprotein mucin 5AC revealed that levels of serum glycan epitope (S121) are associated with patient prognosis and is specific to CCA (9). This association was investigated further in an animal model. It was demonstrated that the glycan epitope (S121) was expressed in the cytoplasm and apical surface of biliary cells during the early stages of tumor development, and that this expression increased further with tumor progression (10). Immunohistochemical studies have revealed that *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) (11) and *O*-GlcNAc transferase are overexpressed in CCA (12). Furthermore, the results of ELISA performed on the serum of patients with CCA revealed that the association between glycan epitope CA-S27 and patient prognosis is specific to CCA and may have immunodiagnostic value (13).

It has been demonstrated that the lectin microarray-based sero-biomarker is able to detect *O*-linked glycosylation in CCA (14). Furthermore, using different CCA cell lines, it has been revealed that different histological types of CCA exhibit differential expression levels of *O*-glycans (15). In-depth characterization of the glycans expressed in the serum of patients with CCA may facilitate the identification of potential CCA biomarkers.

Correspondence to: Dr Krajang Talabnin, School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Muang, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
E-mail: krajang.t@sut.ac.th

Key words: cholangiocarcinoma, high-mannose *N*-glycans, Tri-antennary *N*-glycans

The present study assessed the structural glycomics of *N*-glycans in the serum of patients with CCA compared with healthy controls. Three candidate glycan markers were proposed and it was hypothesized that these specific glycans may aid in the development of diagnostic and/or therapeutic markers of CCA.

Patients and methods

Reagents. Sodium borohydride and sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich; Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Fetuin glycoprotein standard was obtained from Sigma-Aldrich; Merck KGaA. D-galactose, D-mannose and N-acetyl-D-glucosamine were obtained from EMD Millipore (Billerica, MA, USA).

Patients with CCA and healthy controls. A total of 8 serum samples from patients with CCA (mean age, 60.25±9.59; 3 females and 5 males) and 4 samples from healthy controls (mean age, 41.75±16.88; 3 females and 1 male) were obtained from participants recruited between January 2014 and May 2014 in the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University (Khon Kaen, Thailand). Patients were enrolled in the study if they had been diagnosed with intrahepatic CCA and had no apparent chronic inflammatory diseases, including diabetes mellitus or rheumatoid arthritis. The Ethics Committee of Khon Kaen University reviewed and approved the study protocol (registration number HE521209) and patients provided informed consent for the use of their material in the present study. Through peripheral venipuncture, a single blood sample was drawn into a 10 ml BD Vacutainer sterile vacuum tube (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in the absence of anticoagulant. Blood was immediately centrifuged at 1,000 x g for 10 min at room temperature. The serum supernatant was collected and centrifuged at 2,500 x g for 10 min at room temperature. Following liquidation, serum was maintained at -80°C until use.

Preparation of protein powder from the serum of patients with CCA and healthy controls. Preparation of protein powder from the serum of patients with CCA and healthy controls was performed following a previously described protocol (16). Briefly, 50 µl serum obtained from patients with CCA and healthy controls were dissolved on ice in cold 50% methanol. The serum mixture was then extracted in a 4:8:3 ratio of chloroform to methanol to water for 2 h at room temperature. Extracts were centrifuged at 2,500 x g for 15 min at room temperature. The resulting pellets were then dried under nitrogen and stored at -20°C until further use.

Preparation of glycopeptides and release of *N*-glycans. The preparation of glycopeptides and release of *N*-glycans was performed as previously described (16). Briefly, 1 mg protein powder from the serum of patients with CCA and healthy controls was digested with trypsin and chymotrypsin for 18 h at 37°C in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) containing 1 mM CaCl₂. Digestion products were enriched and freed of contaminants using a 1 ml Sep-Pak C18 cartridge column (Waters Corporation, Milford, MA, USA), as described by Aoki *et al.* (17). Glycopeptides were then digested with 2 µl

peptide *N*-glycosidase F (7.5 U/ml, New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA) in 50 µl 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) for 18 h at 37°C. Released glycans were separated from peptides and enzymes by passing through a 1 ml Sep-Pak C18 cartridge high-performance liquid chromatography column.

Permethylation of glycans. Released glycan mixtures were permethylated as described by Anumula and Taylor (18). Briefly, released glycan mixtures were permethylated under water-free conditions using 500 µl DMSO, 10 µg NaOH and 200 µl methyl iodide (all Sigma-Aldrich; Merck KGaA) for 30 min at room temperature. Permethylated glycans were then extracted with dichloromethane and dried under a stream of nitrogen.

Nanospray ionization-linear ion trap mass spectrometry (NSI-MSⁿ). NSI-MSⁿ was performed as described by Aoki *et al.* (17). Briefly, permethylated glycans were dissolved in 1 mM NaOH in 50% methanol and infused directly into a linear ion trap mass spectrometer (LTQ Orbitrap Discovery; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using a Thermo Fisher Scientific™ nanospray ion source (Thermo Fisher Scientific, Inc.). MS analysis was performed in a positive ion mode and MS/MS spectra (at 28% collision energy) were obtained using the total ion mapping function of the Xcalibur software (version 2; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The fragmentation derived from the MS/MS spectra was identified using the nomenclature described by Domon and Costello (19).

Glycomic analysis of *N*-glycans in the serum of patients with CCA and healthy controls. The expression of glycans from the serum of patients with CCA and healthy controls were qualitatively and quantitatively compared. The glycans from these sera were enzymatically released, purified and analyzed in their permethylated forms using positive ion NSI-MS/MS. Identification of the glycan structures was based on the i) NSI-MS parent mass ion; ii) NSI-MS/MS fragmentation ion; and iii) similarity to known glycan structures and known biosynthetic limitations. The prevalence of each individual glycan (percentage total profile) in each profile was quantified by comparing its signal intensity to the sum of the signal intensities for all identified glycans.

Statistical analysis. The respective prevalence of glycans (percentage total profile) in the sera of patients with CCA vs. healthy controls was reported as the mean ± standard deviation. The difference in the expression between groups was analyzed using the independent t-test. Cross-tabulations were analyzed using the χ^2 test to determine the association between *N*-glycan expression and the clinicopathological features of CCA. All analyses were performed using SPSS statistical software (version 19.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Structural characterization of *N*-glycans in the serum from patients with CCA and healthy controls. The *N*-glycan

Table I. Characteristics and prevalence of *N*-linked glycans in the serum of patients with CCA compared with healthy controls.

Structure	Group	Number	Relative abundance, %	P-value
M5N2	N	4	2.45±0.24	0.247
	T	8	2.19±0.39	
NeuAc1H2N2M3N2	N	4	14.21±2.18	0.248
	T	8	12.58±2.17	
M6N2	N	4	3.13±0.56	0.044 ^a
	T	8	3.91±0.55	
NeuAc2H2N2M3N2	N	4	61.17±2.55	0.162
	T	8	64.68±4.23	
M7N2	N	4	12.12±2.54	0.106
	T	8	9.27±2.66	
NeuAc2H2N3M3N2F	N	4	3.99±0.50	0.554
	T	8	3.53±1.45	
M8N2	N	4	0.89±0.36	0.168
	T	8	0.66±0.20	
M9N2	N	4	1.21±0.25	0.030 ^a
	T	8	0.84±0.24	
NeuAc3H3N3M3N2F	N	4	0.80±0.30	0.002 ^a
	T	8	2.36±0.68	

The prevalence of each indicated glycan is expressed as a percentage of the total pool of detected glycans (% total profile, mean ± standard deviation). ^aP<0.05 vs. N. N, healthy sera; T, CCA sera; CCA, cholangiocarcinoma.

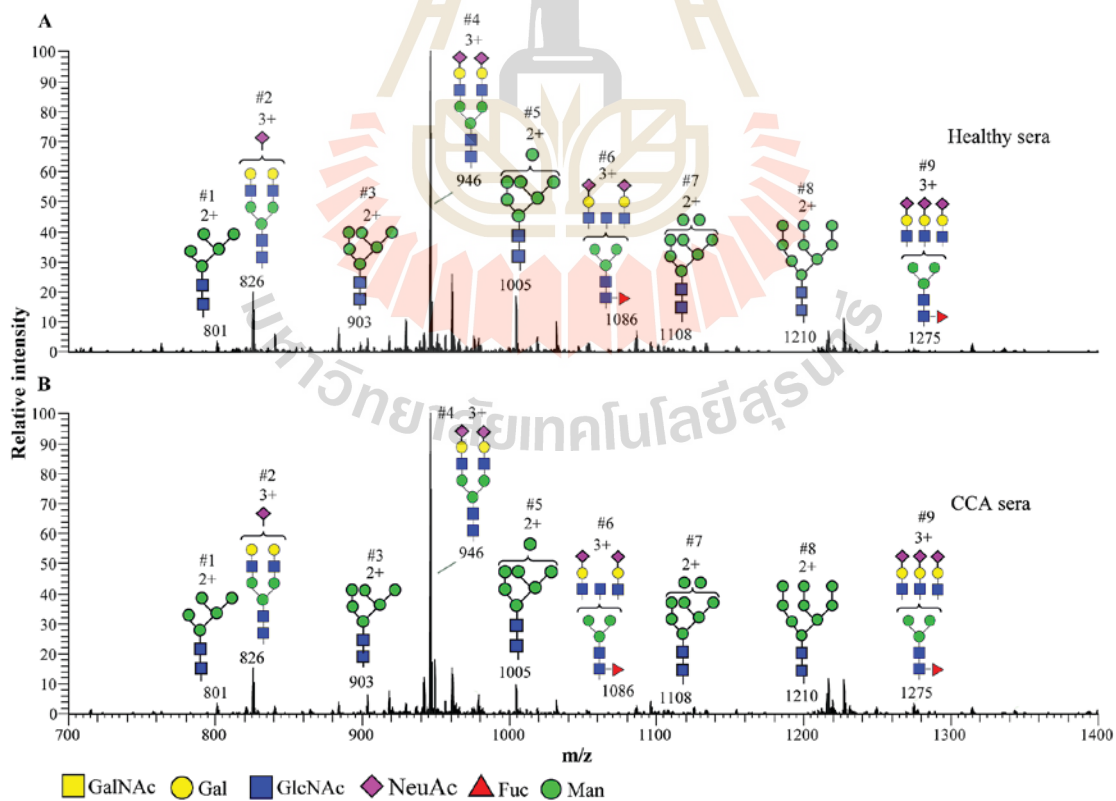


Figure 1. MS spectra of permethylated *N*-linked glycans in the serum of patients with CCA compared with healthy controls, as detected using NSI-MS. Glycans released from the serum of patients with CCA and healthy controls were permethylated and analyzed. MS spectra present the predominance of the complex type and high-mannose type oligosaccharides in (A) healthy sera vs. (B) CCA sera. The glycan profiles (A vs. B) demonstrate similar glycan patterns, but they differ in their relative quantities. Glycans were detected as doubly [2+] and triply charged species [3+]. The graphical representation of monosaccharide residues are defined in the figure and are consistent with the suggested nomenclature of the Consortium for Functional Glycomics (<http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf>). MS, mass spectrometry; CCA, cholangiocarcinoma; NSI-MS, nanospray ionization-linear ion trap mass spectrometry; *m/z*, mass/charge ratio; Glc, N-acetylglucosamine.

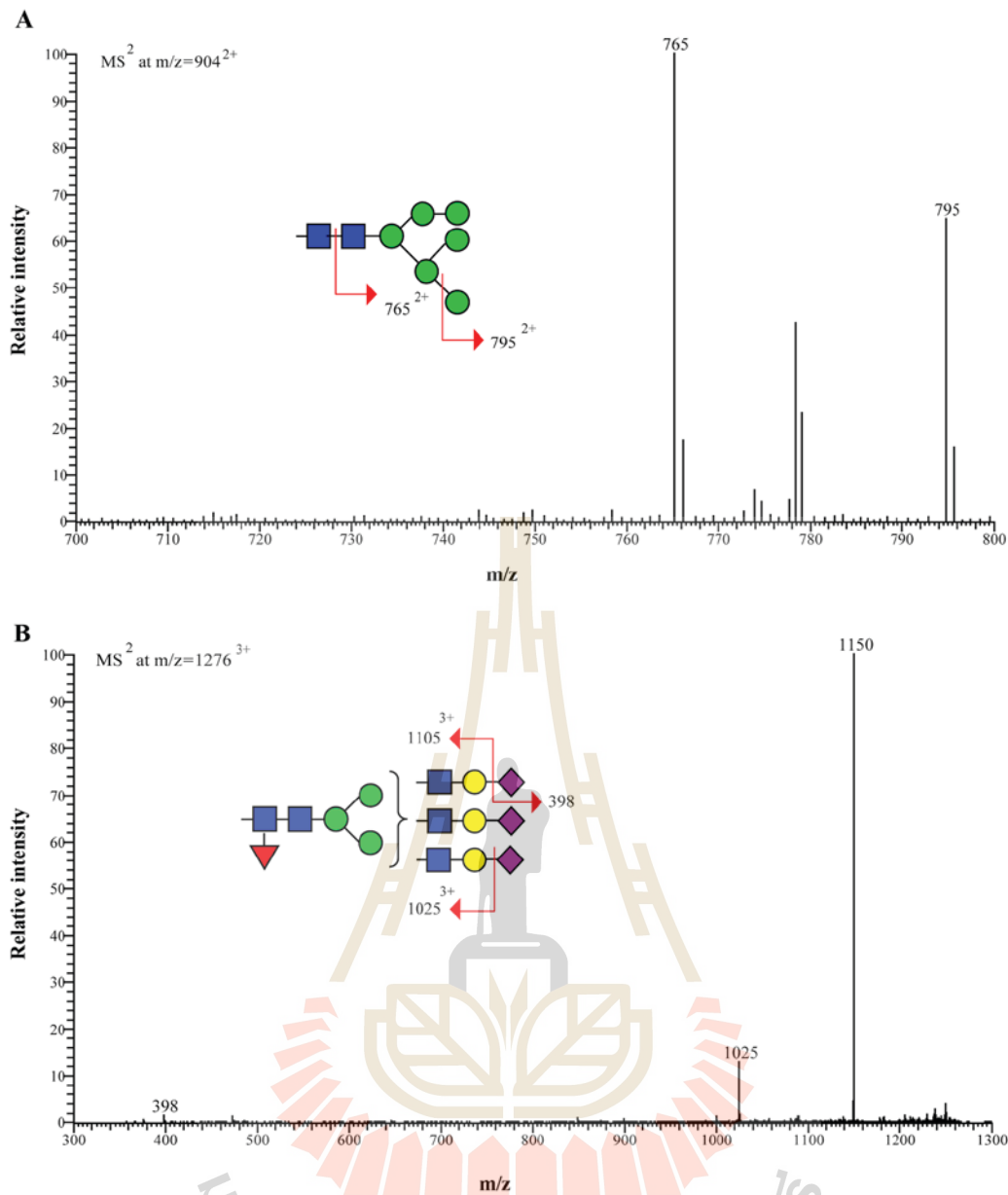


Figure 2. Representative MS/MS spectra of permethylated *N*-linked glycans from the sera of patients with cholangiocarcinoma. Fragmentation of (A) parent ion at $m/z=904^{2+}$ of high-mannose type structure and (B) parent ion at $m/z=1276^{3+}$ of complex type structure are depicted. The parent ion at $m/z=904^{2+}$ (structure 3) fragments in MS² to give $m/z=765^{2+}$ (loss of reducing end GlcNAc; $\Delta m/z=139^{2+}$) and $m/z=795^{2+}$ (loss of terminal man; $\Delta m/z=109^{2+}$). The parent ion at $m/z=1276^{3+}$ (structure 9) fragments in MS² to give $m/z=1105^{3+}$ and 1025^{3+} [loss of terminal NeuAc (first) and NeuAc (second) respectively; $\Delta m/z=125^{3+}$] and $m/z=398$ (terminal NeuAc with Na⁺). MS, mass spectrometry; m/z , mass/charge ratio; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid.

profiles in the serum of patients with CCA and healthy controls are presented in Fig. 1. *N*-glycans were assigned as high-mannose (M_{5,9}N₂; Structures 1, 3, 5, 7 and 8) or complex types (NeuAc₁₋₃Hex₂₋₃HexNAc₂₋₃ + M3N2F₀₋₁; Structures 2, 4, 6 and 9). High-mannose *N*-glycans were detected from M5N2-M9N2. Complex *N*-glycans were detected as bi- and tri-antennary structures with the terminal galactose and sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid; NeuAc). A summary of *N*-glycan structures in the sera of patients with CCA and healthy controls, and their relative abundance is presented in Table I. The representative fragmentation of the high-mannose type and complex type *N*-glycans are presented in Fig. 2.

Altered expression of N-glycan structures in serum from patients with CCA compared with healthy controls. *N*-glycans in the serum of patients with CCA and healthy controls were qualitatively and quantitatively assessed using positive ion NSI-MS/MS (Table I). The detected *N*-glycans were high-mannose- and complex types (bi- and tri-antennary structures) with the terminal galactose and sialic acid (NeuAc). The expression of the high-mannose type *N*-glycan, M6N2 (structure 3) and the complex tri-antennary *N*-glycan containing a core fucose and terminal tri-sialic acid, NeuAc3H3N3M3N2F (structure 9), were significantly increased in the serum of patients with CCA compared with healthy controls ($P=0.044$ and $P=0.002$, respectively). By contrast, the expression of the

Table II. Association between *N*-linked glycan expression and the clinicopathological features of patients with CCA.

Variable	M6N2 expression			M9N2 expression			NeuAc3H3N3M3N2F expression		
	Low	High	P-value	Low	High	P-value	Low	High	P-value
Age, years									
<60	1	3	0.028 ^a	1	3	0.157	0	4	0.005 ^a
≥60	4	0		3	1		4	0	
Sex									
Male	3	2	0.850	2	3	0.465	3	2	0.465
Female	2	1		2	1		1	2	
Histological type									
Papillary	2	0	0.206	1	1	1.000	2	0	0.102
Non-papillary	3	3		3	3		2	4	
Stage									
III	2	1	0.850	2	1	0.465	2	1	0.465
IV	3	2		2	3		2	3	
Lymphatic Invasion									
Present	3	1	0.465	2	2	1.000	2	2	1.000
Absent	2	2		2	2		2	2	
Vascular Invasion									
Present	2	0	0.206	2	0	0.102	2	0	0.102
Absent	3	3		2	4		2	4	

n=8; ^aP<0.05 vs. low expression. CCA, cholangiocarcinoma.

high-mannose *N*-glycan M9N2 (structure 8) was significantly decreased in patients with CCA compared with healthy controls (P=0.030).

Serum N-glycan expression and clinicopathological features of CCA. The association between the expression of the three differentially expressed *N*-glycans in the serum of patients with CCA and clinicopathological features of CCA were quantitatively analyzed. High expression of M6N2 (structure 3) and NeuAc3H3N3M3N2F (structure 9) were associated with an age <60 years (P=0.028 and P=0.005, respectively). However, there were no significant associations between M9N2 (Structure 8) expression and patient age, sex, histological type, tumor stage, vascular or lymphatic invasion (Table II).

Discussion

Aberrant protein glycosylation has been reported in various diseases, including cancer, and certain glycan structures are well-known tumor markers. The present study demonstrated the comparative structural glycomics of the *N*-glycans in the serum from patients with CCA compared with healthy controls using MS.

The expression of 3 *N*-glycans, including M6N2 (structure 3; P=0.044), M9N2 (structure 8, P=0.030) and NeuAc3H3N3M3N2F (structure 9; P=0.002), differed significantly between the 4 controls and 8 patients with CCA. The expression of M6N2 and NeuAc3H3N3M3N2F were

significantly increased in the serum of patients with CCA, whereas M9N2 expression was significantly decreased. The increased expression of high-mannose *N*-glycans in patients with CCA is consistent with the results of previous studies investigating *N*-glycan expression in different types of cancer, including breast (20,21) and colorectal cancer (22). The increased expression of M6N2 high-mannose structures indicates an incomplete maturation of the *N*-glycans in the glycosylation process and an association with CCA tumor progression.

The significant increase of core fucosylated tri-antennary *N*-glycans (NeuAc3H3N3M3N2F; structure 9) in the serum of patients with CCA may be an example of the alteration to the glycomic profile observed in different types of cancer, including breast cancer (20), colorectal cancer (22), hepatocellular carcinoma (23) and ovarian cancer (24). Furthermore, core fucosylation has been identified as an important feature in tumor progression and is associated with increased cancer metastasis (25). Tri-antennary *N*-glycans and core fucose structures have been associated with cancer metastasis and serve as a useful tumor biomarker (26); This suggests that these *N*-glycans may be associated with tumor progression in patients with CCA.

M9N2 was significantly decreased in CCA, indicating an increase in the glycosylation process that decreases M9N2 expression to produce complex and hybrid oligosaccharides in CCA. Decreased levels of high-mannose type of *N*-glycans have been detected in ovarian (27) and gastric cancer (28).

Furthermore, the alteration of high-mannose glycans, M6N2 and M9N2, may be due to a more complex process that occurs during biosynthetic machinery, involving CCA glycosylation.

Based on the glycan structural analysis, the changes in glycan expression that occur during CCA may reflect specific changes that occur in glycosyltransferase expression. The increase of tri-antennary structures may be attributed to the altered expression of glycosyltransferases, including N-acetylglucosaminyltransferase (GnT)-III, -IV and -V. GnT-V is markedly associated with cancer metastasis, whereas GnT-III is associated with cancer suppression (26). The abundance of terminal sialic acid (NeuAc) in CCA may be attributed to the dominant activity of sialyltransferases, including ST3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 3 and ST6 β -galactoside α -2,6-sialyltransferase, that represent the majority of glycosyltransferases in CCA and may serve a pivotal role in cancer progression (29).

The present study identified an association between N-glycan expression and age in patients with CCA. The increased expression of M6N2 and NeuAc3H3N3M3N2F is associated with an age of <60 years old in patients with CCA. Age-related changes in the expression of human serum N-glycans have been reported in European (30) and Chinese patients (31). CCA is rarely diagnosed in patients <40 years old; changes in the expression of N-glycans in the serum of patients with CCA may occur due to tumorigenicity and aging.

In conclusion, the altered expression of N-glycans in the serum of patients with CCA indicate that they serve an important role in tumor growth and progression. M6N2 and NeuAc3H3N3M3N2F, which exhibit significantly increased expression in the serum of patients with CCA, may therefore be potentially promising biomarkers for CCA.

Acknowledgements

The present study was supported by the Suranaree University of Technology (grant no. SUT6-606-58-12-04). The authors wish to thank Mr. Bryan Roderick Hamman for assistance with the English-language presentation of the present study.

References

- Sripa B: Pathobiology of opisthorchiasis: An update. *Acta Trop* 88: 209-220, 2003.
- Patel T: Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 33: 1353-1357, 2001.
- Shaib YH, Davila JA, McGlynn K and El-Serag HB: Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: A true increase? *J Hepatol* 40: 472-477, 2004.
- Apweiler R, Hermjakob H and Sharon N: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473: 4-8, 1999.
- Wong CH: Protein glycosylation: New challenges and opportunities. *J Org Chem* 70: 4219-4225, 2005.
- Varki A and Gagneux P (eds): *Biological Functions of Glycans*. In: *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL and Seeberger PH (eds). Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- Kim EH and Misek DE: Glycoproteomics-based identification of cancer biomarkers. *Int J Proteomics* 2011: 601937, 2011.
- Juntavee A, Sripa B, Pugkhem A, Khuntikeo N and Wongkham S: Expression of sialyl Lewis(a) relates to poor prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 11: 249-254, 2005.
- Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu Y, Kuwahara K, Narimatsu H, Wongkham S and Sakaguchi N: A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: Values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer* 117: 3393-3403, 2011.
- Sawanyawisuth K, Silsirivanit A, Kunlabut K, Tantapotinan N, Vaeteewoottacharn K and Wongkham S: A novel carbohydrate antigen expression during development of *opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma in golden hamster: A potential marker for early diagnosis. *Parasitol Int* 61: 151-154, 2012.
- Indramanee S, Silsirivanit A, Pairojkul C, Wongkham C and Wongkham S: Aberrant glycosylation in cholangiocarcinoma demonstrated by lectin-histochemistry. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (Suppl): S119-S124, 2012.
- Phoomak C, Silsirivanit A, Wongkham C, Sripa B, Puapairoj A and Wongkham S: Overexpression of O-GlcNAc-transferase associates with aggressiveness of mass-forming cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (Suppl): S101-S105, 2012.
- Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H, Narimatsu H, Okada S, *et al*: CA-S27: A novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 104: 1278-1284, 2013.
- Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, Ikehara Y, Irimura T, Yamamoto M, Nakanuma Y, Miyoshi E, Nakamori S, Nakanishi H, *et al*: Lectin microarray-based sero-biomarker verification targeting aberrant O-Linked glycosylation on mucin 1. *Anal Chem* 87: 7274-7281, 2015.
- Talabnin K, Talabnin C, Ishihara M, Azadi P, Wongkham S and Sripa B: Differential expression of O-glycoprotein glycans in cholangiocarcinoma cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 17: 691-695, 2016.
- Talabnin K, Aoki K, Saichua P, Wongkham S, Kaewkes S, Boons GJ, Sripa B and Tiemeyer M: Stage-specific expression and antigenicity of glycoprotein glycans isolated from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol* 43: 37-50, 2013.
- Aoki K, Perlman M, Lim JM, Cantu R, Wells L and Tiemeyer M: Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J Biol Chem* 282: 9127-9142, 2007.
- Anumula KR and Taylor PB: A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem* 203: 101-108, 1992.
- Domon B and Costello CE: Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 27: 1534-1543, 1988.
- Liu X, Nie H, Zhang Y, Yao Y, Maitikabili A, Qu Y, Shi S, Chen C and Li Y: Cell surface-specific N-glycan profiling in breast cancer. *PLoS One* 8: e72704, 2013.
- de Leoz ML, Young LJ, An HJ, Kronewitter SR, Kim J, Miyamoto S, Borowsky AD, Chew HK and Lebrilla CB: High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Mol Cell Proteomics* 10: M110.002717, 2011.
- Sethi MK, Thaysen-Andersen M, Smith JT, Baker MS, Packer NH, Hancock WS and Fanayan S: Comparative N-glycan profiling of colorectal cancer cell lines reveals unique bisecting GlcNAc and alpha-2,3-linked sialic acid determinants are associated with membrane proteins of the more metastatic/aggressive cell lines. *J Proteome Res* 13: 277-288, 2014.
- Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, Hiramatsu N, Igura T, Hayashi N, Taniguchi N and Kondo A: Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J Proteome Res* 7: 2222-2233, 2008.
- Schwedler C, Kaup M, Weiz S, Hoppe M, Braicu EI, Sehoul J, Hoppe B, Tauber R, Berger M and Blanchard V: Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery. *Anal Bioanal Chem* 406: 7185-7193, 2014.
- Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML and Kerbel RS: Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236: 582-585, 1987.

26. Taniguchi N and Kizuka Y: Glycans and cancer: Role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis and therapeutics. *Adv Cancer Res* 126: 11-51, 2015.
27. Kronewitter SR, De Leoz ML, Strum JS, An HJ, Dimapasoc LM, Guerrero A, Miyamoto S, Lebrilla CB and Leiserowitz GS: The glycoLyzer: Automated glycan annotation software for high performance mass spectrometry and its application to ovarian cancer glycan biomarker discovery. *Proteomics* 12: 2523-2538, 2012.
28. Ozcan S, Barkauskas DA, Renee Ruhaak L, Torres J, Cooke CL, An HJ, Hua S, Williams CC, Dimapasoc LM, Han Kim J, *et al*: Serum glycan signatures of gastric cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 7: 226-235, 2014.
29. Dall'Olio F, Malagolini N, Trinchera M and Chiricolo M: Sialosignaling: Sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1840: 2752-2764, 2014.
30. Vanhooren V, Laroy W, Libert C and Chen C: N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology* 9: 351-356, 2008.
31. Ding N, Nie H, Sun X, Sun W, Qu Y, Liu X, Yao Y, Liang X, Chen CC and Li Y: Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing* 40: 568-575, 2011.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.



ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กระจ่าง ตลับนิล ผู้ช่วยศาสตราจารย์สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2523 ณ จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่งและเหรียญทอง จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2545 และสำเร็จการศึกษาปริญญาโท (ชีวเคมีทางการแพทย์) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2551 โดยได้รับทุนโครงการปริญญาเอก กาญจนานิกะ (คปก.) รุ่นที่ 4 หลังจบการศึกษาได้รับการบรรจุเข้าเป็นอาจารย์ประจำคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และลาศึกษาวิจัยหลังปริญญาเอก (Post Doctoral Training) ณ Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นเวลา 2 ปี เมื่อสำเร็จการทำวิจัยได้กลับมาทำงานที่คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และเมื่อ พ.ศ. 2558 ได้ย้ายมาบรรจุเข้าเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สถานที่ติดต่อ อาคารเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา (F9) ชั้น 2 สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทร. 044 223905 แฟกซ์ 044 223920 หรือ Email: krajang.t@sut.ac.th



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี