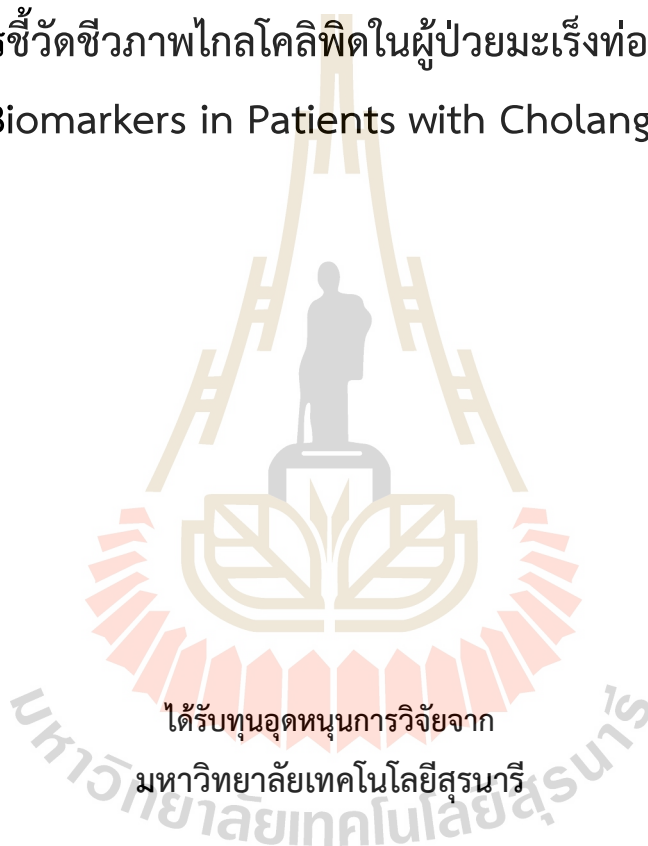




รายงานการวิจัย

สารชีวตัวชีวภาพไกลโคลิพิดในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี Glycolipid Biomarkers in Patients with Cholangiocarcinoma



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

สารชีวัดชีวภาพไกลโคลิพิดในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
Glycolipid Biomarkers in Patients with Cholangiocarcinoma

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กระจ่าง ตลับนิล

สาขาวิชาพยาธิวิทยา

สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องสารชีวตัวชีวภาพไกลโคลิพิดในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี สามารถสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ ข้าพเจ้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กระจ่าง ตลับนิล หัวหน้าโครงการวิจัย ขอขอบคุณ Dr. Tadahiro Kumagai ผู้เชี่ยวชาญด้านไกลโคลิพิด Miss Mayumi Ishihara และ Dr. Parastoo Azadi ผู้เชี่ยวชาญด้าน Mass Spectrometry จาก Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia, USA ที่ให้คำปรึกษาทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในการศึกษา และขอขอบพระคุณสำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559

กระจ่าง ตลับนิล

สิงหาคม 2562



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคมะเร็งท่อน้ำดียังคงต้องการสารชีวตัวชีวภาพ (biomarkers) ที่มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยมะเร็ง
ในระยะเริ่มต้น ด้วยเทคนิค mass spectrometry เราสามารถศึกษาการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรปกติ พบว่า
สารไกลโคสฟิงโกลิพิดที่ตรวจพบมีทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ CMH, Lac-Cer, Gb3, Gb4/Lc4, Lc3, GM3,
GM2, GM1, hFA-CMH, hFA-Lac-Cer, hFA-Gb3 และ hFA-GM3 โดยพบว่าไกลโคสฟิงโกลิพิด Gb3 มีการ
แสดงออกมากที่สุดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีแบบ poorly-differentiated adenocarcinoma (K100),
moderately- to poorly-differentiated adenocarcinoma (M214) และ adenosquamous cell
carcinoma (M213) ส่วน Lac-Cer มีการแสดงออกมากที่สุดใน moderately-differentiated
adenocarcinoma (M055) และ CMH มีการแสดงออกมากที่สุดใน squamous cell carcinoma (M139)
การศึกษาการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับกลุ่ม
ประชากรปกติ พบว่า ไกลโคสฟิงโกลิพิด Lac-Cer มีการแสดงออกมากที่สุดในกลุ่มแลคโตไซด์ (lactosides)
และโกลโบไซด์ (globosides) (normal $24.40 \pm 0.11\%$, tumor $24.61 \pm 2.10\%$) ส่วนในกลุ่มแกงกลีโอไซด์
(gangliosides) พบ GM3 มีการแสดงออกมากที่สุด (normal $29.14 \pm 1.31\%$, tumor $30.53 \pm 4.04\%$) เมื่อ
เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ($n=15$) กับซีรัมของประชากรปกติ ($n=15$)
พบว่า การแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด GM2 ($p=0.042$) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ในทางกลับกันสารไกลโคสฟิงโกลิพิด Gb3 ($p=0.041$) มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การ
แสดงออกของโครงสร้างของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดที่เปลี่ยนแปลงในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีบ่งบอกถึง
ความสัมพันธ์ของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดกับการดำเนินโรคซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการ
พยากรณ์โรคของมะเร็งท่อน้ำดีได้

Abstract

Effective biomarkers for early detection of cholangiocarcinoma (CCA) are needed. Using nanospray ionization-linear ion trap mass spectrometry (NSI-MSⁿ), we demonstrated the comparative structural glycomics of glycosphingolipids (GSLs) in CCA cell lines and serum from CCA patients compared with healthy controls. Twelve different GSLs were detected—CMH, Lac-Cer, Gb3, Gb4/Lc4, Lc3, GM3, GM2, GM1, hFA-CMH, hFA-Lac-Cer, hFA-Gb3 and hFA-GM3. Gb3 was the most abundant in poorly-differentiated adenocarcinoma (K100), moderately- to poorly-differentiated adenocarcinoma (M214), and adenosquamous cell carcinoma (M213). Lac-Cer was the most abundant in moderately-differentiated adenocarcinoma (M055). CMH dominated squamous cell carcinoma (M139). In serum, Lac-Cer was the most abundant structure among the lactosides and globosides (normal 24.40±0.11%, tumor 24.61±2.10%), while GM3 predominated the gangliosides (normal 29.14±1.31%, tumor 30.53±4.04%). Between the 15 normal and 15 tumor cases, the 2 GSLs with significantly different amounts were Gb3 ($p=0.041$) and GM2 ($p=0.042$). These 2 glycolipid structures may be associated with tumor progression and used for clinical diagnosis.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี	6
วิธีดำเนินการวิจัย	6
สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การแสดงออกที่ต่างกันของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	8
การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ	11
บทที่ 5 ข้อวิจารณ์และบทสรุป	13
บรรณานุกรม	15
ประวัติผู้วิจัย	21

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.	รูปแบบสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย mass spectrometry (NSI-MS)	9
รูปที่ 2.	รูปแบบสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ที่พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (CCA sera) เปรียบเทียบกับประชากรปกติ (Healthy sera) โดยวิธี mass spectrometry	11



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. การแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็ง ท่อน้ำดี	10
ตารางที่ 2. รูปแบบสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (CCA sera) เปรียบเทียบกับประชากรปกติ (Healthy sera)	12



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดีทั้งภายในและภายนอกตับแต่ไม่รวมถึงเยื่อของถุงน้ำดีและ Ampulla of Vater (1) จากการศึกษาของ Parkin และหน่วยมะเร็งของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น พบว่าโรคมะเร็งท่อน้ำดีมีอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลกที่จังหวัดขอนแก่น 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 และปลาแจ่ว ซึ่งมีสารประกอบ N-nitroso compound และ nitrosamine โดยข้อมูล ดังกล่าวได้รับการสนับสนุนโดยงานวิจัยทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง (4-7) การวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มต้นทำได้ยาก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษจะได้รับ การวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระยะท้าย การรักษาด้วยการผ่าตัดและรังสีรักษามักไม่ได้ผล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการหาสารชี้วัดชีวภาพ (biomarkers) และวิธีการตรวจคัดกรองโรคในระยะแรก (early detection) เพื่อช่วยในการวินิจฉัยและการพยากรณ์การรักษาของโรคมะเร็งท่อน้ำดี

ณ ปัจจุบันพบว่าสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipids, GSLs) มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะไกลโคสฟิงโกลิพิดที่มีส่วนประกอบของกรดเซียลิก (ganglioside) ได้มีการศึกษาถึงโครงสร้างและหน้าที่ของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดและพบว่าสารไกลโคสฟิงโกลิพิดมีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง (melanoma) มะเร็งประสาท (neuroblastoma) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) มะเร็งเต้านม (breast cancer) และมะเร็งที่ไต (renal cancer) เป็นต้น และสารไกลโคสฟิงโกลิพิดได้ถูกจัดให้เป็นเป้าหมายในการรักษาในมะเร็งหลายชนิด (8) มีการศึกษาส่วนประกอบของโครงสร้างลิพิดและความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในหนูที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและส่วนประกอบของโครงสร้างลิพิดจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมรอบๆ เซลล์ (9) จากการศึกษาสารไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugates) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าคาร์โบไฮเดรตแอนติเจนชนิด S121 มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคและจำเพาะกับมะเร็งท่อน้ำดี (10) และพบการแสดงออกของ S121 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในสัตว์ทดลองและมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรค (11) การศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค sandwich ELISA พบคาร์โบไฮเดรต epitope ชนิด CA-S27 มีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคและอาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคได้ (12) มีการศึกษาโดยเทคนิค lectin micro-array เพื่อตรวจหาสารไกลโคโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่ง

อาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ (13) การศึกษาโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตมีความแตกต่างกันในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological types) ของมะเร็งท่อน้ำดีและสัมพันธ์กับการดำเนินโรค (14) ล่าสุดมีการศึกษาโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-linked glycans เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรปกติ (15) แต่รายละเอียดของโครงสร้างของสารไกลโคลิพิด รวมถึงการทำหน้าที่ในเนื้อเยื่อและในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังไม่มีการศึกษา

การศึกษาสารไกลโคลิพิดโดยเฉพาะสารไกลโคสฟิงโกลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอาจนำไปสู่การค้นพบสารชีวตัวชีวภาพในการวินิจฉัยระยะแรกของมะเร็งท่อน้ำดีและอาจเป็นเป้าหมายตัวใหม่ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารไกลโคลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
2. เพื่อหารูปแบบของสารไกลโคลิพิดที่มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งท่อน้ำดี

3. ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาโครงสร้างของสารไกลโคลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยอาศัยเทคนิค Mass spectrometry
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของไกลโคลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในแต่ละระยะของโรคเปรียบเทียบกับประชากรปกติ

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การแสดงออกของสารไกลโคลิพิดที่เปลี่ยนแปลงในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารไกลโคลิพิดกับการดำเนินโรค สารไกลโคลิพิด GM2 ซึ่งมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอาจถูกนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารชีวตัวชีวภาพ (biomarkers) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการและผลงานการตีพิมพ์

- 1) การนำเสนอผลงานวิจัย:

ผู้วิจัยได้นำผลงานวิจัยไปนำเสนอที่งานประชุม “24th Asia Pacific Cancer Conference (APCC 2017) 22-24 June, 2017 Seoul, Korea” เรื่อง “Ganglioside GM2: potential biomarker for cholangiocarcinoma”

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดี ซึ่งรวมถึงท่อน้ำดีในและภายนอกตับแต่ไม่รวมถึงเยื่อของถุงน้ำดีและ Ampulla 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*

สาเหตุของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบเรื้อรังและการอุดตันของท่อน้ำดีจากการเป็นโรค 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 ของมะเร็งซึ่งการรักษาโดยการผ่าตัดมีโอกาสประสบความสำเร็จ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งในระยะท้าย มะเร็งท่อน้ำดีมักพบในผู้ป่วยอายุมากกว่า 40 ปี และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ทำให้นอกจากผู้ป่วยจะได้รับผลกระทบจากการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ครอบครัวของผู้ป่วยก็ได้รับผลกระทบทั้งทางเศรษฐกิจและสังคม (39)

ไกลโคลิพิด คือสารกลุ่มลิพิดที่มีโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตมาเชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามชนิดของลิพิด คือ (1) Glycoglycerolipid (2) Glycosylphosphatidyl-inositol และ (3) Glycosphingolipids (GSLs) ไกลโคลิพิดที่มีกรดเซียลิก (ganglioside) พบได้ในส่วนพลาสมาเมมเบรน ชั้นนอกของเซลล์ รวมไปถึงส่วนของนิวเคลียสเมมเบรน ซึ่งทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของแคลเซียมภายในนิวเคลียส (40) GSLs มีการแสดงออกที่จำเพาะขึ้นกับชนิดและการพัฒนาของเซลล์และ พบว่า GSLs เป็นส่วนประกอบหลักของเซลล์ประสาทโดยพบในปริมาณมากกว่าร้อยละ 10 ของลิพิดทั้งหมด (41)

GSLs สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์แต่จะมีการแสดงออกที่มากขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง (melanoma) มะเร็งประสาท (neuroblastoma) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) มะเร็งเต้านม (breast cancer) และมะเร็งที่ไต (renal cancer) เป็นต้น (8) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของไกลโคลิพิดเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและการทำหน้าที่ของเอนไซม์ glycosyltransferase และ glycohydrolase พบว่าสาร GSLs ชนิด GD2 ซึ่งมีกรดเซียลิก 2 โมเลกุล (disialoganglioside) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ (cell growth and differentiation) มีการแสดงออกที่มากขึ้นในมะเร็งประสาท (neuroblastoma) มะเร็งผิวหนัง (melanoma) มะเร็งสมอง (glioma) และ มะเร็งปอด (small-cell lung cancer) สาร GSLs ชนิด GD3 พบการแสดงออกสูงมากกว่าร้อยละ 80 ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง (melanoma) และในมะเร็งชนิดอื่นๆ ได้แก่ มะเร็งประสาท (neuroblastoma) มะเร็งสมอง (glioma) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) (42) ดังนั้น GD2 และ GD3 จึงได้รับการพิจารณาเพื่อเป็นเป้าหมายในการวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็ง (8)

การวิเคราะห์สารไกลโคลิพิดด้วยเทคนิค Mass spectrometry ทำได้โดยการสกัดแยกลิพิดจากตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Chloroform: Methanol: Water) จากนั้นทำการเตรียม GSLs ด้วยกระบวนการ saponification เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer (43) เพื่อให้กระบวนการแตกตัวเป็นไอออนของสารคาร์โบไฮเดรตมีประสิทธิภาพมากขึ้น สารคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการต่างๆ ได้แก่ permethylation (44, 45) หรือ methylation (46, 47) หรือ derivatization (48, 49) ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer สารไกลโคลิพิดที่มีโครงสร้างแตกต่างกันก็จะให้ค่าสัดส่วน mass/charge (m/z) ที่แตกต่างกันสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาชนิดและองค์ประกอบในโมเลกุลของสารไกลโคลิพิดที่ทำการศึกษาได้

การศึกษาสารคาร์โบไฮเดรตและไกลโคลิพิดในมะเร็งท่อน้ำดียังมีน้อย การศึกษาแอนติเจน Sialyl Lewis a (sLea) โดยเทคนิค Immunohistochemistry พบว่าการแสดงออกของ sLea มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของมะเร็งท่อน้ำดี (50) การศึกษาซิวรัมไกลโคโพรตีน mucin 5AC ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

น้ำดีโดยใช้ monoclonal antibody พบว่า คาร์โบไฮเดรต epitope S121 มีความจำเพาะและมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งท่อน้ำดี แต่รายละเอียดของโครงสร้างของ epitope S121 ยังไม่มีการศึกษา (10) การศึกษาในสัตว์ทดลองถึงความสัมพันธ์ของ epitope S121 กับมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า epitope S121 มีการแสดงออกที่ผิว (apical surface) ของเซลล์มะเร็งในระยะเริ่มต้น (1 เดือน) และแสดงออกมากขึ้นตามการเติบโตของเซลล์มะเร็ง (11) การศึกษาในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค Immunohistochemistry พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของสารคาร์โบไฮเดรต GlcNAc (51) และเอนไซม์ O-GlcNAc transferase ที่ใช้ในกระบวนการ O-linked glycosylation (52) และการศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค sandwich ELISA พบคาร์โบไฮเดรต epitope CA-S27 มีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคและอาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคได้ (12) มีการศึกษาโดยเทคนิค lectin microarray เพื่อตรวจสอบสารไกลโคโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งอาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ (13) การศึกษาโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีพบว่าการแสดงออกของสารคาร์โบไฮเดรตมีความแตกต่างกันในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ (Histological types) ของมะเร็งท่อน้ำดีและสัมพันธ์กับการดำเนินโรค (14) ล่าสุดมีการศึกษาโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของสารคาร์โบไฮเดรตชนิด N-linked glycans เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรปกติ (15) แต่รายละเอียดของโครงสร้างของสารไกลโคลิพิดรวมถึงการทำหน้าที่ในเนื้อเยื่อและในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังไม่มีการศึกษา

จากที่กล่าวมาทั้งหมดโครงสร้างของสารคาร์โบไฮเดรตและไกลโคลิพิดของมะเร็งท่อน้ำดีมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งและสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น ซีรัม หรือปัสสาวะ เพื่อหารูปแบบสารคาร์โบไฮเดรตและไกลโคลิพิดที่มีความจำเพาะและมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยและการรักษา มะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

สารโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ได้มาจากบริษัทซิกมา-อัลดริช (Sigma-Aldrich) สารไกลโคลิพิดมาตรฐานและสารเคมีอื่นๆ ได้มาจากแหล่งจำหน่ายสารเคมีมาตรฐาน

2. วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (CCA cell lines)

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (CCA cell lines) K100, M055, M139, M213 และ M214 ความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) ที่มีส่วนผสมของยาเพนิซิลลิน (100 U/mL penicillin) สเตปโตมัยซิน (100 μ g/mL streptomycin) และ 10% FBS (Hyclone Laboratories) ที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นของอากาศ 95%

ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและประชากรปกติ

ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 15 ราย (Tumor stage II-IV) และซีรัมของประชากรปกติจำนวน 15 ราย ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เลขที่ HE521209

การเตรียมสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (Glycosphingolipids, GSLs)

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกทำให้เข้มข้น (packed cell) ปริมาณ 500 μ L หรือซีรัมปริมาณ 20 μ L ถูกสกัดด้วย สารคลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 4:8:3 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชม. เพื่อสกัดสารลิพิดจากตัวอย่าง จากนั้นทำการปั่นสารสกัดด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที สารสกัดส่วนบน (supernatant) ถูกแยกและทำให้แห้งโดยเครื่อง rotary evaporator สารกลีเซอโรลิพิด (glycerolipids) จะถูกแยกออกโดยกระบวนการ saponification โดยใช้ 0.5 M KOH ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง สารฟอสโฟลิพิดกลุ่มอีเทอร์ (ether-type of phospholipids) จะถูกแยกออกไปโดยใช้กรดไฮโดร

คลอริกเข้มข้น (concentrated HCl, pH 2) ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที สารสกัด GSLs ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการ dialysis ด้วยน้ำประปาและทำให้แห้งโดยเครื่อง rotary evaporator สารสกัด GSLs ปริมาณ 3 μL ถูกนำไปทดสอบบนแผ่น TLC โดยใช้ตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 6:4:1 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 9 นาที และทำปฏิกิริยากับ orcinol-sulfuric acid ทำให้สามารถมองเห็น GSLs ด้วยตาเปล่าได้ ปริมาณ GSLs ที่สกัดได้จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาเติมหมู่เมทิล (permethylation) โดยประเมินตามความเข้มข้นของ Lac-Cer บนแผ่น TLC

ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล (permethylation)

สาร GSLs ทำปฏิกิริยาเติมหมู่เมทิลตามวิธีของ Anumula and Taylor (53) ในสถานะที่ปราศจากน้ำ โดยใช้ 500 μL DMSO, 10 μg NaOH และ 200 μL methyl iodide (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นสาร GSLs ที่ผ่านกระบวนการเติมหมู่เมทิลจึงถูกสกัดในสาร dichloromethane และทำให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน

การตรวจวิเคราะห์ด้วย Nanospray Ionization-Linear Ion Trap Mass Spectrometry

สาร GSLs ที่ผ่านการเติมหมู่เมทิลถูกละลายใน methanol: 1-propanol: 2-propanol: 13 mM aqueous ammonium acetate ในอัตราส่วน 16:3:3:2 โดยปริมาตร แล้วทำการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง linear ion trap mass spectrometer (LTO; Thermo Scientific) โดยใช้ nanospray source โดยทำการตรวจวิเคราะห์ในโหมดไอออนบวก (positive ion mode) และตรวจ MS/MS spectra ที่ระดับพลังงานในการแตกพันธะ (CID) 45% สาร GSLs ที่มีจำนวนกรดไขมันตั้งแต่ 16-24 คาร์บอนจะถูกนำมาวิเคราะห์ ปริมาณการแสดงผลของสาร GSLs แต่ละชนิดจะถูกรายงานในรูปของร้อยละ (% Total Profile) โดยเทียบจากค่า signal intensity ของสาร GSLs ทั้งหมดที่ตรวจพบ

3. สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

ปริมาณการแสดงผลของสาร GSLs แต่ละชนิด (% Total profile) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับซีรัมของประชากรปกติรายงานในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (means \pm SD) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยใช้ independent *t* test การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดทำโดยโปรแกรม SPSS (IBM SPSS 19) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

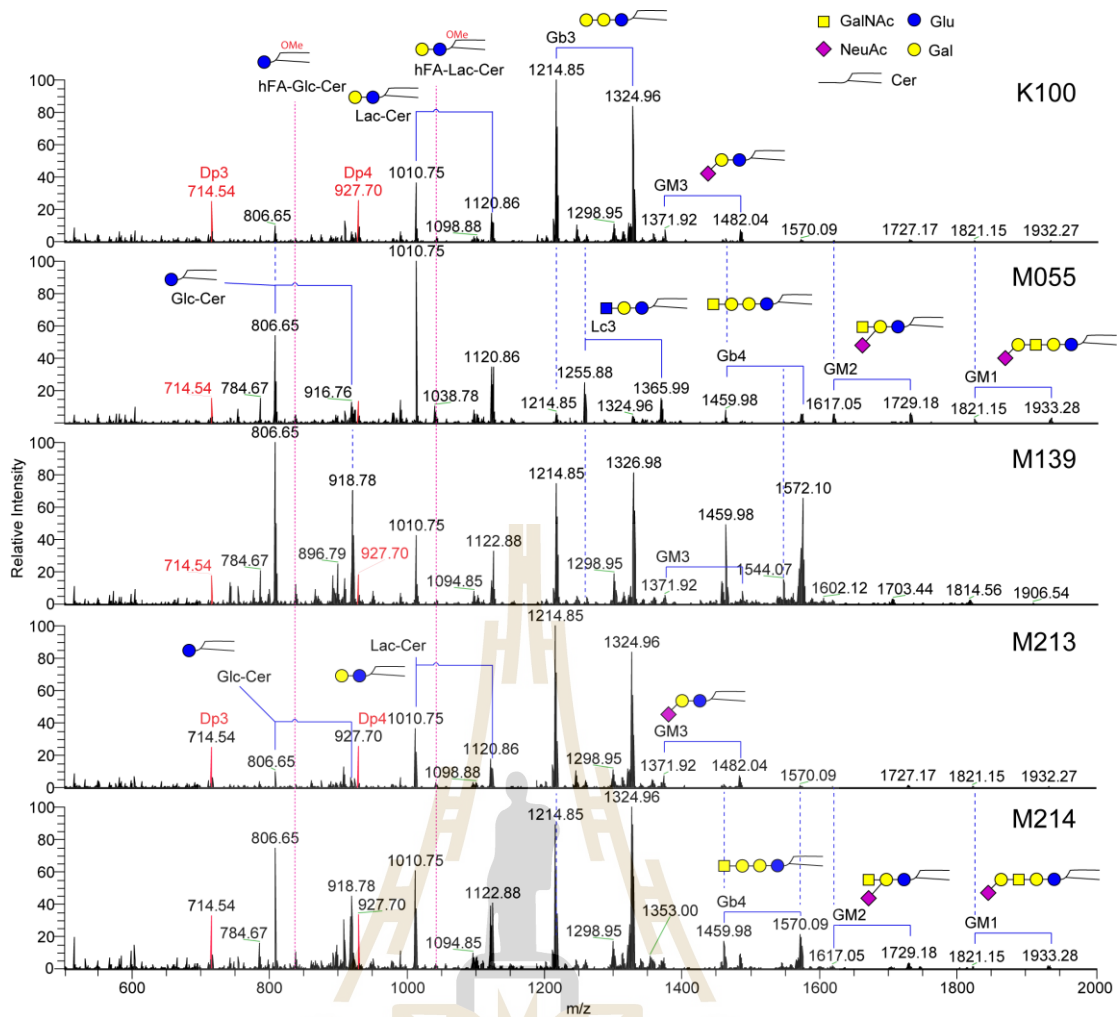
บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การแสดงออกที่แตกต่างกันของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

รูปแบบของสาร GSLs ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ แสดงดังรูปที่ 1 สาร GSLs ที่ตรวจพบถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ แลคโตไซด์ (lactoside) โกลโบไซด์ (globoside) และแกงกลีโอไซด์ (ganglioside) โดยรวมถึงโครงสร้างแบบไฮดรอกซีเลส (hydroxylated forms, hFA) แลคโตไซด์ที่ตรวจพบ ได้แก่ Lac-Cer (structure 2), nLc4 (structure 4), Lc3 (structure 5) และ hFA-Lac-Cer (structure 10) โกลโบไซด์ ได้แก่ Gb3 (structure 3), Gb4 (structure 4) และ hFA-Gb3 (structure 11) แกงกลีโอไซด์ ได้แก่ GM3 (structure 6), GM2 (structure 7), GM1 (structure 8) และ hFA-GM3 (structure 12) โครงสร้าง CMH (ceramide mono-hexose) (structure 1) ถูกจัดเป็นโครงสร้างไอโซเมอร์ (isomeric structures) แบบ Glc-Cer หรือ Gal-Cer ซึ่งพบลักษณะของไฮดรอกซีเลส hFA-CMH (structure 9) ด้วย Gb4/nLc4 (structure 4) เป็นลักษณะของโครงสร้างไอโซเมอร์ของโกลโบไซด์ (Gb4) และแลคโตไซด์ (nLc4) โกลโบไซด์

Gb3 (structure 3) เป็นโครงสร้างที่มีการแสดงออกมากที่สุดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีแบบ poorly-differentiated adenocarcinoma (K100; 61.6%), moderately- to poorly-differentiated adenocarcinoma (M214; 39.7%) และ adenosquamous cell carcinoma (M213; 38.4%) ส่วน Lac-Cer (structure 2) มีการแสดงออกมากที่สุดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีแบบ moderately-differentiated adenocarcinoma (M055; 45.4%) และ CMH (structure 1) มีการแสดงออกมากที่สุดใน squamous cell carcinoma (M139; 28.4%) โครงสร้างของ GSLs และปริมาณการแสดงออกทั้งหมดที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีถูกแสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 1. รูปแบบสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย mass spectrometry (NSI-MS) พบโครงสร้างของ GSLs แบบ แลคโตไซด์ (lactoside) โกลโบไซด์ (globoside) และแกงกลิโอไซด์ (ganglioside) รวมถึงโครงสร้างแบบไฮดรอกซีเลส (hFA) โดยมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี รูปกราฟิกของโครงสร้างและโมเลกุลของน้ำตาลแสดงตามระบบของ the Consortium for Functional Glycomics (<http://glycomics.scripps.edu/CFG-nomenclature.pdf>).

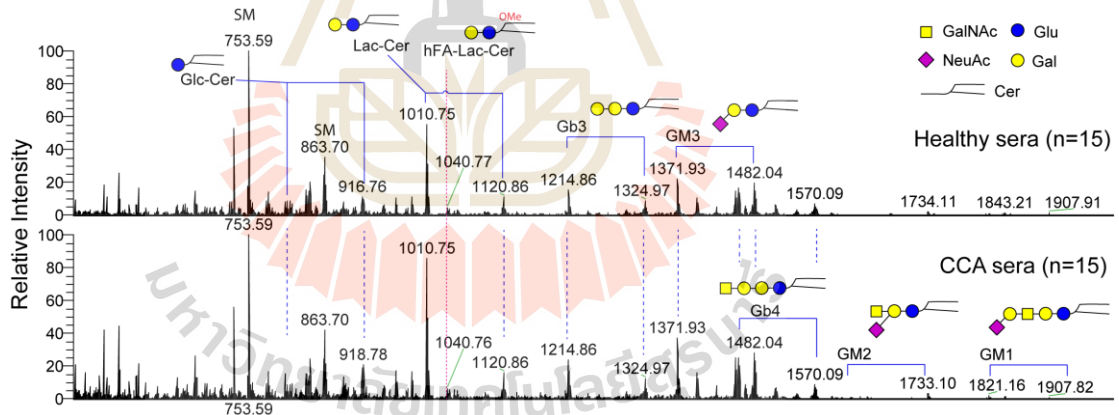
ตารางที่ 1. การแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

Structures	GSLs prevalence (% Total profile)				
	K100	M055	M139	M213	M214
1 CMH	5.4	20.1	28.4	21.4	19.6
2 Lac-Cer	16.9	45.4	12.9	22.2	20.5
3 Gb3	61.6	4.1	27.9	38.4	39.7
4 Gb4/nLc4	1.6	6.1	23.3	7.2	9.2
5 Lc3	0.6	10.1	0.3	0.7	0.7
6 GM3	5.0	1.1	2.2	3.1	3.1
7 GM2	1.2	5.7	0.4	1.5	1.7
8 GM1	1.2	4.7	0.4	1.2	1.5
9 hFA-CMH	0.8	1.5	2.7	2.3	2.1
10 hFA-Lac-Cer	1.2	1.0	0.7	1.1	0.9
11 hFA-Gb3	3.8	0.1	0.6	0.9	0.8
12 hFA-GM3	0.6	0.0	0.1	0.1	0.1

CMH, ceramide mono hexose; Lac-Cer, Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; Gb3, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; Gb4, GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; Lc3, GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; nLc4, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; GM3, NeuAc2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; GM2, GalNAc β 1-4[NeuAc2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; GM1, Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; hFA, fatty acid hydroxylation

2. การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ

ด้วยเทคนิค mass spectrometry สามารถวิเคราะห์โครงสร้างและศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติได้ โดยพบว่า สารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ที่ตรวจพบมีด้วยกัน 11 โครงสร้าง เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (2 CMH, 2 lactosides, 3 globosides และ 4 gangliosides) เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ยกเว้น แลคโตไซด์ Lc3 ที่ตรวจไม่พบในซีรัม พบว่าสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) Lac-Cer (structure 2) มีการแสดงออกมากที่สุดในกลุ่มแลคโตไซด์และโกลโบไซด์ (normal $24.40 \pm 0.11\%$, tumor $24.61 \pm 2.10\%$) ส่วนในกลุ่มแกงกลิโอไซด์พบการแสดงออกของ GM3 (structure 6) มากที่สุด (normal $29.14 \pm 1.31\%$, tumor $30.53 \pm 4.04\%$) เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและซีรัมของประชากรปกติ พบว่า แกงกลิโอไซด์ GM2 (structure 7, $p=0.042$) มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางกลับกันโกลโบไซด์ Gb3 (structure 3, $p=0.041$) มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2. และ ตารางที่ 2.)



รูปที่ 2. รูปแบบสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ที่พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (CCA sera) เปรียบเทียบกับประชากรปกติ (Healthy sera) โดยวิธี mass spectrometry พบการแสดงออกของสารไกลโคลิพิดชนิด GM2 (GalNAc β 1-4[NeuAc2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.042$) และสารไกลโคลิพิดชนิด Gb3 (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) มีการแสดงออกที่ลดลง ($p=0.041$)

ตารางที่ 2 รูปแบบสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (GSLs) ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (CCA sera) เปรียบเทียบกับประชากรปกติ (Healthy sera) ตรวจวัดด้วยวิธี mass spectrometry

Structures	Group [§]	n	Relative abundance (%)		p values
			Means	± SD	
1 CMH	N	15	14.09	± 1.95	0.931
	T	15	14.25	± 2.10	
2 Lac-Cer	N	15	24.40	± 0.11	0.846
	T	15	24.61	± 2.29	
3 Gb3	N	15	11.42	± 0.19	*0.041
	T	15	8.02	± 2.57	
4 Gb4/nLc4	N	15	10.18	± 0.76	0.868
	T	15	10.00	± 1.98	
5 Lc3	nd	nd	nd		nd
6 GM3	N	15	29.14	± 1.31	0.523
	T	15	30.53	± 4.04	
7 GM2	N	15	1.40	± 0.18	*0.042
	T	15	2.45	± 0.80	
8 GM1	N	15	0.44	± 0.29	0.973
	T	15	0.43	± 0.25	
9 hFA-CMH	N	15	3.66	± 0.77	0.858
	T	15	3.54	± 0.40	
10 hFA-Lac-Cer	N	15	1.49	± 0.03	0.798
	T	15	1.45	± 0.31	
11 hFA-Gb3	N	15	0.38	± 0.24	0.323
	T	15	0.67	± 0.40	
12 hFA-GM3	N	15	3.39	± 0.76	0.431
	T	15	4.04	± 1.01	

[§]N, Healthy sera; T, CCA sera;

nd, not detected

* $p < 0.05$, considered significant difference

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipids, GSLs) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological type of cancer) โดยอาศัยเทคนิค mass spectrometry และทำการศึกษาการการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับประชากรปกติ

การแสดงผลการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดที่แตกต่างกันในแต่ละจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีบ่งบอกถึงความสำคัญของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการ (tumor differentiation) ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจากการศึกษาพบว่า โกลโบไซด์ Gb3 (structure 3) มีการแสดงออกที่มากที่สุด ใน poorly-differentiated adenocarcinoma (K100), moderately- to poorly-differentiated adenocarcinoma (M214) และ adenosquamous cell carcinoma (M213) สอดคล้องกับการศึกษาในเนื้อเยื่อของมะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) และมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) ที่พบการแสดงออกของ Gb3 ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีพัฒนาการต่ำ (less differentiated tissue) (54, 55)

Lac-Cer (structure 2) ถูกพบการแสดงออกมากที่สุด ใน moderately-differentiated adenocarcinomas (M055) ส่วน CMH (structure 1) ถูกพบการแสดงออกมากที่สุด ใน squamous cell carcinomas (M139) ซึ่งมีรายงานการแสดงออกที่สูงของ Lac-Cer และ CMH ในโรคมะเร็งลำไส้ (colon cancer) และอาจใช้เป็นสารชี้วัดชีวภาพ (biomarkers) ของมะเร็งลำไส้ได้ (56)

แกงกลีโอไซด์ GM3 (structure 6) ถูกพบการแสดงออกมากที่สุด ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและในซีรัมของประชากรปกติ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ GM3 ถูกรายงานในเนื้อเยื่อของมะเร็งหลายชนิด (57) และ GM3 ที่พบในซีรัมถูกเสนอให้เป็นสารชี้วัดชีวภาพของมะเร็งไต kidney cancer (58) และถูกจัดให้เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของโรคทางเมตาบอลิซึม (metabolic syndrome) (59) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ การแสดงผลการแสดงออกของซีรัม GM3 ไม่พบความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและประชากรปกติ

การเปรียบเทียบการแสดงผลการแสดงออกของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและในซีรัมของประชากรปกติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ 2 โครงสร้าง คือ GM2 (structure 7, $p=0.042$) และ Gb3 (structure 3, $p=0.041$) โดย GM2 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ส่วน Gb3 มีการแสดงออกที่ลดลง การแสดงผลการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ GM2 ถูกรายงานในเนื้อเยื่อมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งผิวหนัง (melanoma) มะเร็งประสาท (neuroblastoma) มะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งลำไส้ (colon cancer) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) และมะเร็งเยื่อบุมดลูก

(endometrial cancer) (57) แต่ข้อมูลการแสดงออกของ GM2 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งยังมีน้อย (60) การศึกษาบทบาทของ GM2 ในเซลล์มะเร็งพบว่า GM2 มีบทบาทกับการเคลื่อนที่และแพร่กระจายของมะเร็ง (migration/invasion) (61) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของซีรัม GM2 ในมะเร็งท่อน้ำดีจึงอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติบโตพัฒนาและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ในทางตรงกันข้าม Gb3 ซึ่งถูกรายงานว่ามีการแสดงออกที่สูงในมะเร็งตับอ่อนและมะเร็งลำไส้ (55, 62) พบว่ามีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกที่ลดลงของ Gb3 ถูกศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งเต้านมและพบว่ามีความสัมพันธ์กับเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็ง (cancer stem cells) (63) การศึกษาหน้าที่ของ Gb3 พบว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของยีนดื้อยาในมนุษย์ (MDR1) และยับยั้งกระบวนการการตายของเซลล์แบบมีแผน (apoptosis) (64) การลดลงของ Gb3 ในมะเร็งท่อน้ำดีแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของการสังเคราะห์สารไกลโคสฟิงโกลิพิดในช่วงการพัฒนาของมะเร็ง สารไกลโคสฟิงโกลิพิด Gb3 ใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ คือ Lac-Cer ร่วมกันกับแกงกลีโอไซด์ GM3 และ GM2 การเพิ่มขึ้นของ GM2 ในมะเร็งท่อน้ำดีอาจส่งผลต่อการแสดงออกที่ลดลงของ Gb3 ได้

การเกิดกระบวนการไฮดรอกซิเลชันของกรดไขมันในโครงสร้างของไกลโคสฟิงโกลิพิด (Fatty acid hydroxylation, hFA) พบการแสดงออกทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และในซีรัมของผู้ป่วยและประชากรปกติ ซึ่งโดยปกติการแสดงออกของ hFA-GSLs พบได้ในเนื้อเยื่อของระบบประสาท (nervous system) เยื่อผิวหนังชั้นนอก (epidermis) เนื้อเยื่อไต (kidney) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (tumors) (65) การเพิ่มขึ้นของ hFA-GSLs มีการรายงานในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งรังไข่ที่ดื้อต่อยา (66, 67) และมีการศึกษาถึงบทบาทของ hFA-GSLs ในกระบวนการรักษาสมดุลของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane homeostasis) และกระบวนการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) (68) การแสดงออกของ hFA-GSLs ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับที่พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของ hFA-GSLs ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับประชากรปกติ

กล่าวโดยสรุป การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแสดงถึงการมีบทบาทของสารไกลโคสฟิงโกลิพิดในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของแกงกลีโอไซด์ GM2 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จึงเป็นเป้าหมายใหม่ที่มีโอกาสถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการเป็นสารชี้วัดชีวภาพ (biomarker) 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, Bhamarapravati 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. Daniotti JL, Vilcaes AA, Torres Demichelis V, Ruggiero FM and Rodriguez-Walker M: Glycosylation of glycolipids in cancer: basis for development of novel therapeutic approaches. *Front Oncol* 3: 306, 2013.
9. Kobliakov VA, Somova OG, Kandyba AG, Kondalenko VF, Klim NM and Dyatlovitskaya EV: Comparative study of lipid composition and proliferative activity of rat cholangiocarcinoma RS1 and sarcoma M1 depending on the transplantation organ. *Biochemistry (Mosc)* 67: 1258-1261, 2002.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Talabnin K, Talabnin C, Ishihara M and Azadi P: Increased expression of the high-mannose M6N2 and NeuAc3H3N3M3N2F tri-antennary N-glycans in serum of cholangiocarcinoma patients. *Oncol Lett* Accepted: 2017.
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, Ladep 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 Blechacz 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. Ledeen RW and Wu G: Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *J Lipid Res* 49: 1176-1186, 2008.
41. Tettamanti G: Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J* 20: 301-317, 2004.
42. Lo AS, Ma Q, Liu DL and Junghans RP: Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res* 16: 2769-2780, 2010.
43. Yin AB, Hawke D and Zhou D: Mass spectrometric analysis of glycosphingolipid antigens. *J Vis Exp* 2013.
44. 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.
45. 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.
46. Ciucanu I and Kerek F: A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131: 209-217, 1984.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.

53. Anumula KR and Taylor PB: A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem* 203: 101-108, 1992.
54. Arab S, Russel E, Chapman WB, Rosen B and Lingwood CA: Expression of the verotoxin receptor glycolipid, globotriaosylceramide, in ovarian hyperplasias. *Oncol Res* 9: 553-563, 1997.
55. Distler U, Souady J, Hulsewig M, *et al*: Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS One* 4: e6813, 2009.
56. Stimmer L, Dehay S, Nemati F, *et al*: Human breast cancer and lymph node metastases express Gb3 and can be targeted by STxB-vectorized chemotherapeutic compounds. *BMC Cancer* 14: 916, 2014.
57. Zhang S, Cordon-Cardo C, Zhang HS, *et al*: Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *Int J Cancer* 73: 42-49, 1997.
58. Lin L, Huang Z, Gao Y, *et al*: LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery. *Proteomics* 12: 2238-2246, 2012.
59. Veillon L, Go S, Matsuyama W, *et al*: Identification of Ganglioside GM3 Molecular Species in Human Serum Associated with Risk Factors of Metabolic Syndrome. *PLoS One* 10: e0129645, 2015.
60. Higashi H, Hirabayashi Y, Hirota M, Matsumoto M and Kato S: Detection of ganglioside GM2 in sera and tumor tissues of hepatoma patients. *Jpn J Cancer Res* 78: 1309-1313, 1987.
61. Kundu M, Mahata B, Banerjee A, *et al*: Ganglioside GM2 mediates migration of tumor cells by interacting with integrin and modulating the downstream signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1863: 1472-1489, 2016.
62. Maak M, Nitsche U, Keller L, *et al*: Tumor-specific targeting of pancreatic cancer with Shiga toxin B-subunit. *Mol Cancer Ther* 10: 1918-1928, 2011.
63. Liang YJ, Ding Y, Levery SB, Lobaton M, Handa K and Hakomori SI: Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4968-4973, 2013.
64. Liu YY, Gupta V, Patwardhan GA, *et al*: Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling. *Mol Cancer* 9: 145, 2010.
65. Hama H: Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim Biophys Acta* 1801: 405-414, 2010.

66. Iwamori M, Iwamori Y, Kubushiro K, Ishiwata I and Kiguchi K: Characteristic expression of Lewis-antigenic glycolipids in human ovarian carcinoma-derived cells with anticancer drug-resistance. *J Biochem* 141: 309-317, 2007.
67. Kiguchi K, Iwamori Y, Suzuki N, *et al*: Characteristic expression of globotriaosyl ceramide in human ovarian carcinoma-derived cells with anticancer drug resistance. *Cancer Sci* 97: 1321-1326, 2006.
68. Kota V and Hama H: 2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling. *Adv Biol Regul* 54: 223-230, 2014.



ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กระจ่าง ตลับนิล ผู้ช่วยศาสตราจารย์สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2523 ณ อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่งและเหรียญทอง จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2545 และสำเร็จการศึกษาปริญญาโท (ชีวเคมีทางการแพทย์) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2551 โดยได้รับทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก. รุ่นที่ 4) หลังจบการศึกษาได้รับการบรรจุเข้าเป็นอาจารย์ประจำคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และลาศึกษาวิจัยระดับหลังปริญญาเอก (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 สถานที่ติดต่ออาคารเฉลิมพระเกียรติ 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