



รายงานการวิจัย

ความเบี่ยงจากปกติของการแสดงออกของยีน RNF43 และบทบาทหน้าที่ใน
การส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็งในมะเร็งท่อน้ำดี
(Aberrant Ring Finger Protein (RNF43) and
their proliferative role in cholangiocarcinoma)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ความเป็ยจากปกติของการแสดงออกของยีน RNF43 และบทบาทหน้าที่ใน
การส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็งในมะเร็งท่อน้ำดี
(Aberrant Ring Finger Protein (RNF43) and
their proliferative role in cholangiocarcinoma)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา ตลับนิล

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557-2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สามารถบรรลุเสร็จสิ้นตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ ดิฉัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา ตลับนิล หัวหน้าโครงการขอขอบคุณ นางสาวพัชรี จันทรถาวร ผู้ช่วยวิจัยที่ได้มีส่วนร่วมในการออกแบบ การทดลอง ปฏิบัติการทดลองและการวิเคราะห์ผลทดลองต่างๆ ที่ได้กล่าวไว้ในรายงานวิจัยเล่มนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณา อนุเคราะห์เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสพิศ วงศ์คำ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างทำการทดลอง

สุดท้ายนี้ดิฉันขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557 และ 2558 ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ชุตินา ตลับนิล

เมษายน 2561



บทคัดย่อภาษาไทย

โปรตีน Ring finger protein 43 หรือ RNF43 คือ E3 ubiquitin-protein ligase ทำหน้าที่ควบคุมยับยั้งกระบวนการ Wnt signaling โดยจะนำโปรตีน ubiquitin มาจับกับโปรตีนเป้าหมายคือ Wnt receptor บนผิวเซลล์ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการชักนำการย่อยสลายโปรตีน Wnt receptor โดยการนำโปรตีนเป้าหมายนี้เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีเอนโดไซโทซิสและถูกย่อยด้วยไลโซโซม ในปัจจุบันหลายการศึกษาพบยีน RNF43 มีคุณสมบัติและหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และยังพบว่าในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดีมีการกลายพันธุ์ของยีนนี้ด้วยความถี่ที่สูง โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวพบมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน RNF43 ด้วย และจากศึกษาก่อนหน้านี้พบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน RNF43 มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน RNF43 ในระดับ mRNA และศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน (genetic status) อาการทางพยาธิคลินิกและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาพบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน RNF43 ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และโดยเฉพาะผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน RNF43 (genetic status) แบบ rs2257205 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน RNF43 สูญเสียบทบาทหน้าที่เมื่อมีลักษณะทางพันธุกรรมของยีนเปลี่ยนแปลง ขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของ RNF43 ลดลงจะมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับอาการทางพยาธิคลินิกต่างๆ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน RNF43 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบการแสดงออกของโปรตีน RNF43 ที่เพิ่มมากขึ้นมีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญ โดยผ่านการยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Wnt signaling การยับยั้งดังกล่าวเกิดขึ้นจากการลดระดับของโปรตีน frizzled หรือ Wnt receptors การเพิ่มขึ้นของกระบวนการย่อยสลายโปรตีน β -catenin และนำมาสู่การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1 ที่มีบทบาทหน้าที่ในการส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์และถูกควบคุมการแสดงออกด้วยกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Wnt signaling จากผลการศึกษาทั้งหมดของงานวิจัยครั้งนี้ สรุปได้ว่า RNF43 มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี และการตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของยีนนี้ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี น่าจะเป็นประโยชน์ในการเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

Abstract

Ring finger protein 43 (RNF43) is an E3 ubiquitin-protein ligase that negatively regulates Wnt signaling pathway by selectively ubiquitinating frizzled receptors at the plasma membrane and promotes its endocytosis and lysosome degradation. RNF43 is proposed as a tumor suppressor gene and is frequently mutated in several types of malignancy including cholangiocarcinoma (CCA). It has also been demonstrated that RNF43 mutation is associated with absent in protein expression of RNF43 in CCA. In addition, CCA patients with low or absent in protein expression of RNF43 had bad prognosis. In this study, we determined messenger RNA expression RNF43 in CCA tissues and investigated the correlation between RNF43 expression and RNF43 genetic status, clinicopathological features and prognosis of CCA patients. RNF43 reduced expression in messenger RNA in CCA tissues. The low messenger RNA expression of RNF43 was significantly correlated with RNF43 polymorphism, rs2257205, confirming that genetic alteration of RNF43 in CCA are inactivating. Overall survival was worst in patients with down-regulation of RNF43 expression. However, there was no statistically significant association between RNF43 messenger RNA with any clinicopathological features. Further, the functional analysis revealed that overexpression of RNF43 significantly decreased cell proliferation in CCA cell lines, which were dependent in part on the inactivation of Wnt signaling pathway via reducing frizzled receptors and activating β -catenin phosphorylation to suppress Cyclin D1 expression. These results suggest that RNF43 is involved in development and progression of CCA and the identification of genetic alteration status of RNF43 may provide specific therapeutic strategies for CCA patient treatment.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	6
แหล่งที่มาของข้อมูล	6
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	7
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	8
บทที่ 4 ผลการวิจัย	9
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	26
ประวัติผู้วิจัย	33



จ
สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน RNF43 ในระดับ mRNA กับ อาการทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 28 ราย	หน้า 11
------------	---	------------



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ในระดับ mRNA ลดต่ำลงในมะเร็งท่อน้ำดี	10
ภาพที่ 2	Kspan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ลดลง และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> เพิ่มขึ้น	12
ภาพที่ 3	ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมแบบสลับของยีน <i>RNF43</i> (rs2257205 และ rs3744093) กับระดับการแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	14
ภาพที่ 4	การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี K KU-214 K KU-213 K KU-055 และ K KU-100 ถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค qPCR และ western blot	16
ภาพที่ 5	การแสดงออกของโปรตีน <i>RNF43</i> ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี หลังจากกระบวนการ transfection ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot	16
ภาพที่ 6	การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ที่เพิ่มขึ้นมีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	17
ภาพที่ 7	การแสดงออกของยีน <i>RNF43</i> ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	18
ภาพที่ 8	การแสดงออกของโปรตีน <i>RNF43</i> ที่เพิ่มขึ้นยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Wnt signaling	19

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ณ ปัจจุบัน มีเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการค้นพบยีนกลายพันธุ์ใหม่หลากหลายยีนที่เชื่อว่ามีผลต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ยีน Ring finger protein 43 หรือ *RNF43* เป็นหนึ่งในยีนกลายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่งถูกค้นพบ โดยเทคนิค whole exome re-capture sequencing โดยพบมีการกลายพันธุ์ประมาณ 9 % ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การกลายพันธุ์ของยีนนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (Ong et al., 2012) เช่นเดียวกับรายงานการกลายพันธุ์ของยีนนี้ในมะเร็งอีกหลายชนิดได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Chan-On et al., 2013) มะเร็งตับอ่อน (Sakamoto et al., 2015 and Wu et al., 2011) มะเร็งรังไข่ (Ryland et al., 2013) มะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งมดลูก (Giannakis et al., 2014) เป็นต้น การศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ยังพบอีกว่าการกลายพันธุ์ของยีนนี้ส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วย และยังพบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *RNF43* ในระดับต่ำหรือไม่มีการแสดงออกเลยจะสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลงเช่นกัน (Talabnin et al., 2016) ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* น่าจะเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดหรือพัฒนามะเร็งท่อน้ำดี ณ ปัจจุบันมีหลายการศึกษาพบว่ายีน *RNF43* มีคุณสมบัติเป็น RING-type E3 ubiquitin ligase เป็นยีนที่มีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของ การสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ที่เรียกวิธีนี้ว่า Wnt signaling โดย *RNF43* จะทำหน้าที่ควบคุมปริมาณตัวรับสัญญาณ (Wnt receptors หรือ frizzled receptors) โดยเร่งให้มีการย่อยสลายตัวรับดังกล่าวเพื่อลดการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ และชักนำให้การแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการเคลื่อนที่ของเซลล์ ลดลงตามลำดับ (Koo et al., 2012) จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดนี้บ่งชี้ให้เห็นความสำคัญของยีน *RNF43* ที่น่าจะมียบทบาทในกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ messenger RNA (mRNA) ของยีน *RNF43* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนระดับนี้กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน อาการทางคลินิกและระยะรอดชีพ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้พยากรณ์ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีหรือพยากรณ์การดำเนินของโรคต่อไป และการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังได้ทำการศึกษายบทบาทหน้าที่ของยีนนี้ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในมะเร็งท่อน้ำดี และองค์ความรู้ที่ได้น่าจะนำไปสู่การอธิบายความผิดปกติของยีนนี้กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี
2. เพื่อศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของยีน *RNF43* ต่อการเกิดและการเจริญพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาทางชีวเคมีในระดับโมเลกุลดังนี้

1. ศึกษาการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis (qPCR)
2. ศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และกลไกการทำงาน และการควบคุมของยีน *RNF43* เป็นต้น โดยรูปแบบการศึกษาคือการทดลองในหลอดทดลอง และอาศัยเทคนิคการชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เรียกว่า Mammalian overexpression model

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่ได้หลังจากเสร็จสิ้นโครงการงานวิจัยนี้คือ การแสดงออกในระดับ messenger RNA ของยีน Ring finger protein 43 (*RNF43*) ที่ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี มีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและลักษณะทางพันธุกรรมแบบ rs2257205 จากข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกว่า การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนหรือลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อน่าจะนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีนี้ ผลการศึกษานี้ยังพบยีน *RNF43* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่าน Wnt signaling ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้นี้นำไปสู่การอธิบายกลไกการเกิดและพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี และอาจนำไปสู่แนวทางการรักษาที่จำเพาะต่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีหรือไม่มีกลายพันธุ์ของยีน *RNF43*

ในด้านการเผยแพร่ความรู้ ผลการศึกษาของงานวิจัยครั้งนี้ยังได้ถูกนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 3 ครั้ง และได้ลงตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติจำนวน 1 ฉบับ ดังต่อไปนี้ (รายละเอียดตามเอกสารใน ภาคผนวก ก)

- 1) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 2 ครั้ง ในรูปแบบของโปสเตอร์ (poster presentation) ได้แก่
 - งานประชุมวิชาการนานาชาติ 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) ซึ่งจัดขึ้นในระหว่างวันที่ 4-9 กรกฎาคม 2558 ณ เมือง เบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี โดยนำเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อเรื่อง Reduced expression of RNF43 is associated with the presence of somatic mutation and poor prognosis of cholangiocarcinoma patients

- งานประชุมวิชาการนานาชาติ “ 24th Asia Pacific Cancer Conference in conjunction with the 43rd Annual Meeting of Korean Cancer Association” ซึ่งจัดขึ้นในระหว่างวันที่ระหว่างวันที่ 22-24 มิถุนายน 2560 ณ เมือง Seoul ประเทศเกาหลีใต้ โดยนำเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อเรื่อง Ring finger protein 43 expression is associated with poor prognosis and reduced cell growth of cholangiocarcinoma via Wnt signaling.
- 2) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 1 ครั้ง ในรูปแบบของการนำเสนอปากเปล่า (oral presentation) ได้แก่
- งานประชุมวิชาการนานาชาติ Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for Cancer Research ซึ่งจัดขึ้นในระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2558 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำเสนอในชื่อ Reduced expression of Ring finger protein 43 indicates a poor prognosis of cholangiocarcinoma
- 3) ผลงานการตีพิมพ์ จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่
- Talabnin, C., Janthavon, P., Thongsom, S., Suginta, W., Talabnin, K., and Wongkham, S. (2016). Ring finger protein 43 expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathology*, 52, 47–54. doi.org/10.1016/j.humpath.2015.12.027 (IF2016 = 3.014)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดี เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบมีอุบัติการณ์สูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มะเร็งชนิดนี้เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณท่อน้ำดีทางเดินน้ำดีทั้งภายในและภายนอกตับ จากข้อมูลทางระบาดวิทยาและการทดลองในสัตว์ทดลอง พบการเกิดมะเร็งชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรังบริเวณท่อน้ำดี ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ด้วยความสัมพันธ์ดังกล่าวองค์การอนามัยโลกหรือ World Health Organization ได้จัดให้พยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* หรือ OV เป็นสารก่อมะเร็งประเภทที่ 1 (group 1 carcinogen) (Sripa et al., 2007)

มะเร็งท่อน้ำดีถือเป็นภัยเงียบเนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจพบว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในระยะท้ายของโรคและ/หรือมีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ จึงทำให้มีการตอบสนองน้อยต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี การผ่าตัดจึงถือเป็นการรักษาที่ดีที่สุดแต่จะให้ผลการรักษาที่ดีในกรณีของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่พบมะเร็งในระยะเริ่มต้นเท่านั้น ขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะท้ายหรือมีการรุกรานของมะเร็งแล้ว การผ่าตัดถือเป็นเพียงการรักษาเพื่อบรรเทาอาการเท่านั้น (Sripa et al., 2007, Bhudhisawasdi et al., 2012)

การกลายพันธุ์ของยีนถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งและการพัฒนาของมะเร็ง นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีนยังเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการวินิจฉัยมะเร็งชนิดนั้นๆและใช้เป็นแนวทางในการรักษาที่จำเพาะด้วยเช่นกัน ปัจจุบันมีรายงานยีนก่อมะเร็งหลายยีนที่มีการกลายพันธุ์และมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ประกอบไปด้วยยีนก่อมะเร็งที่เป็นที่รู้จักทั่วไป เช่น ยีน *TP53* *Kras* และ *SMAD4* และยีนก่อมะเร็งกลุ่มที่เพิ่งค้นพบใหม่เช่น *MLL3*, *RNF43*, *GNAS* และ *PEG3* การกลายพันธุ์ของยีนก่อมะเร็งดังกล่าวได้มีการศึกษาพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ผิดปกติไป แต่อย่างไรก็ตามบทบาทหน้าที่ของยีนก่อมะเร็งในกลุ่มค้นพบใหม่นั้น ยังคงต้องการการศึกษาเชิงลึกถึงหน้าที่ในการส่งเสริมการเกิดและการพัฒนาของมะเร็งต่อไป (Ong et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนกลายพันธุ์ในกลุ่มค้นพบใหม่ เช่น *RNF43*, และ *PEG3* เป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต โดยผ่านกระบวนการส่งสัญญาณที่เรียกว่า Wnt signaling ซึ่งจากผลการศึกษาศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีน *RNF43* มีคุณสมบัติเป็น RING-type E3 ubiquitin ligase เป็นยีนที่มีหน้าที่ในการควบคุมปริมาณตัวรับสัญญาณ (Wnt receptors หรือ frizzled receptors) ใน Wnt signaling โดยโปรตีน *RNF43* จะทำหน้าที่เร่งให้มีการย่อยสลายตัวรับดังกล่าวเพื่อลดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ และชักนำให้การแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์หรือการเคลื่อนที่ของเซลล์ลดลงเพื่อเข้าสู่ภาวะปกติ (Koo et al., 2012)

ยีน Ring finger protein 43 หรือ *RNF43* เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 17q22 เป็นโปรตีนประกอบด้วย 783 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุล 85 kDa โปรตีน *RNF43* นี้มีคุณสมบัติเป็น RING-type E3 ubiquitin ligase ที่ทำหน้าที่ในการรับ ubiquitin จาก E2 ubiquitin-conjugating enzyme เพื่อเชื่อมกับ

โปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะและชักนำให้เกิดกระบวนการสลายโปรตีนนั้นต่อไป ในการศึกษาเริ่มแรกพบโปรตีน RNF43 ในเซลล์ต้นกำเนิด LGR5 positive cells โดยโปรตีน RNF43 ทำหน้าที่ในการควบคุมการส่งสัญญาณของ Wnt signaling ผ่านการชักนำตัวรับสัญญาณ (Wnt receptors หรือ frizzled receptors) ของ Wnt signaling ให้เข้าสู่กระบวนการย่อยสลายโปรตีนเพื่อลดระดับการส่งสัญญาณในกระบวนการดังกล่าว (Koo et al., 2012) ขณะที่การศึกษาของ Loregger และคณะพบโปรตีน RNF43 มีการแสดงออกที่ขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียสในเซลล์ลำไส้ ร่วมกับโปรตีน T cell factor 4 หรือ TCF4 ซึ่งมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย Wnt signaling จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีน RNF43 ทำหน้าที่ควบคุมการส่งสัญญาณของ Wnt signaling ไม่ได้ทำหน้าที่ควบคุมเฉพาะปริมาณตัวรับสัญญาณเท่านั้น ยังมีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่เกิดจากกระตุ้นด้วย Wnt signaling (Loregger et al., 2015) ณ ปัจจุบันมีหลายการศึกษาพบยีน *RNF43* มีอัตราการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูงในมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งท่อน้ำดี และมะเร็งลำไส้ใหญ่ และรวมไปถึงการแสดงออกของยีนนี้ที่ลดลงในมะเร็งหลายชนิดเช่นกัน ได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งสมอง ซึ่งความผิดปกติของยีน *RNF43* ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Ong et al., 2012, Talabnin et al., 2011, Giannakis et al., 2014) จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ายีน *RNF43* น่าจะเป็นยีนก่อมะเร็งที่สำคัญในการกระบวนการเกิดและพัฒนาของมะเร็ง ดังนั้นการศึกษายทบาทหน้าที่ของยีน *RNF43* นี้ในสภาวะมะเร็งให้ชัดเจนเป็นสิ่งสำคัญเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในด้านการรักษาอย่างจำเพาะต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

1. ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษานี้ใช้เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีแบบแช่แข็ง โดยเนื้อเยื่อมะเร็งดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 28 ตัวอย่าง ได้มาจากคนไข้ที่เข้ารับการรักษาด้วยการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทุกรายได้ลงนามยินยอมให้นำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปใช้เพื่อการวิจัย (จริยธรรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น; HE521209 และ จริยธรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี; EC-57-25) และทุกตัวอย่างนี้ได้มีการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (Pathological examination) ยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี
- ข้อมูลทางพยาธิคลินิก (clinicopathological features) ดังแสดงในตารางที่ 1 และระยะเวลารอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (survival time) ได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแต่ละรายจะถูกบันทึกจากวันที่ได้รับการผ่าตัดจนถึงวันที่ผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคแต่ต้องมากกว่า 30 วันขึ้นไป หรือจนถึงวันที่ 27 ตุลาคม 2557 โดยระยะเวลาการติดตามระยะรอดชีพของผู้ป่วยทั้งหมดเฉลี่ยอย่างน้อย 4 ปี ค่ามัธยฐาน 10 เดือนหรืออยู่ในช่วง 1-83 เดือน

2. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *RNF43* ในมะเร็งท่อน้ำดี

เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีแบบแช่แข็งที่มีลักษณะมาจากบริเวณก้อนเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ ถูกนำมาบดให้ละเอียดในสภาวะความเย็นภายใต้ไนโตรเจนเหลว เนื้อเยื่อที่ถูกบดละเอียดแล้วจะถูกนำไปสกัดอาร์เอ็นเอโดยวิธี phenol-chloroform ด้วย trizol reagent ซึ่งกระบวนการสกัดได้ปฏิบัติตามคู่มือที่แนบมากับน้ำยา เมื่อได้อาร์เอ็นเอแล้วจะนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ อาร์เอ็นเอที่ได้ถูกนำไปสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอ (complementary DNA หรือ cDNA) ก่อนด้วยชุดสังเคราะห์สำเร็จรูป Superscript VILO cDNA synthesis kit เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis (qPCR) และการคำนวณการแสดงออกของยีน *RNF43* ระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงด้วยสมการ $2^{-\Delta CT}$ และค่าการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่าถูกพิจารณาว่ามีการแสดงออกของยีน *RNF43* มากกว่าปกติ

3. การศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของยีน *RNF43* ต่อการเกิดและการเจริญพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และการชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43*

การศึกษานี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 4 เซลล์ได้แก่ K KU-055, K KU-213, K KU-214 and K KU-100 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และตู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12 Nutrient ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum (FBS), streptomycin (100 µg/mL) และ amphotericin B (50 µg/mL) นอกจากนี้เซลล์เพาะเลี้ยง HEK293T cells ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. พนิดา ชันแก้วหล้า สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี ถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* (transfection)

การชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี อาศัยสารตัวนำคือ lipofectamine 3000 ร่วมกับ *RNF43/pCMV6* construct หรือ *pCMV6 empty vector* โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในคู่มือที่แนบมา หลังครบเวลา 48 ชั่วโมงของการชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เซลล์ดังกล่าวถูกนำไปสกัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจวิเคราะห์การแสดงออกต่อไป

3.2 การวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation assay)

การตรวจวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 2.5×10^3 เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในเพลทแบบช่อง 96 ช่อง (96-well plate) เมื่อเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อัตราการแบ่งตัวของเซลล์จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี MTS assay โดยใช้สาร CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent ของบริษัท Promega (Madison, WI, USA) ระดับของสีเหลืองส้มที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเซลล์กับสาร CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร การทดสอบนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อนำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติต่อไป

3.3 การวัดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Transwell migration assay)

การตรวจวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 1×10^5 เซลล์ถูกเลี้ยงในเพลทแบบช่อง 24 ช่องโดยแต่ละช่องมีภาชนะด้านบนเลี้ยงเซลล์ซึ่งภาชนะดังกล่าวนี้มีช่องขนาด 8.0 µm เพื่อให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่รอดออกจากช่องด้านบนลงสู่ช่องด้านล่างที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ 600 ไมโครลิตรที่ หลังจาก 15 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนที่ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ช่องด้านบนจะถูกนำมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ โดยใช้สาลีเช็ดเอาเซลล์ที่อยู่ด้านบนภายในช่องออกก่อน ส่วนเซลล์ที่อยู่ก้นช่องด้านบนถูกทำให้คงสภาพด้วย 3.7% (v/v) formaldehyde และใช้ 100% ethanol เพื่อให้ผนังเซลล์เป็นรูเพื่อให้ติดสีย้อม crystal violet จากนั้นจำนวนเซลล์ถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดย

นับทั้งหมด 6 fields แล้วนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่ถูกต้อง การทดสอบนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อนำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติต่อไป

3.4 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน *RNF43*

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* และเซลล์ควบคุมถูกนำไปสกัด โปรตีนแบบแยกส่วนของโปรตีนในไซโตรพลาสซึมกับโปรตีนในนิวเคลียส ตัวอย่างโปรตีนตัวอย่างที่ได้ถูกนำไปวัดความเข้มข้นด้วยวิธี BCA Protein assay kit (Pierce Biotechnology) และถูกนำมาศึกษาแบบแผนของโปรตีนบน 10% SDS-PAGE และหลังจากการแยกโปรตีน โปรตีนบนแผ่นเจลถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ต่อด้วยการแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 5% (w/v) skimmed milk และ 0.05% (v/v) Tween 20 (0.05% PBST) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อป้องกันปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ หลังเวลา 1 ชั่วโมงนำแผ่น nitrocellulose membrane ดังกล่าวมาแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) skimmed milk และ 0.05% PBST ที่มีแอนติบอดีต่อโปรตีนเป้าหมาย ได้แก่ Rabbit polyclonal Phospho- β -catenin, β -Catenin, Frizzled, และ Cyclin D1 antibody และ Mouse monoclonal β -Actin และ Histone H1 antibody เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose membrane ถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์และแช่ต่อใน horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies ได้แก่ horse anti-mouse (Vector Laboratories, Burlingame, CA) หรือ goat anti-rabbit IgG (GenScript) โดยจะเจือจางในอัตราส่วน 1: 5,000 ด้วย 0.05% PBST ที่มี 1% (w/v) skimmed milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 0.5% PBST จากนั้นตรวจสอบแถบโปรตีนด้วย ECL chemiluminescence kit และผลการแสดงออกของโปรตีนจะปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอ็กซเรย์ (x-ray film)

4. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

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

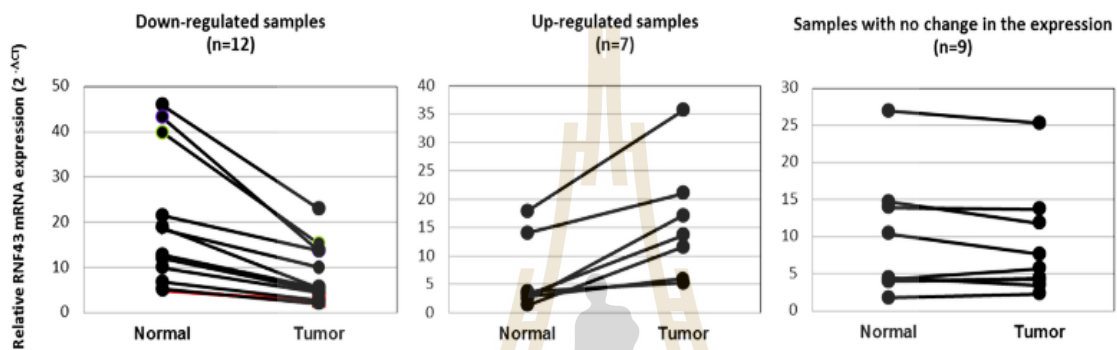
อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ แต่ละการทดสอบจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งจากนั้นจะทำการเปรียบเทียบโดย student-t-test ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 16.0 ซึ่งหากให้ผลการศึกษามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะต้องให้ค่า P value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ผลการทดลองที่แสดงด้วยกราฟเส้นหรือกราฟแท่งจะถูกวิเคราะห์ด้วย GraphPad Prism 5.0. ซึ่งมาจากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จาก western blot จะนำไปหาความเข้มของแถบโปรตีนแล้วนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ค่าทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่ม treatment และ กลุ่มควบคุม

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและความสัมพันธ์ทางคลินิก

ผลการศึกษาการแสดงออกในระดับ messenger RNA (mRNA) ของยีน *RNF43* ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อเยื่อแช่แข็งจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 28 ราย ด้วยเทคนิค qPCR พบค่ามัธยฐานการแสดงออกของยีน *RNF43* จากเนื้อเยื่อมะเร็ง 28 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 6.88 ในช่วงระหว่าง 2.11-35.62 ซึ่งมีค่าการแสดงออกที่ลดลงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงของยีนนี้ในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงของผู้ป่วยในกลุ่มนี้เอง คือมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 10.20 อยู่ในระหว่าง 1.30 – 45.88 แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างดังกล่าวของการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อข้างเคียงไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุอาจจะเกิดจากทางผู้วิจัยทำการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้ก้อนเนื้อทั้งก้อน ไม่ได้ทำการสกัดแยกเอาเฉพาะเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีออกมา ดังนั้นผลการวิเคราะห์อาจมีความคลาดเคลื่อนจากกระบวนการดังกล่าวนี้ ต่อมาทางผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ด้วยการนำค่าการแสดงออกในระดับ mRNA ของเนื้อเยื่อมะเร็งเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงของผู้ป่วยคนเดียวกัน พบผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 12 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 43 ของผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษาคั้งนี้มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งลดลง ขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 7 รายมีการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งเพิ่มขึ้น และอีกจำนวน 9 รายไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อข้างเคียงดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากนี้ทางผู้วิจัยนำการแสดงออกดังกล่าวไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก และระยะรอดชีพ พบผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพที่สั้นลง เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 2 แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกดังกล่าวกับปัจจัยอาการทางคลินิกเช่น เพศ อายุ ลักษณะทางจุลกายวิภาค ระยะของโรค การแพร่กระจายของโรคผ่านระบบน้ำเหลืองและเลือด ดังแสดงในตารางที่ 1

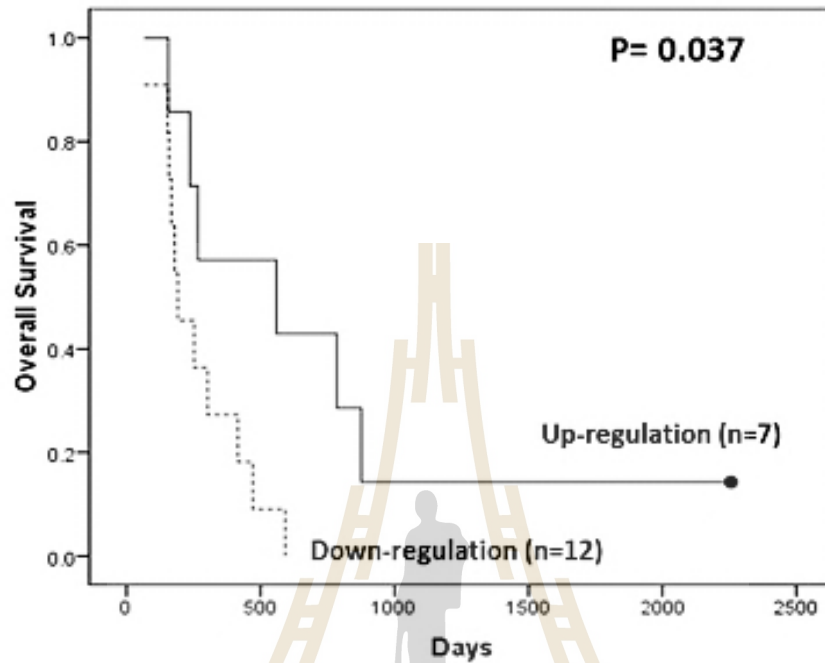


ภาพที่ 1 การแสดงออกของยีน *RNF43* ในระดับ mRNA ลดต่ำลงในมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกของยีน *RNF43* ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค qPCR โดยใช้ยีน β -actin เป็นยีนอ้างอิง ระดับการแสดงออกของยีน *RNF43* จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 28 ราย ถูกจัดเป็น 3 กลุ่มตามจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่พิจารณาจากการเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงของผู้ป่วยในรายเดียวกัน

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน RNF43 ในระดับ mRNA กับ อาการทางคลินิกของ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 28 ราย

ตัวแปร	การแสดงออกของยีน RNF43 ในระดับ mRNA			P value*
	ลดลง	เพิ่มขึ้น	ไม่เปลี่ยนแปลง	
	(Down-regulated) (n = 12)	(Up-regulated) (n = 7)	(No change) (n = 9)	
อายุ (ปี)				
< 56	2	2	1	0.657
≥ 56	10	5	8	
เพศ				
ชาย	9	3	3	0.134
หญิง	3	4	6	
ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histology type)				
Papillary type	2	3	3	0.442
Nonpapillary type	10	4	6	
ระยะโรค (Stage)				
I - III	4	4	4	0.595
IV	8	3	5	
การแพร่กระจายทางระบบน้ำเหลือง (Lymphatic invasion)				
มี	6	2	2	0.380
ไม่มี	6	5	7	
การแพร่กระจายทางระบบเลือด (Vascular invasion)				
มี	3	4	3	0.364
ไม่มี	9	3	6	

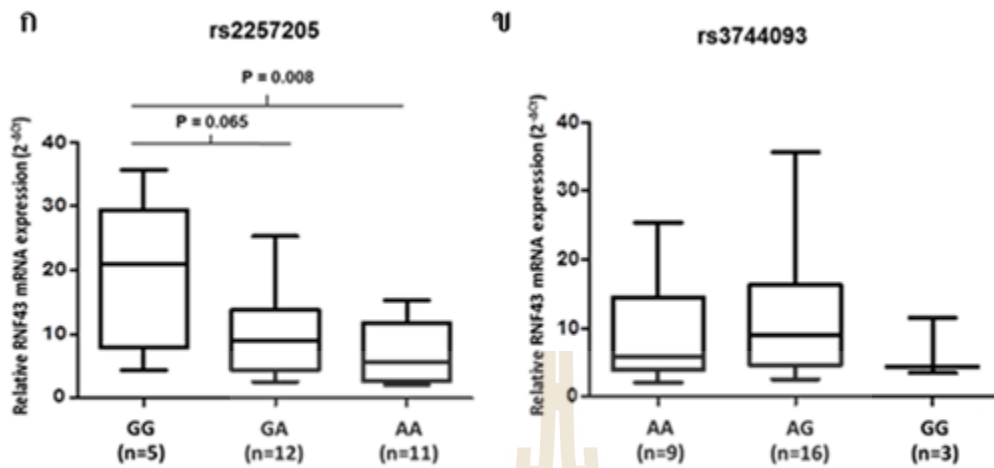
* P value ≤ 0.05 แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 2 Kaplan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* ลดลง และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* เพิ่มขึ้น

2. การแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *RNF43*

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *RNF43* ในระดับโปรตีนกับสถานะการกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งแสดงให้เห็นบทบาทหน้าที่ของยีน *RNF43* ในมะเร็งท่อน้ำดีนั้นมีความสำคัญกับการเกิดและพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี และในการศึกษาก่อนหน้านี้ทางผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีนอกจากมีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *RNF43* แบบการกลายพันธุ์ของยีนแล้ว ยังตรวจพบผู้ป่วยมีลักษณะทางพันธุกรรมแบบที่เรียกว่าสแน็ป (Single nucleotide polymorphism หรือ SNP) ด้วย โดยลักษณะทางพันธุกรรมแบบสแน็ปคือการเปลี่ยนแปลงของหนึ่งคู่เบสในยีนนั้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้อาจจะมีมากกว่าหนึ่งตำแหน่งก็ได้ในยีนเดียวกัน โดยการเปลี่ยนแปลงจะเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรส่วนใหญ่ ดังนั้นในมะเร็งท่อน้ำดี ทางผู้วิจัยได้ตรวจวิเคราะห์พบจำนวน 2 ตำแหน่งในยีน *RNF43* ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีคือ Rs3744093 (A>G) และ Rs2257205 (G>A) ดังนั้นทางผู้วิจัยได้นำข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมแบบสแน็ปดังกล่าวมาศึกษาวิเคราะห์กับการแสดงออกของยีน *RNF43* ในระดับ mRNA เนื่องจากลักษณะพันธุกรรมดังกล่าวมีรายงานว่า มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน (Ponomarenko et al., 2001) ผลการศึกษาพบลักษณะทางพันธุกรรมแบบสแน็ปตำแหน่ง Rs2257205 มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* โดยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี Rs2257205 แบบ GG homozygous จะมีการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* สูงขึ้น 1.9 และ 2.8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Rs2257205 แบบ GA heterozygous และ AA homozygous ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ลักษณะทางพันธุกรรมแบบสแน็ปตำแหน่ง Rs3744093 ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ ดังแสดงในภาพที่ 3 จากข้อมูลทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมแบบสแน็ปในยีน *RNF43* น่าจะมีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *RNF43* แต่อาจไม่ส่งผลต่อหน้าที่การทำงานของยีนนี้



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมแบบสลับของยีน *RNF43* (rs2257205 และ rs3744093) กับระดับการแสดงออกของยีน *RNF43* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

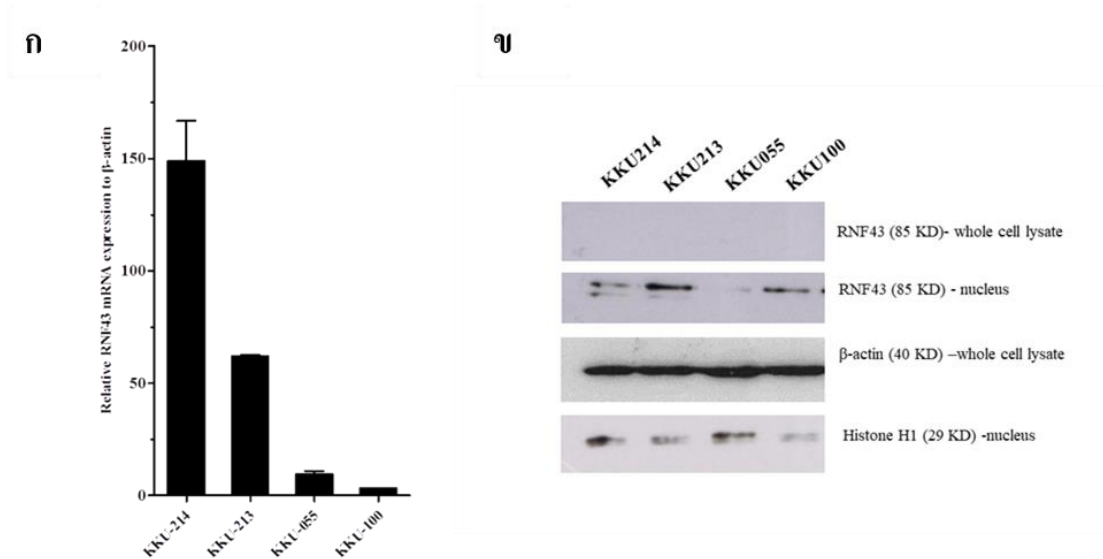
- ก. ลักษณะทางพันธุกรรมแบบสลับ rs2257205 ของยีน *RNF43* กับการแสดงออกในระดับ mRNA
- ข. ลักษณะทางพันธุกรรมแบบสลับ rs3744093 ของยีน *RNF43* กับการแสดงออกในระดับ mRNA

3. บทบาททางชีวภาพของยีน RNF43 ในมะเร็งท่อน้ำดี

3.1 การแสดงออกของยีน RNF43 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

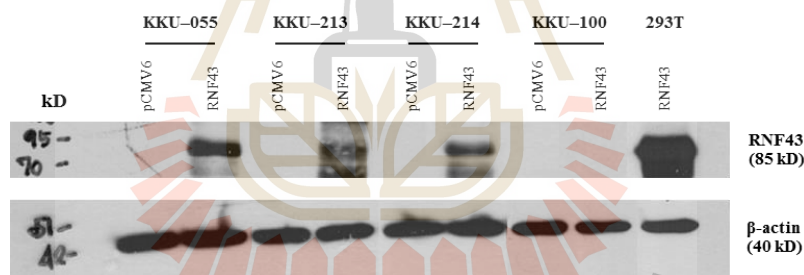
ผู้วิจัยทำการศึกษาการแสดงออกของยีน RNF43 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 4 เซลล์ ได้แก่ KKU-055 KKU-100 KKU-213 และ KKU-214 โดยเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 4 เซลล์ ถูกนำวิเคราะห์การแสดงออกในระดับ mRNA และโปรตีนด้วยเทคนิค qPCR และ western blot ตามลำดับ ผลการศึกษาพบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน RNF43 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-214 และ KKU-213 มีระดับสูง ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-055 และ เซลล์ KKU-100 มีการแสดงออกในระดับต่ำ (ภาพที่ 4ก) ซึ่งผลการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA มีความสอดคล้องกับระดับการแสดงออกในระดับโปรตีน และนอกจากนี้ทางผู้วิจัยพบว่าโปรตีน RNF43 มีการแสดงออกเป็นหลักในบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพที่ 4ข) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบการแสดงออกของโปรตีน RNF43 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่วิเคราะห์จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค immunohistochemistry (Talabnin et al.,2016)

เนื่องจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 4 เซลล์มีการแสดงออกในระดับที่ไม่สูงนัก และทางผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหน้าที่ของยีนนี้ ดังนั้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจึงถูกนำไปชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นด้วยเทคนิค mammalian overexpression model โดยนำยีน RNF43 ที่ผูกไว้กับดีเอ็นเอพาหะ (vector) และนำเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยการใช้ไลโปโซม (liposome) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำเซลล์ดังกล่าวไปศึกษาตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีน พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน RNF43 ในเซลล์ KKU-055, KKU-213 และ KKU-214 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน RNF43 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ KKU-100 ดังแสดงในภาพที่ 5 ดังนั้นจากการวิเคราะห์นี้ทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ KKU-213 และ KKU-214 เป็นตัวแทนในการศึกษาหน้าที่ของยีน RNF43 เนื่องจากความเป็นพิษ (toxicity) จากกระบวนการนำยีนเข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์ KKU-055 และ KKU-100 มีจำนวนเซลล์เหลือน้อยไม่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาต่อ และไม่ประสบความสำเร็จในการนำยีน RNF43 เข้าสู่เซลล์ KKU-100 อีกด้วย



ภาพที่ 4 การแสดงออกของยีน *RNF43* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-214 KKKU-213 KKKU-055 และ KKKU-100 ถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค qPCR และ western blot

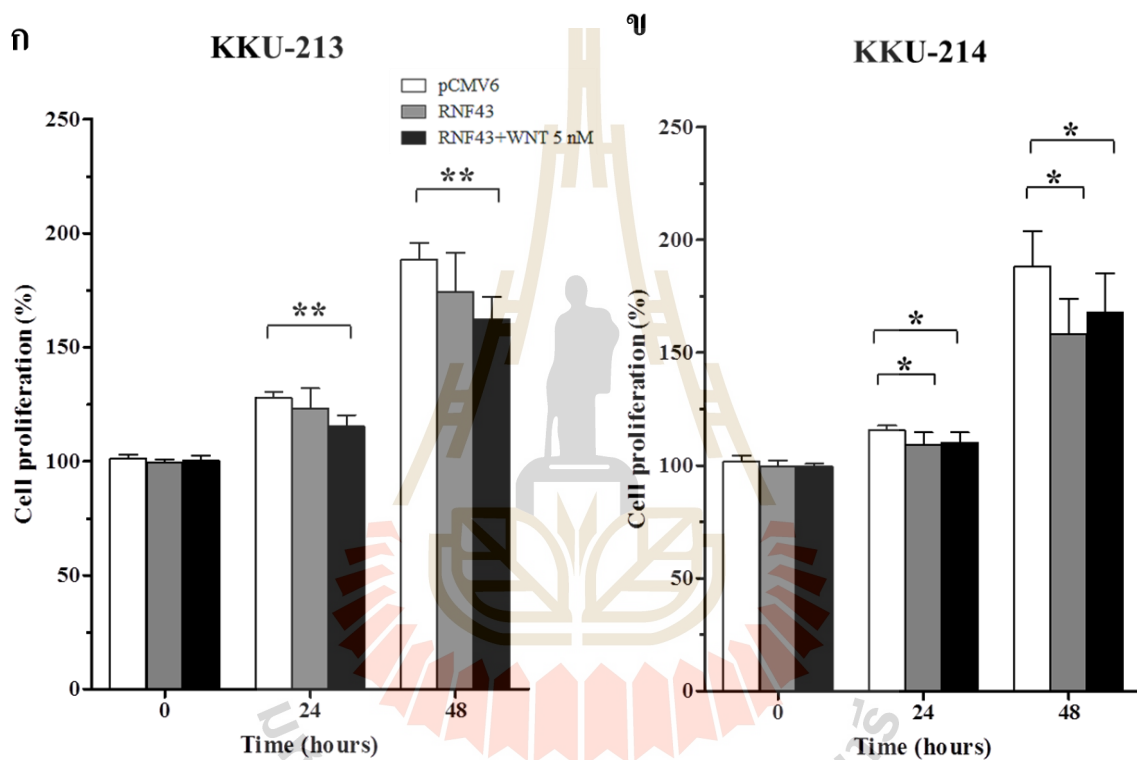
- ก. การแสดงออกของยีน *RNF43* ในระดับ mRNA
- ข. การแสดงออกของยีน *RNF43* ในระดับ Protein



ภาพที่ 5 การแสดงออกของโปรตีน *RNF43* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีหลังจากกระบวนการ transfection ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot การแสดงออกของโปรตีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (*RNF43*) ถูกเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (pCMV6) ขณะที่เซลล์ HEK293T cells ที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* ถูกนำมาใช้เพื่อเป็นผลบวกจริง

3.2 การแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นมีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของยีน *RNF43* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้น มีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และในสภาวะที่เร่งกระตุ้นกระบวนการส่งสัญญาณ Wnt signaling ด้วยลิแกนด์ Wnt3a พบการเจริญเติบโตของเซลล์เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ที่มีการชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยลิแกนด์ Wnt3a (ภาพที่ 6) แต่ผลการทดลองดังกล่าวไม่พบการเปลี่ยนในเซลล์ KKU-214 เมื่อมีการกระตุ้นด้วยลิแกนด์ Wnt3a

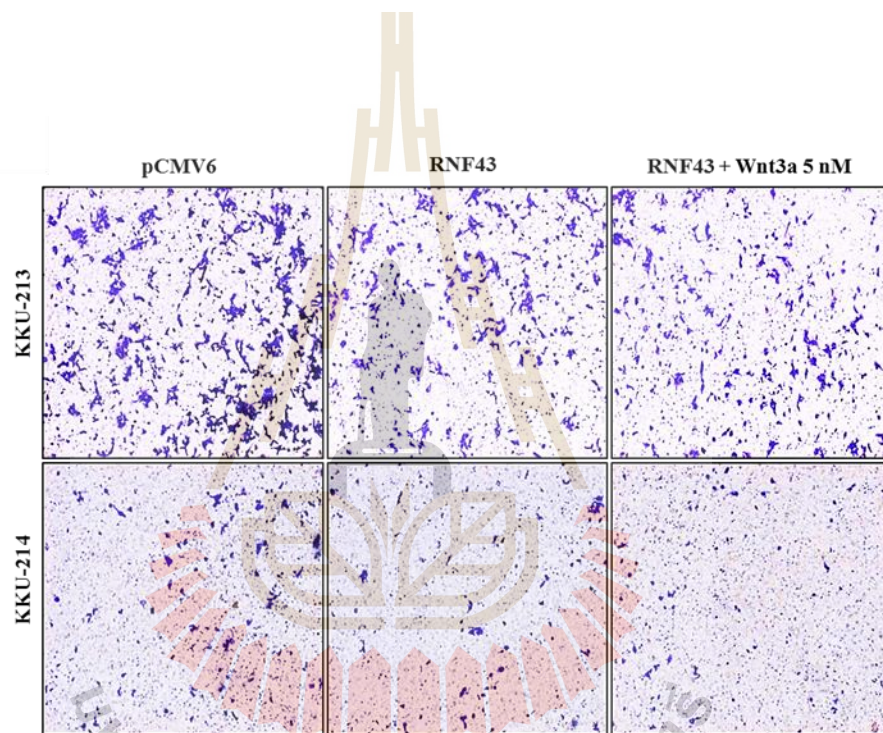


ภาพที่ 6 การแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นมีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

- ก. ค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-213 ที่มี (RNF43) และไม่มี (pCMV) การชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43*
- ข. ค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ KKU-214 ที่มี (RNF43) และไม่มี (pCMV) การชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43*

การเจริญเติบโตของเซลล์ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTS assay และลิแกนด์ Wnt3a ที่ความเข้มข้น 5 nM ถูกใช้ในการทดสอบนี้ และ * เท่ากับ $P < 0.05$ หรือ ** เท่ากับ $P < 0.001$

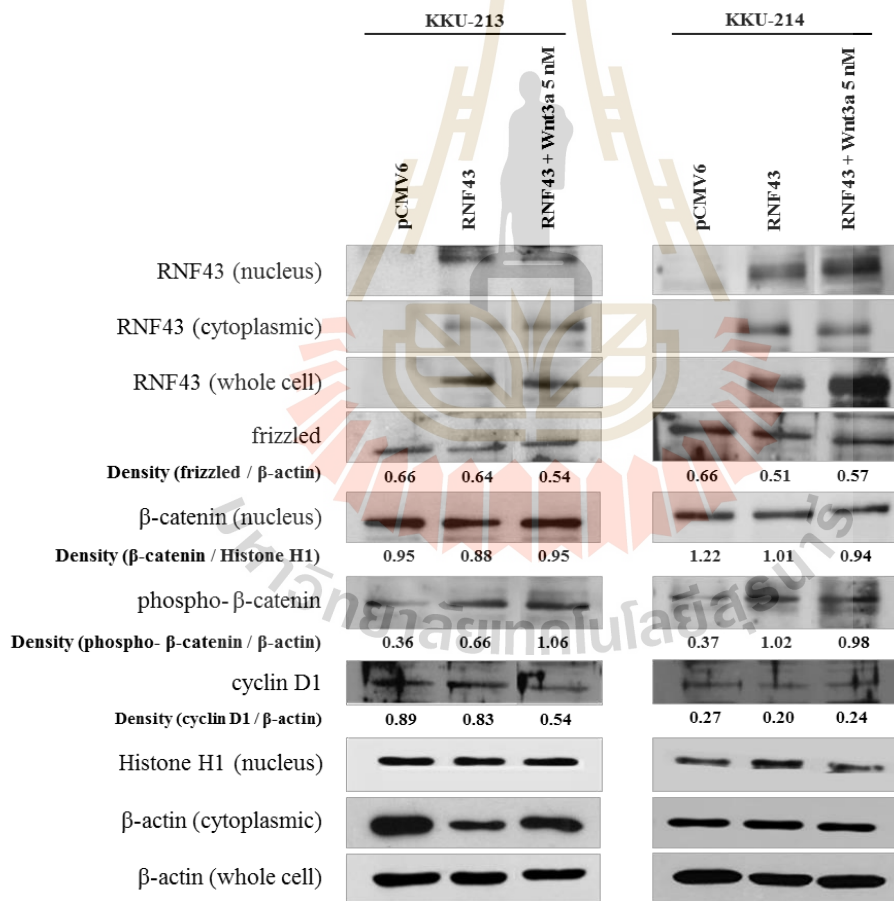
ขณะที่การศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน *RNF43* ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค Transwell migration assay ผลการทดลองพบเซลล์ KKU-213 และ KKU-214 ที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นนั้น มีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับของเซลล์ควบคุมทั้งในสถานะที่มีหรือไม่มี การกระตุ้นด้วยลิแกนด์ Wnt3a (ภาพที่ 7) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* มีบทบาท ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแต่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่หรือบุกรุกของเซลล์มะเร็ง ท่อน้ำดี



ภาพที่ 7 การแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี การเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Transwell migration assay

3.3 การแสดงออกของยีน RNF43 ที่เพิ่มขึ้น มีผลการชักนำเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ลดลง ผ่านการยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Wnt signaling

จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้น มีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และจากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาพบยีน *RNF43* มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการ Wnt signaling ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับ Wnt signaling โดยเทคนิค Western blot analysis ผลการศึกษาพบการแสดงออกของโปรตีน RNF43 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ KKU-213 และ KKU-214 นั้น มีผลลดระดับการแสดงออกของโปรตีน frizzled หรือ Wnt receptors แต่พบการเพิ่มขึ้นของกระบวนการชักนำการย่อยสลายโปรตีน β -catenin ผ่านกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ซึ่งนำมาสู่การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1 ที่มีบทบาทหน้าทีในการส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นจากผลการศึกษาการเปลี่ยนระดับโปรตีนดังกล่าวข้างต้นน่าจะสามารถอธิบายกลไกการทำงานของยีน *RNF43* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การแสดงออกของโปรตีน RNF43 ที่เพิ่มขึ้นยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Wnt signaling

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. วิเคราะห์ผลการวิจัย

โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น RING finger ubiquitin-protein ligases นั้นมีอยู่จำนวนมากภายในเซลล์ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะ ก่อนจะถูกนำส่งไปทำลายผ่านระบบ ubiquitin-proteasome pathway หลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีนในกลุ่มนี้มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการต่างๆภายในเซลล์เช่น การแบ่งตัวของเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้น (Lipkowitz and Weissman, 2011) โปรตีน Ring finger protein 43 หรือ *RNF43* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน RING finger ubiquitin-protein ligases ซึ่งมีหลักฐานข้อมูลจากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง เนื่องจากพบการกลายพันธุ์ในมะเร็งหลายชนิดรวมไปถึงมะเร็งท่อน้ำดีด้วย การกลายพันธุ์ของยีนนี้อาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งหรือกระตุ้นการสร้างมะเร็งนั้นขึ้นกับชนิดของมะเร็ง ในมะเร็งท่อน้ำดีพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้และน่าจะสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเกิดมะเร็งเนื่องจากพบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนนี้จะมีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Ong et al., 2012) ซึ่งข้อมูลนี้สัมพันธ์กับการศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* ไม่มีการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน ดังนั้นบทบาทหน้าที่ของยีนนี้จึงบ่งชี้ว่าในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนั้นผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ยีน *RNF43* ปกติ แต่พบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนนี้ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีเช่นกัน (Talabnin et al., 2016) กรณีนี้อาจเป็นไปได้ว่านอกจากการกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* แล้ว การควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านกระบวนการ epigenetic regulation น่าจะเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ผิดปกติในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนในระดับ messenger RNA (mRNA) ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับลักษณะทางพันธุกรรมแบบสนิป ผลการศึกษาพบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *RNF43* ลดลงในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และการศึกษาทำให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ คือผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออก ของยีน *RNF43* ที่ลดลงสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Talabnin et al., 2016) จากข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *RNF43* ในระดับ mRNA หรือโปรตีน สามารถเลือกใช้ในระดับใดระดับหนึ่งเพื่อการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้ และการแสดงออกที่ลดลงของยีน *RNF43* นี้ยังสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมแบบสนิป rs2257205 แบบ AA homozygous ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่กล่าวว่าลักษณะทางพันธุกรรมแบบสนิปมีผลกระทบต่อกระบวนการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA (transcription) และหรือในระดับโปรตีน (translation) (Ponomarenko et al., 2001)

เนื่องจากบทบาทหน้าที่ของยีน *RNF43* ถูกค้นพบว่ามีเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เรียกว่า Wnt signaling ผ่านการชักนำโปรตีน Wnt receptor หรือมีชื่อเฉพาะว่า frizzles receptor เข้าสู่กระบวนการย่อยสลายโปรตีนต่อไป ซึ่งผลของการควบคุมนี้ทำให้กระบวนการส่งสัญญาณของ Wnt signaling ลดลงภายในเซลล์ ทำให้ยีนเป้าหมายเช่น *cyclin D1* *MMP7* และ *myc* มีการแสดงออกลดลงและนำมาสู่การลดลงของการเจริญเติบโตหรือการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Shtutman et al., 1999;

Sansom et al., 2004; Crawford et al., 1999), ด้วยข้อมูลที่ว่ามาข้างต้นนี้ผู้วิจัยศึกษากระบวนการส่งสัญญาณ Wnt signaling ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน *RNF43* พบมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นโดยบริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม แต่พบเป็นส่วนใหญ่บริเวณนิวเคลียส ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยที่ทำการศึกษากการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพบการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่บริเวณนิวเคลียสเช่นกัน และเมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของยีน *RNF43* เพิ่มขึ้นไปศึกษาการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนหรือการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 และ KKU-214 ที่ถูกชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* มีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และการเจริญเติบโตลดลงอีกเมื่อกระตุ้นด้วยลิแกนด์ Wnt3a โดยเฉพาะเซลล์ KKU-213 ขณะที่เซลล์ KKU-214 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อกระตุ้นด้วย Wnt3a สาเหตุอาจเกิดจาก Wnt receptors ที่จำเพาะกับลิแกนด์ Wnt3a อาจมีจำนวนน้อยบนผิวเซลล์ KKU-214 หรือกระบวนการ wnt signaling ภายในเซลล์ KKU-214 อาจจะถูกกระตุ้นด้วยลิแกนด์ตัวอื่น ดังเช่นในรายงานของ ลอยลมและคณะ พบการแสดงออกสูงของลิแกนด์ Wnt5a Wnt7b และ Wnt7c ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (Yothisong et al., 2014) ขณะที่การชักนำการแสดงออกของยีน *RNF43* เพิ่มขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีนั้น ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในมะเร็งกระเพาะอาหาร (Niu et al., 2015) เนื่องจากการแสดงออกของยีน *RNF43* มีผลต่อการเจริญเติบโตการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ผู้วิจัยได้ศึกษาต่อพบว่าการแสดงออกของยีน *RNF43* ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการลดลงของกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Wnt signaling ผ่านการลดลงของ Wnt receptors และเพิ่มกระบวนการทำลาย β -catenin ด้วยกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย *cyclin D1* ที่ลดลงภายในนิวเคลียส และส่งผลให้เกิดการลดลงของการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษานี้ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในมะเร็งตับอ่อน (Jiang et al., 2013) จากผลการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน *RNF43* ดังแสดงข้างต้นแสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* มีกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยการควบคุมระดับของ Wnt receptors เพื่อยับยั้ง Wnt signaling ซึ่งกลไกดังกล่าวน่าจะสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *RNF43* ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีหรือในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีพบว่ายีน *RNF43* มีการแสดงออกที่นิวเคลียสด้วยเช่นกัน โดยการศึกษาของ Loregger และคณะพบโปรตีน RNF43 ที่มีการแสดงออกในนิวเคลียสนั้นมีบทบาทในการยับยั้ง Wnt signaling เช่นเดียวกัน โดยโปรตีน RNF43 ในนิวเคลียสเข้าจับ T cell factor 4 (TCF4) และเกิดการชักนำ TCF4 เคลื่อนไปบริเวณขอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส โดยเป็นผลทำให้ไม่สามารถเกิด nuclear β -catenin – TCF4 complex ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนใน β -catenin-TCF4 target genes ได้ (Loregger et al., 2015) จากศึกษาของ Loregger และคณะแสดงให้เห็นว่าโปรตีน RNF43 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อาจจะทำหน้าที่ยับยั้ง Wnt signaling ด้วยกลไกนี้ด้วย ดังนั้นทางผู้วิจัยได้มีการวางแผนการศึกษาบทบาทของ nuclear RNF43 ต่อไป และจากผลการศึกษาทั้งหมดที่แสดงในงานวิจัยครั้งนี้ทางผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่ายีน *RNF43* น่าจะมีบทบาทในด้าน tumor suppressor gene ในมะเร็งท่อน้ำดี

2. สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ของผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน ring finger protein 43 ในระดับ mRNA ลดลงในมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับลักษณะพันธุกรรมแบบสลับ ไม่ใช่เฉพาะการกลายพันธุ์ของยีนเท่านั้น การแสดงออกที่ลดลงของยีน *RNF43* สัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์นี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ติดตามพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ในมะเร็งท่อน้ำดียีน *RNF43* มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่าน Wnt signaling ซึ่งยีน *RNF43* จึงมีคุณสมบัติที่เรียกว่า tumor suppressor gene ดังนั้นจากผลงานวิจัยครั้งนี้ให้ข้อเสนอแนะว่าสถานะความผิดปกติของยีน *RNF43* ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีน่าจะช่วยในการเลือกแนวทางการรักษาที่จำเพาะแก่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้ และอาจนำไปสู่การนำยีนนี้ไปเป็นยีนเป้าหมายในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป



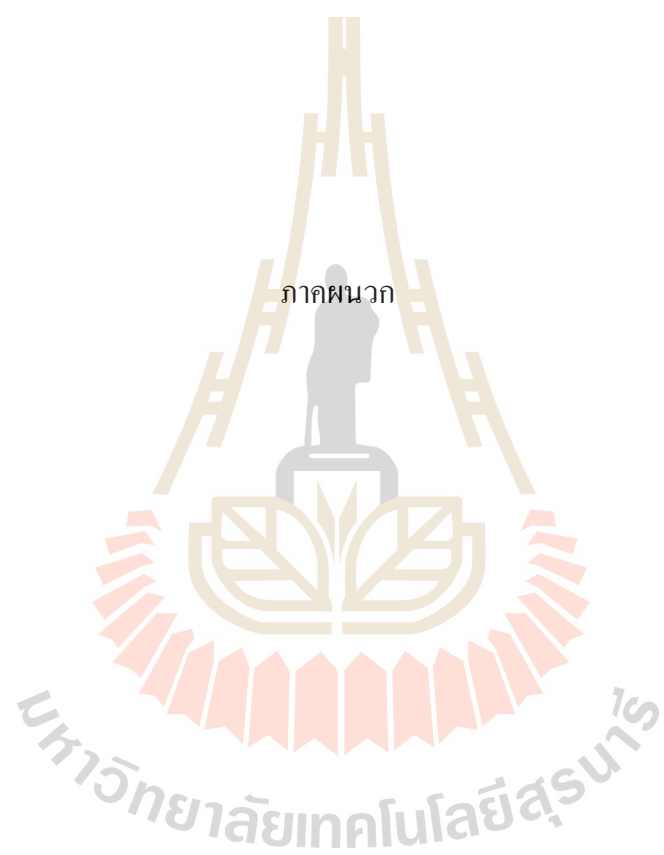
บรรณานุกรม

1. Chow, P., Cheow, P. C., Lee, S. Y., Choo, S. P., Tan, I. B., Duda, D., Nastase, A., Myint, S. S., Wong, B. H., Gan, A., Rajasegaran, V., Ng, C. C., Nagarajan, S., Jusakul, A., Zhang, S., Vohra, P., Yu, W., Huang, D., Sithithaworn, P., Yongvanit, P., Wongkham, S., Khuntikeo, N., Bhudhisawasdi, V., Popescu, I., Rozen, S. G., Tan, P., and Teh, B. T. (2013). Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. **Nature Genetics**. 45(12): 1474-1478.
2. Chan-On, W., Nairismagi, M. L., Ong, C. K., Lim, W. K., Dima, S., Pairojkul, C., Lim, K. H., McPherson, J. R., Cutcutache, I., Heng, H. L., Ooi, L., Chung, A.,
3. Crawford, H. C., Fingleton, B. M., Rudolph-Owen, L. A., Goss, K. J., Rubinfeld, B., Polakis, P., and Matrisian, L. M. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. **Oncogene**. 18(18): 2883-2891.
4. Giannakis, M., Hodis, E., Jasmine Mu, X., Yamauchi, M., Rosenbluh, J., Cibulskis, K., Saksena, G., Lawrence, M. S., Qian, Z. R., Nishihara, R., Van Allen, E. M., Hahn, W. C., Gabriel, S. B., Lander, E. S., Getz, G., Ogino, S., Fuchs, C. S., and Garraway, L. A. (2014). RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. **Nature Genetics**. 46(12): 1264-1266.
5. Jiang, X., Charlat, O., Zamponi, R., Yang, Y., and Cong, F. (2015). Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. **Molecular Cell**. 58(3): 522-533.
6. Koo, B. K., Spit, M., Jordens, I., Low, T. Y., Stange, D. E., van de Wetering, M., van Es, J. H., Mohammed, S., Heck, A. J., Maurice, M. M., and Clevers, H. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. **Nature**. 488(7413): 665-669.
7. Lipkowitz, S., and Weissman, A. M. (2011). RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. **Nature Reviews Cancer**. 11(9): 629-643.
8. Niu, L., Qin, H. Z., Xi, H. Q., Wei, B., Xia, S. Y., and Chen, L. (2015). RNF43 Inhibits Cancer Cell Proliferation and Could be a Potential Prognostic Factor for Human Gastric Carcinoma. **Cellular Physiology and Biochemistry**. 36(5): 1835-1846.

9. Olnes, M. J., and Erlich, R. (2004). A review and update on cholangiocarcinoma. **Oncology**. 66(3): 167-179.
10. Ong, C. K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J. R., Allen, G. E., Ng, C. C., Wong, B. H., Myint, S. S., Rajasegaran, V., Heng, H. L., Gan, A., Zang, Z. J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M. H., Huang, D., Ong, P., Chan-on, W., Cao, Y., Qian, C. N., Lim, K. H., Ooi, A., Dykema, K., Furge, K., Kukongviriyapan, V., Sripa, B., Wongkham, C., Yongvanit, P., Futreal, P. A., Bhudhisawasdi, V., Rozen, S., Tan, P., and Teh, B. T. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. **Nature Genetics**. 44(6): 690-693.
11. Ponomarenko, JV., Merkulova, TI., Vasiliev, GV., Levashova, ZB., Orlova, GV., Lavryushev, SV., Fokin, ON., Ponomarenko, MP., Frolov, AS., Sarai, A. (2001). rSNP_Guide, a database system for analysis of transcription factor binding to target sequences: application to SNPs and site-directed mutations. **Nucleic Acids Res**. 2001 Jan 1;29(1):312-6.
12. Ryland, G. L., Hunter, S. M., Doyle, M. A., Rowley, S. M., Christie, M., Allan, P. E., Bowtell, D. D., Australian Ovarian Cancer Study, G., Gorringer, K. L., and Campbell, I. G. (2013). RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. **The Journal of Pathology**. 229(3): 469-476.
13. Sakamoto, H., Kuboki, Y., Hatori, T., Yamamoto, M., Sugiyama, M., Shibata, N., Shimizu, K., Shiratori, K., and Furukawa, T. (2015). Clinicopathological significance of somatic RNF43 mutation and aberrant expression of ring finger protein 43 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. **Modern Pathology**. 28(2): 261-267.
14. Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Battle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R., and Winton, D. J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. **Genes & Development**. 18(12): 1385-1390.
15. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 96(10): 5522-5527.
16. Talabnin, C., Janthavon, P., Thongsom, S., Suginta, W., Talabnin, K., and Wongkham, S. (2016). Ring finger protein 43 expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Human Pathology**. 52: 47-54.

17. Wu, J., Jiao, Y., Dal Molin, M., Maitra, A., de Wilde, R. F., Wood, L. D., Eshleman, J. R., Goggins, M. G., Wolfgang, C. L., Canto, M. I., Schulick, R. D., Edil, B. H., Choti, M. A., Adsay, V., Klimstra, D. S., Offerhaus, G. J., Klein, A. P., Kopelovich, L., Carter, H., Karchin, R., Allen, P. J., Schmidt, C. M., Naito, Y., Diaz, L. A., Jr., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N., Hruban, R. H., and Vogelstein, B. (2011). Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 108(52): 21188-21193.
18. Yothaisong, S., Thanee, M., Namwat, N., Yongvanit, P., Boonmars, T., Puapairoj, A, Loilome, W. (2014). *Opisthorchis viverrini* infection activates the PI3K/ AKT/PTEN and Wnt/ β -catenin signaling pathways in a Cholangiocarcinogenesis model. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014;15(23):10463-8.





ภาคผนวก

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



Chutima Talabrin^{1*}, Patcharee Jantaworn¹, Sunisa Thongsom¹, Krajang Talabrin², Wipa Suginta¹, Sopot Wongkham²

¹Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand
²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khonkaen, 40002, Thailand
³School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Abstract

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

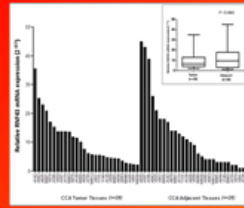


Figure 2. The RNF43 mRNA expression level is downregulated in CCA.

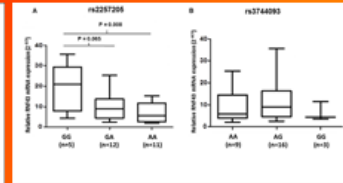


Figure 3. The association between RNF43 polymorphism and RNF43 mRNA expression levels. A: RNF43 rs2257205 influences the mRNA levels of RNF43. P = 0.008 between GA vs GG genotypes. P=0.008 between AA vs GG genotypes. B: RNF43 rs3744093 status was not shown the association with RNF43 mRNA levels.

Materials and Methods

Sequencing Analysis

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

Immunohistochemical Analysis

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

Quantitative real-time PCR analysis (qPCR)

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

Results



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

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

Variables	rs3744093		P value	rs2257205		P value
	AA genotype (n=22)	AG+GG genotype (n=28)		CC genotype (n=22)	CA+AA genotype (n=28)	
Age						
<55 years	3	8	0.03	1	6	0.028
≥55 years	19	21		9	21	
Sex						
Male	12	17	0.206	7	22	0.099
Female	7	12		6	14	
Histological type						
Papillary type	6	12	0.10	2	16	0.764
Nonpapillary type	14	12		8	25	
Stage						
pT0-1	10	12	<0.001	7	12	0.011
pT	10	12		6	18	
Lymphatic invasion						
Present	7	7	0.218	3	12	0.228
Absent	12	22		11	22	
Vascular invasion						
Present	6	8	<0.001	6	8	0.14
Absent	14	21		7	22	

Conclusion

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

Acknowledgments:

This work was co-supported by the Young Researcher Grants, Thailand Research Fund (TRG5680041) for C. Talabrin, the National Research Council of Thailand, and The National Research Project, Suranaree University of Technology. We also thank the Liver fuke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for the participation in collecting patient data and tumor samples.

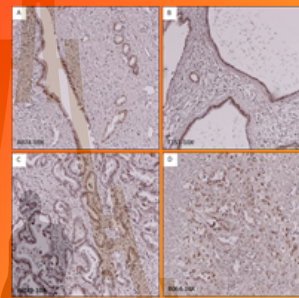


Figure 4. The nuclear immunoreactivity of RNF43 in CCA at the (A) small bile duct and (B) dilation of bile duct with hyperplasia and (C & D) tumor area of CCA (x10).

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

Variables	RNF43 expression		P value
	Negative (n=25)	Positive (n=25)	
Age			
<55 years	11	6	0.617
≥55 years	10	12	
Sex			
Male	4	6	0.077
Female	8	12	
Histological type			
Papillary type	12	8	0.218
Nonpapillary type	12	8	
Stage			
pT0-1	16	8	<0.001
pT	16	8	
Lymphatic invasion			
Present	11	12	0.228
Absent	2	6	
Vascular invasion			
Present	12	12	0.7
Absent	8	6	
RNF43 somatic mutation			
Mutant	2	6	0.077
Wild	27	12	
rs3744093			
AA	12	7	0.718
AG+GG	18	11	
rs2257205			
CC	8	6	0.081
CA+AA	22	11	

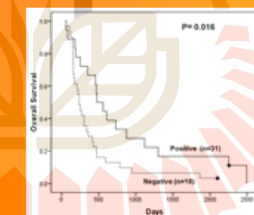


Figure 5. Cumulative overall survival was determined using Kaplan-Meier analysis for CCA patients with high expression of RNF43 (positive) had a better survival than those with a low expression of RNF43 (negative). Black circles indicate censor cases.

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

Variable	Univariate analysis ^a		Multivariate analysis ^b	
	Hazard ratio (95% CI)	P value	Hazard ratio (95% CI)	P value ^c
Age <55 years vs ≥55 years	1.12 (0.55-2.25)	0.08	1.70 (0.78-3.70)	0.12
Sex male vs female	1.12 (0.64-1.92)	0.02	1.28 (0.62-2.24)	0.01
Histological type papillary CCA vs nonpapillary CCA	1.78 (0.91-3.10)	0.01	na	
Stage T0-1 vs pT2	0.01 (0.001-0.108)	0.001	na	
Lymphatic invasion present vs absent	1.07 (0.33-3.50)	0.016	na	
Vascular invasion present vs absent	1.74 (0.92-3.29)	0.03	na	
RNF43 expression positive vs negative	0.67 (0.34-1.30)	0.016	0.202 (0.071-0.566)	0.006
RNF43 rs2257205 somatic mutation type	0.76 (0.28-2.14)	0.029	na	
RNF43 rs3744093 somatic mutation type	0.78 (0.31-2.16)	0.02	na	
RNF43 somatic mutation present vs absent	0.78 (0.28-2.14)	<0.001	0.712 (0.228-2.27)	0.004

^aUnivariate analysis, Cox proportional hazards regression.
^bMultivariate analysis, Cox proportional hazards regression.
^cHR, Hazard ratio; CI, confidence interval.
^dna, not applicable (p-value > 0.05 in univariate analysis and not included in multivariate analysis model).
^ena, Not included in model.

RING FINGER PROTEIN 43 EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH POOR PROGNOSIS AND REDUCES CELL GROWTH OF CHOLANGIOCARCINOMA VIA WNT SIGNALING



Chutima TALABNIN¹, Patcharee JANTHAVON¹, Sunisa THONGSOM¹, Wipa SUGINTA¹, Krajang TALABNIN², Sopit WONGKHAM³

¹Department of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Thailand, ²Department of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Thailand, ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand
*E-mail: chutima.sub@sut.ac.th

Abstract

Ring finger protein 43 (RNF43) is an E3 ubiquitin-protein ligase that negatively regulates Wnt signaling pathway by selectively ubiquitinating frizzled receptors at the plasma membrane and promotes its endocytosis and lysosome degradation. RNF43 is proposed as a tumor suppressor gene and is frequently mutated in several types of malignancy including cholangiocarcinoma (CCA). However, the significant of its expression and the exact molecular mechanisms of RNF43 in the CCA development and progression have not been reported. In this study, we determined RNF43 expression in CCA tissues and investigated the correlation between RNF43 expression and RNF43 polymorphism and mutation status, clinicopathological features and prognosis of CCA patients. RNF43 reduced expression in both messenger RNA and protein levels in CCA tissues. The absent protein expression of RNF43 was significantly correlated with RNF43 polymorphism (rs2257205) and somatic mutation status, confirming that all RNF43 somatic mutations in CCA are inactivating. Overall survival was worst in patients with down-regulation of RNF43 expression. Univariate and multivariate analyses revealed that RNF43 protein expression was an independent prognostic factor. However, there was no statistically significant association between RNF43 messenger RNA and protein expression with any clinicopathological features. Further, the functional analysis revealed that overexpression of RNF43 significantly decreased cell proliferation in CCA cell lines, which were dependent in part on the inactivation of Wnt signaling pathway via reducing frizzled receptors and activating β -catenin phosphorylation to suppress Cyclin D1 expression. These results suggest that RNF43 is involved in development and progression of CCA and the identification of genetic alteration status of RNF43 may provide specific therapeutic strategies for CCA patient treatment.

Materials and Methods

Expression study

Ring finger protein 43 (RNF43) expression was determined by immunohistochemistry and quantitative RT-PCR.

Biological role of RNF43 in CCA cell lines

CCA cell lines (KKU-213 and KKU-214) were cultured in Ham's F12 nutrient mixture medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 40 μ g/ml gentamicin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B (Gibco) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. To generate CCA cell lines with transient RNF43 expression, CCA cell lines were transfected with 2.5 μ g of RNF43-pCMV6 construct or pCMV6 empty vector using Lipofectamine® 3000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After 48 h, CCA cell lines were harvested, used in cell proliferation assay and measured protein expression of Wnt signaling by Western blot analysis.

Statistical analysis

The statistical analysis of the CCA data was carried out using SPSS statistical software version 16.01 (SPSS, Illinois, USA). The data obtained from functional studies on RNF43 including cell proliferation assay were expressed as the mean \pm SD and were compared using Student's *t*-tests, with a *P* value of \leq 0.05 taken as statistically significant.

Results

1) RNF43 protein expression in cholangiocarcinoma tissues by immunohistochemistry

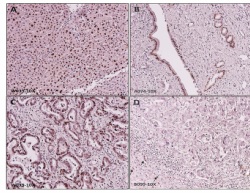


Figure 1 Immunohistochemical analysis indicates high RNF43 protein expression in nontumorous areas in the nuclei of hepatocytes (A), normal bile duct epithelium (B), and tumor area (C). CCA cells with high expression and absence of RNF43 proteins (D). Arrows indicate hepatocytes at junction area (Original magnification, \times 100).

2) RNF43 mRNA expression in cholangiocarcinoma tissues by quantitative RT-PCR

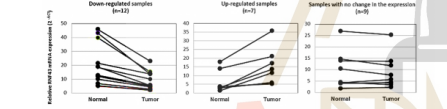


Figure 2 RNF43 mRNA expression level down regulated in cholangiocarcinoma. The expression level of RNF43 was analyzed by qPCR and normalized using *beta-actin* as reference gene. RNF43 expression of the 28 CCA cases was grouped into 3 categories based on the fold change between tumor tissues and adjacent nontumorous tissues of the same patient.

3) Association between RNF43 protein expression and clinicopathological features and survival

Table 1. Association between RNF43 protein expression and clinicopathological features (N=50)

Variables	RNF43 protein expression		P value
	Low (n=32)	High (n=18)	
Age			
< 56 years	14	6	0.470
\geq 56 years	18	12	
Sex			
Male	4	8	0.077
Female	28	12	
Histological type			
Papillary type	12	9	0.390
Non-papillary type	20	12	
Stage			
I/II	14	9	<0.001
IV	18	9	
Lymphatic invasion			
Present	24	12	0.276
Absent	8	6	
Vascular invasion			
Present	23	12	0.700
Absent	9	6	
RNF43 somatic mutation			
Missed	5	0	0.077
rs274893	27	18	
rs2257205			
AA/M	13	7	0.719
AG/M	19	11	
CG/M	9	4	0.081
GA/M and AA/M	21	14	

*P<0.05, considered statistically significant

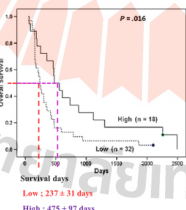


Figure 3 Down-regulation of RNF43 protein expression associated with poor patient survival.

Table 2 Univariate and multivariate analysis of factors associated with survival

Variables	Univariate analysis ^a		Multivariate analysis ^b	
	Hazard ratio	P	Hazard ratio	P ^c
Age > 56 years vs. \leq 56 years	2.143 (0.996-4.656)	0.049	1.746 (0.754-4.042)	0.193
Sex: male vs. female	1.210 (0.662-2.198)	0.530	1.206 (0.640-2.276)	0.562
Histology type: papillary vs. non-papillary	1.739 (0.945-3.196)	0.071	1.136 (0.602-2.126)	0.714
Tumor Stage: VI vs. I-III	0.951 (0.529-1.709)	0.865	0.883 (0.396-1.628)	0.742
Lymphatic invasion: present vs. absent	1.067 (0.553-2.062)	0.846	0.736 (0.339-1.608)	0.495
Vascular invasion: present vs. absent	1.248 (0.720-2.120)	0.003	1.822 (0.881-3.767)	0.106
RNF43 protein expression: low vs. high	2.142 (1.137-4.056)	0.016	1.961 (0.981-3.926)	0.057

^a Univariate analysis, Cox proportional hazards regression

^b Multivariate analysis, Cox proportional hazards regression

^c 95% CI, 95% confidence interval

— Partial likelihood ratio test

4) Association between RNF43 expression and genetic alteration status

Table 3 RNF43 somatic mutations and RNF43 protein expression in 5 CCA

CCA	Histological type	Stage	RNF43 mutation	Immunohistochemistry Result
A074	WD tubular adenocarcinoma	IVA	Missense p.T204R	Negative -
A159	Papillary carcinoma	IIIB	Nonsense p.R113X	Negative -
R104	WD tubular adenocarcinoma	III	Missense p.C119R	Negative
U044	Papillary carcinoma	IIIB	Missense p.N167S	Negative
W012	WD tubular adenocarcinoma	III	Nonsense p.Q273X	Negative -

-, Positive staining on the nuclei of epithelial cells of the normal bile duct

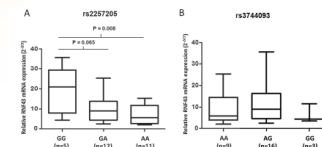


Figure 4 Association between RNF43 polymorphism and RNF43 mRNA expression levels. A, RNF43 rs2257205 influences the mRNA levels of RNF43, *P* = 0.065 between GA vs. GG genotypes. *P* < 0.008 between AA vs. GG genotypes. B, Presence of RNF43 rs3744093 was not associated with RNF43 mRNA levels.

5) The functional analysis of RNF43 in CCA cell lines

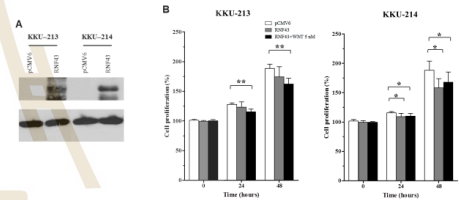


Figure 5 Overexpression of RNF43 reduces the growth of CCA cell lines. A, The exogenous RNF43 protein expression in two human CCA cell lines KKU-213 and KKU-214. B, The MTS assay was performed to measure the cell viability in KKU-213 and KKU-214 expressing RNF43 or pCMV6 empty vector at 24 and 48 h.

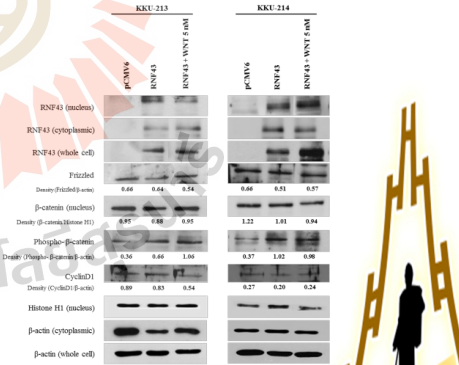


Figure 6 Overexpression of RNF43 suppresses the activation of Wnt signaling pathway

Conclusion

RNF43 in CCA has a tumor suppressive function and the identification of genetic alteration status of RNF43 may provide specific therapeutic strategies for patient treatment.

Oral presentation

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

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

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

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

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

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

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

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



Certificate of Attendance

This is to certify that

Dr. Chutima Talabnin

has attended

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

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

Professor Sopit Wongkham
Chairman, Organizing Committee

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ที่ ศธ 0514.7.2.6/ว.434

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วันที่ ๙ เมษายน 2558

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

เรียน ดร. ชุตินา ตลับนิล

สิ่งที่ส่งมาด้วย รายละเอียดการจัดประชุม

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

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

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์สุพิศ วงศ์คำ)

ประธานคณะกรรมการดำเนินงาน

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

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

E-mail: fcrlmeeting@gmail.com



ELSEVIER

Original contribution

Ring finger protein 43 expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma^{☆,☆☆}



Chutima Talabnin PhD^{a,*}, Patcharee Janthavon BSc^a, Sunisa Thongsom BSc^a,
Wipa Suginta PhD^a, Krajang Talabnin PhD^b, Sopit Wongkham PhD^c

^aSchool of Biochemistry, Institute of Science, Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^bSchool of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Received 14 October 2015; revised 23 December 2015; accepted 30 December 2015

Keywords:

Ring finger protein 43;
Intrahepatic
cholangiocarcinoma;
Somatic mutation;
Polymorphisms;
Prognosis

Summary Ring finger E3 ligases have roles in processes central to maintenance of genomic integrity and cellular homeostasis. Many ring finger E3 ligases are implicated in malignancy. Ring finger protein 43 (*RNF43*) is a ring finger E3 ligase that negatively regulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *RNF43* is frequently mutated in several types of malignancy, including intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). The significance of its expression in ICC has not, however, been reported. We determined *RNF43* expression and identified *RNF43* polymorphisms in ICC tissues. We also investigated the correlation between *RNF43* expression and *RNF43* mutation status, *RNF43* polymorphisms, clinicopathological features, and prognosis of ICC patients. *RNF43* reduced expression in ICC, and the reduction of *RNF43* messenger RNA expression was significantly correlated with the presence of rs2257205 and *RNF43* somatic mutations, confirming that all *RNF43* somatic mutations in ICC are inactivating. Overall survival was worst in patients with down-regulation of *RNF43*. Univariate and multivariate analyses revealed that *RNF43* expression was an independent prognostic factor. There was no statistically significant association between *RNF43* messenger RNA and protein expression nor any clinicopathological features or *RNF43* polymorphisms. The results imply that *RNF43* is down-regulated in ICC and may play a crucial role during development of ICC.
© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

[☆] Competing interests: None.

^{☆☆} Funding/Support: This work was cosupported by the Young Research Grants, Thailand Research Fund (TRG5680041) for C. Talabnin, the National Research Council of Thailand, and The National Research Project and one research one graduate, Suranaree University of Technology.

* Corresponding author. School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.
E-mail address: chutima.sub@sut.ac.th (C. Talabnin).

1. Introduction

Worldwide incidence and mortality from intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC)—a malignancy of bile duct epithelial cells lining the intrahepatic bile duct—is increasing. ICC is found more frequently in Southeast Asia and particularly in Northeast Thailand, where lethal tumors are

ประวัติผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

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

ผลงานตีพิมพ์ (ย้อนหลัง 5 ปี)

● ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

1. Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, Chur-in S, Pugkhem A, **Talabnin C**, Wongkham S. Cholangiocarcinoma: Experience of Srinagarind Hospital (2012) Srinagarind Med J, 27, pp 331-9

● ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Thongsom, S., Suginta, W., Lee, KJ., Choe, H., **Talabnin, C.** (2017). Piperlongumine induces G2/M phase arrest and apoptosis in cholangiocarcinoma cells through the ROS-JNK-ERK signaling pathway. Apoptosis. 2017 Nov;22(11):1473-1484. doi: 10.1007/s10495-017-1422-y.
2. Saentaweek, W., Araki, N., Vaeteewoottacharn, K., Silsirivanit, A., Seubwai, W., **Talabnin, C.**, Muisuk, K., Sripan, B., Wongkham, S., Okada, S., Wongkham, C. (2017) Activation of Vimentin is Critical to Promote a Metastatic Potential of Cholangiocarcinoma Cells. Oncol Res. 2017 Jul 25. doi: 10.3727/096504017X15009778205068
3. Siritapetawee, J., **Talabnin, C.**, Vanichtanankul, J., Songsiriritthigul, C., Thumanu, K., Chen, CJ., Komansin, N. (2017) Characterization of the binding of a glycosylated serine protease from Euphorbia cf. lactea latex to human fibrinogen. Biotechnol Appl Biochem. 2017 Feb 1. doi: 10.1002/bab.1555.
4. Uthaisar, K., Vaeteewoottacharn, K., Seubwai, W., **Talabnin, C.**, Sawanyawisuth, K., Obchoei, S., Kraiklang, R., Okada, S., Wongkham, S. (2016) Establishment and characterization of a novel human cholangiocarcinoma cell line with high metastatic activity. Oncology Report, 36: 1435-1446.
5. **Talabnin, C.**, Jantavon, P., Thongsom, S., Suginta, W., Talabnin, K., & Wongkham, S. (2016). Ring finger protein 43 expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis

- among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathology*, 52, 47–54. doi.org/10.1016/j.humpath.2015.12.027
6. Thongsom, S., Chaocharoen, W., Silsirivanit, A., Wongkham, S., Sripa, B., Choe, H., Suginta W., & **Talabnin, C.** (2016). YKL-40/chitinase-3-like protein 1 is associated with poor prognosis and promotes cell growth and migration of cholangiocarcinoma. *Tumor Biology*. doi 10.1007/s13277-016-4838-z
 7. Talabnin, K., **Talabnin, C.**, Ishihara, M., Azadi, P., Wongkham, S., & Sripa, B. (2016) Differential Expression of O-glycoprotein Glycans in Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17 (2), 691-695. doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.2.691
 8. **Subimerb (Talabnin), C.**, Wongkham, C., Khuntikeo, N., Leelayuwat, C., McGrath, MS., Wongkham, S. Transcriptional Profiles of Peripheral Blood Leukocytes Identify Patients with Cholangiocarcinoma and Predict Outcome. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 15, 2014*
 9. Chusorn, P., Namwat, N., Loilome, W., Techasen, A., Pairojkul, C., Khuntikeo, N., Dechakhamphu, A., **Talabnin, C.**, Chan-On, W., Ong, C. K., The, BT., Yongvanit, P. Overexpression of microRNA-21 regulating PDCD4 during tumorigenesis of liver fluke-associated cholangiocarcinoma contributes to tumor growth and metastasis. *Tumor Biology*, (34), pp 1579-1588.
 10. Bhudhisawasdi, V., Pugkhem, A., **Talabnin, C.**, Khuntikeo, N., Seow, OT., Chur-in, S., Wongkham, S. Evaluation of postoperative adjuvant chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma patients with R1 and R2 resections (2012) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, (13), KKKU supplement pp.169-174.
 11. Choon Kiat Ong, **Chutima Subimerb**, Chawalit Pairojkul, Sopit Wongkham, Ioana Cutcutache, Willie Yu, John R McPherson, George E Allen, Cedric Chuan Young Ng, Bernice Huimin Wong, Swe Swe Myint, Vikneswari Rajasegaran, Hong Lee Heng, Anna Gan, Zhi Jiang Zang, Yingting Wu, Jeanie Wu, Ming Hui Lee, DaChuan Huang, Pauline Ong, Waraporn Chan-on, Yun Cao, Chao-Nan Qian, Kiat Hon Lim, Aikseng Ooi, Karl Dykema, Kyle Furge, Veerapol Kukongviriyapan, Banchob Sripa, Chaisiri Wongkham, Puangrat Yongvanit, P Andrew Futreal, Vajarabhongsa Bhudhisawasdi, Steve Rozen, Patrick Tan, Bin Tean Teh. “Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma”. *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.2273 online publication 6 May 2012

2. ผู้ช่วยนักวิจัย

นางสาวพัชรี จันทร์ถาวร เกิดเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม พ.ศ. 2530 สถานที่เกิดจังหวัดนครราชสีมา การศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (โภชนาวิทยาและการกำหนดอาหาร) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2553 ประวัติการทำงาน ระหว่าง พ.ศ. 2553-2554 ปฏิบัติหน้าที่เป็นนักโภชนาการ บริษัท Abbott Laboratories จำกัด และระหว่าง พ.ศ. 2554-2556 ปฏิบัติหน้าที่เป็นนักวิชาการสาธารณสุข บริษัทสร้างสุขภาพไทย จำกัด สถานที่ติดต่อ บ้านเลขที่ 315 ซอย 1 ถนน กิฬากลาง ต.ในเมือง อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 084-6590945



