



28 JAN 1991

ATTEMPTS TO IDENTIFY TUMOR-ASSOCIATED
ANTIGEN(S) IN CHOLANGIOCARCINOMA

TEERAPORN BUREERUG

อภินันทนากการ

จาก



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENTS OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1990

16421

ชื่อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์หาแอนติเจนของมะเร็งท่อน้ำดี

ผู้วิจัย อีรพร บุรีรักษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สถิตย์ สิริสิงห, D.M.D., Ph.D.

กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D.

สมเนตร บุญพรคนาวิก, พ.บ.

มลวิภา วงศ์สกุล, พร.ค.

วันที่สำเร็จการศึกษา ๑๕ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๓๓

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งตับยังคงเป็นปัญหาหลักด้านสุขภาพที่สำคัญในประเทศทางแถบเอเชียแปซิฟิก ในจำนวนนี้โรคมะเร็งท่อน้ำดีก็จัดเป็นหนึ่งในโรคมะเร็งตับที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศแถบนี้ โรคนี้มักพบในบริเวณที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งเกิดจาก *Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis* ซึ่งได้แก่ประเทศไทย ฮองกง จีน และเกาหลี ในขณะที่ยังไม่มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่จำเพาะสำหรับมะเร็งท่อน้ำดี ไม่ว่าจะเป็นในระยะเริ่มแรกหรือในระยะสุดท้าย และกระจายไปสู่อวัยวะอื่นแล้วก็ตาม การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นการผ่าตัดเอามะเร็งออกจากร่างกายของผู้ป่วย ในขณะที่จึงมีเพียงการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคาร์โบไฮเดรตที่จำเพาะบนไกลโคโปรตีนหรือไกลโคไลปิดบางตัวมาช่วยในการวินิจฉัยโรคเท่านั้น เช่น CA 19-9, CA 50 และ CA 125 โดยการระดับของคาร์โบไฮเดรตแอนติเจนเหล่านี้ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยซึ่งจะมีการเพิ่มขึ้นจากระดับปกติ แต่สิ่งเหล่านี้ก็ไม่สามารถแยกโรคมะเร็งท่อน้ำดีออกจากโรคมะเร็งอื่นในระบบทางเดินอาหารได้อย่างปราศจากข้อกังขา เพราะในโรคที่เกิดกับระบบทางเดินอาหารก็มีการเพิ่มขึ้นของระดับคาร์โบไฮเดรตที่จำเพาะนี้เช่นกัน นอกจากนี้พวกคาร์โบไฮเดรตแอนติเจนเหล่านี้ยังมีสารอื่นซึ่งมีผู้นำมาศึกษาถึงศักยภาพในการเป็นตัวบ่งชี้ของมะเร็ง ซึ่งได้แก่ มิวซิน, ลามินิน, โฟโบรเนคติน เป็นต้น โดยใช้วิธีทาง Immunohistochemistry มาใช้ตรวจหาสิ่งเหล่านี้ในชิ้นเนื้อมะเร็ง ซึ่งก็ต้องใช้วิธีการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกจากผู้ป่วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม markers เหล่านี้ก็ไม่เป็นสิ่งที่จำเพาะสำหรับโรคมะเร็งท่อน้ำดีเท่านั้น เพราะ

อาจพบได้ในมะเร็งอื่น ๆ หรือแม้ในคนปกติก็พบได้ ดังนั้น ความสนใจส่วนใหญ่ จึงมุ่งไปที่การวินิจฉัยและการวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้จำเพาะสำหรับโรคมะเร็งนี้ และ ถ้าหากจุดมุ่งหมายนี้เป็นผลสำเร็จ สิ่งนี้จะเป็นตัวช่วยที่สำคัญสำหรับการตรวจหา โรคมะเร็งนี้ในระยะเริ่มแรก

สิ่งบ่งชี้จำเพาะสำหรับมะเร็งนี้ ต้องการพบในรูปลักษณะที่เป็นของเหลว ที่ถูกหลั่งออกมาในสารคัดหลั่งของร่างกาย เช่น บัสสาวะ, น้ำเหลือง เพื่อง่าย ในการตรวจหา และเมื่ออยู่ในรูปนี้ก็มักจะพบในเซลล์มะเร็งในส่วนที่เป็นของเหลว เช่น Cytosol ด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการสกัดแยกองค์ประกอบของ เนื้อเยื่อ จากทั้งส่วนท่อน้ำดีที่ตับ (intrahepatic bile ductule) และที่ถุงน้ำดี มาทำการเปรียบเทียบกันระหว่างของคนปกติกับผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อที่จะ หาสิ่งจำเพาะที่พบเฉพาะในเนื้อเยื่อมะเร็งเท่านั้น และไม่พบหรือพบในปริมาณที่น้อย มากในเนื้อเยื่อปกติ ส่วนต่าง ๆ ของโปรตีนที่นำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่ ส่วน crude homogenate, cytosol, peripheral และ integral membrane โปรตีน วิธีการที่ใช้ในการเปรียบเทียบคือ SDS-PAGE ในหลาย ๆ แ่งมุม เช่น การย้อมโปรตีนบนเจลด้วยสี Coomassie blue, การย้อมไกลโคโปรตีนของส่วน ต่าง ๆ ของโปรตีนเมื่อทำ Electrophoretic blotting บน Nitrocellulose ด้วย Concanavalin A, ใช้วิธี Immunoenzymatic reaction โดยใช้แอนติ บอดีจากกระต่ายที่สร้างขึ้นต่อส่วน homogenate ของทั้งท่อน้ำดีที่ตับ และที่ถุงน้ำดีของ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง เพื่อตรวจหาสิ่งจำเพาะที่อาจพบได้ในเฉพาะเนื้อเยื่อมะเร็งเท่านั้น ขึ้นเนื้อมะเร็งที่นำมาศึกษามีทั้งส่วนที่เป็นท่อน้ำดีในตับและที่ถุงน้ำดี ส่วนของท่อน้ำดี ในตับนั้นได้มาจาก ร.พ.ศรีนครินทร์ และ ร.พ.รามธิบดี ส่วนมะเร็งที่ถุงน้ำดีนั้น ได้มาจาก ร.พ. ศิริราช

ผลของการย้อมคูปแพทเทิร์นโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ของโปรตีนเปรียบเทียบกันระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ ไม่สามารถพบความแตกต่างที่ อาจจะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้จำเพาะได้ ส่วนการย้อมไกลโคโปรตีนด้วย con-A นั้น ในส่วนเนื้อเยื่อมะเร็งของท่อน้ำดีในตับของทั้ง ๒ แหล่งที่มา พบว่ามีสิ่งจำเพาะตัว หนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล ๔๖ กิโลดาลตัน มีความเป็นไกลโคโปรตีนสูงมาก และไม่พบ ในเนื้อเยื่อปกติ สิ่งนี้นับว่าเป็นความแตกต่างตัวหนึ่งระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อ เยื่อปกติ ต่อมาได้มีการพยายามหาตัวบ่งชี้จำเพาะสำหรับโรคมะเร็งนี้โดยใช้แอนติ บอดีที่สร้างขึ้นโดยกระต่ายต่อส่วน homogenate ของมะเร็งที่ท่อน้ำดีในตับจาก ร.พ. ศรีนครินทร์ เป็นตัวตรวจหา จากการใช้อันติบอดีนี้จะพบมีสิ่งจำเพาะตัวหนึ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ ๑๔๐ กิโลดาลตัน ที่พบเฉพาะในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

ในดับจากทั้ง ๒ แหล่งเท่านั้น โดยไม่พบในเนื้อเยื่อปกติ และเมื่อทำการศึกษาต่อไปโดยใช้แอนติบอดีจากกระต่ายที่สร้างขึ้นต่อส่วน homogenate ของเนื้อเยื่อมะเร็งที่ดูน้ำคิงจาก ร.พ. ศิริราช ที่ถูกทำให้จำเพาะโดยวิธี Affinity chromatography เป็นตัวตรวจหา แอนติบอดีนี้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งที่ดูน้ำคิงกับเนื้อเยื่อปกติได้ โดยพบสิ่งจำเพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุล ๔๖ กิโลดาลตัน สิ่งจำเพาะนี้แสดงความเป็นไกลโคโปรตีนด้วยเมื่อย้อมด้วย Con-A และสิ่งจำเพาะนี้น่าจะเป็นสิ่งจำเพาะสำหรับมะเร็งที่ดูน้ำคิงจริง เพราะแอนติบอดีตัวนี้ได้ทำการกำจัดเอาแอนติบอดีต่อส่วนเนื้อเยื่อปกติออกไปแล้วก่อนที่จะนำมาทำเป็นตัวตรวจหา และเมื่อได้นำแอนติบอดีตัวนี้กลับไปลองตรวจหาความเป็นไปได้ในการปรากฏของสิ่งจำเพาะนี้ในส่วนเนื้อเยื่อมะเร็งที่ดูน้ำคิงในดับ ซึ่งก็ปรากฏว่าแอนติบอดีนี้สามารถตรวจพบสิ่งจำเพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุล ๔๖ กิโลดาลตันได้เช่นกันโดยที่ไม่พบในเนื้อเยื่อปกติเลย จึงเป็นการสรุปได้ว่าสิ่งจำเพาะนี้ไม่ได้เป็นสิ่งจำเพาะสำหรับอวัยวะเท่านั้น เพราะสามารถตรวจพบได้ทั้งในส่วนมะเร็งที่ดูน้ำคิงในดับและมะเร็งที่ดูน้ำคิงด้วย แต่เมื่อได้ลองนำแอนติบอดีนี้ไปตรวจหาสิ่งจำเพาะนี้ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ดูน้ำคิง แอนติบอดีนี้ไม่สามารถตรวจพบสิ่งจำเพาะตัวนี้ได้ เหตุการณ์เช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าสิ่งจำเพาะนี้ได้จับกับแอนติบอดีที่หมุนเวียนอยู่ในร่างกายผู้ป่วยเรียบร้อยแล้ว หรือวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาที่มีความไวไม่พอในการที่จะตรวจหาสิ่งจำเพาะนี้ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยก็เป็นไปได้

คุณสมบัติที่ดีของการเป็นตัวบ่งชี้จำเพาะสำหรับมะเร็งนั้น ควรเป็นสิ่งจำเพาะที่พบได้ในหลาย ๆ ที่ คือไม่จำเพาะต่ออวัยวะใด ๆ และควรตรวจพบได้ในสิ่งส่งตรวจที่ง่ายต่อการเก็บตรวจ เช่น น้ำเหลือง หรือปัสสาวะ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาขั้นเบื้องต้นเท่านั้น ควรมีการศึกษาให้ได้ข้อมูลที่แน่นอนยิ่งขึ้นอีกก่อนที่จะมีผู้ใดสามารถสรุปผลที่แน่นอนลงไปได้ และถ้าพบว่าสิ่งจำเพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุล ๔๖ กิโลดาลตันนี้เป็นสิ่งจำเพาะสำหรับมะเร็งที่ดูน้ำคิงโดยเฉพาะ ก็ควรมีการปรับปรุงวิธีการตรวจหา เพื่อให้สามารถตรวจหาสิ่งจำเพาะนี้ได้เป็นสิ่งส่งตรวจที่ทำการเก็บตรวจได้ง่าย การมีสิ่งส่งตรวจที่จำกัดเช่นในการศึกษาครั้งนี้ เป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองซ้ำ หรือทำการทดลองต่อไปในทางที่จะได้ผลการทดลองที่แน่นอนเพิ่มเติมมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการเริ่มเปิดทางเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาครั้งต่อไปที่จะมีขึ้นในอนาคต

Thesis Title: Attempts to identify tumor-associated antigen(s) in cholangiocarcinoma

Name: Teeraporn Bureerug

Degree: Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee:

Stitaya Sirisinha, D.M.D., Ph.D.

Kavi Ratanabanangkoon, Ph.D.

Somnate Boonpucknavig, M.D.

Molvibha Vongsakul, Ph.D.

Date of Graduate: 15 June B.E. 2533 (1990)

Abstract

Liver cancer is still a major health problem in many Asian-Pacific countries. Of these, cholangiocarcinoma is one of the main types of primary cancers of the liver commonly found in these countries. It is particularly more common in areas where liver fluke infection caused by *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* are endemic such as Hong Kong, China, Korea and Thailand. At the present time, there is no specific laboratory test for the early detection of the tumor so patients with cholangiocarcinoma are often diagnosed at the time when the condition is too late to be successfully managed. Much attention has been given to the identification, isolation and characterization of specific tumor marker for this disease and if it turns out to be positive, it will be a

potential candidate that may be developed further for the detection of cholangiocarcinoma at its earliest stage.

In this study, the protein fractions of malignant tissue were compared with the protein fractions of normal tissue by a number of approaches, i.e., protein and glycoprotein stainings of SDS-PAGE, immunoenzymatic reaction with rabbit antibodies to find out the possible presence of specific component that is found only in malignant tissue. The protein and glycoprotein stainings failed to distinguish any difference between malignant and normal tissue. However, when the rabbit antibody against homogenate of cholangiocarcinoma gall-bladder purified by affinity chromatography was used as a specific probe, a specific component with a MW of 46 kD was detected in cholangiocarcinoma tissue and not in a small number of normal tissue available for study. This component was heavily glycosylated and was not organ specific because it could be detected in both intrahepatic portion of bile duct and gall-bladder. A limited data currently available failed to detect the presence of this component in the serum of patients with cholangiocarcinoma.

The limited data presented in this study are encouraging but more definitive data must be obtained before one can make a firm conclusion. The limited number of specimens available at the time of study was a major obstacle. It was not possible to either repeat some of these experiments or to further refine them in such a way that would give a more conclusive result.