บทฟื้นฟูวิชาการ • Review Article

การแสดงออกและการทำงานของจีนที่สัมพันธ์กับโรคมะเร็งท่อน้ำดี

วัชรินทร์ ลอยลม, พวงรัตน์ ยงวณิชย์
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Expression and Function of Candidate Genes Involved in Cholangiocarcinama

Watcharin Loilome, Puangrat Yongvanit
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine; Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University

บทนำ

ความรู้ด้านชีววิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์ เป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาโรคมะเร็ง ในขณะนี้องค์ความรู้ดังกล่าวได้พัฒนาก้าวหน้าไปอย่างมาก เพราะการศึกษาโครงสร้างและการแสดงออกของจีนด้วยเทคนิคทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลที่ทันสมัย ผนวกกับเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าด้านคอมพิวเตอร์ เกิดเป็นศาสตร์ที่เรียกว่า Bioinformatics ทำให้การศึกษาบทบาทของสารชีวโมเลกุลในปัจจุบันสามารถวิเคราะห์แบบมีประสิทธิผลสูง กล่าวคือ สามารถศึกษาจีนทั้งหมด (ระดับ DNA) หรือการแสดงออกของจีน (ระดับ RNA และโปรตีน) ในเซลล์ขณะนั้น เป็นจำนวนหมื่น ๆ จีนพร้อมกัน ซึ่งเรียกว่าเป็นเทคนิคแบบ high-throughput เช่น เทคนิค DNA-microarray, differential Display (DD), serial analysis of gene expression (SAGE) และ proteomic analysis เป็นต้น จนทำให้เกิดศัพท์บัญญัติใหม่ๆ เช่น genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics เป็นต้น องค์ความรู้และเทคโนโลยีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นมีผลต่อการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เป็นอย่างยิ่งในอนาคต การป้องกันและการรักษาโรคจะเป็นลักษณะให้เข้ากับเฉพาะตัวบุคคล (personalized medicine) ซึ่งส่งผลให้การรักษาโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และตรงเป้าหมายได้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะสาขามะเร็งวิทยา (Oncology) ดังนั้นความเข้าใจในโรคมะเร็งมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องการใช้ความรู้ด้านการวิเคราะห์การแสดงออกของแบบแผนของจีน (gene expression profiling) มาประยุกต์ใช้ทั้งในด้านการป้องกันการก่อมะเร็ง หรือเพื่อช่วยให้แพทย์รักษาและติดตามการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพรวมทั้งช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ขณะนี้ได้มีการพัฒนายาชนิดใหม่ๆ เพื่อรักษาโรคมะเร็งขึ้นอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งยาเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นจะออกฤทธิ์ที่เซลล์มะเร็งเท่านั้น (targeted drug) เนื่องจากตัวยาสามารถยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณ (signal transduction) ของเซลล์มะเร็งแต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ แต่การที่จะใช้ยาแบบ targeted drug นั้น แพทย์จำเป็นต้องมีข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของจีน (gene profile) ของเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยแต่ละคน เพราะถึงแม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกที่เหมือนกัน แต่สาเหตุและกระบวนการก่อโรค (molecular pathway) ไม่จำเป็นต้องเหมือนกัน ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยเดียวกันแต่มีการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่เท่ากัน หรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาเลยเป็นต้น บทความนี้ได้รวบรวมรายงานบางส่วนที่ได้พิมพ์เผยแพร่ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันที่ได้ศึกษาวิจัยด้านจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchis viverrini)* เพื่อเป็นข้อมูลทำความเข้าใจไปสู่เป้าหมายของการรักษาที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

จีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma; CCA) หมายถึงมะเร็งของเยื่อบุทางเดินท่อน้ำดี (bile duct epithelial) มะเร็งชนิดนี้มีลักษณะการดำเนินโรคที่ค่อนข้างช้า (slow progression) ทำให้กว่าจะสามารถตรวจพบได้ ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่ก็อยู่ในระยะสุดท้ายหรือมีการแพร่ลุกลามของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ แล้ว ส่งผลให้การรักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการก่อเกิดโรคมะเร็งชนิดนี้ในระดับโมเลกุล เพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการป้องกัน การดูแลรักษาและติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป็นสิ่งที่ท้าทายสำหรับนักวิทยาศาสตร์และแพทย์ในปัจจุบัน

การวิจัยเกี่ยวกับพยาธิวิทยาในระดับโมเลกุลถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกและการทำงานของจีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในปัจจุบันมีความเจริญก้าวหน้ามาก เราสามารถแบ่งกลุ่มของจีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการก่อมะเร็งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ proto-oncogenes, tumor suppressor genes, DNA repairing genes และ apoptosis genes ดังแสดงในตารางที่ 1

จากกลุ่มจีนดังกล่าวข้างต้นสามารถนำมาสรุปเพื่ออธิบายบทบาทที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งท่อน้ำดีได้ดังนี้คือ

ตารางที่ 1 ชนิดของจีนและกลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งท่อน้ำดี

ชนิดของจีน	กลไกการเปลี่ยนแปลงและระดับการแสดงออก	ผลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
K-ras[1, 2]	- การกลายพันธุ์ - การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ (mitogenic effect)
p53[3, 4]	- การกลายพันธุ์ - การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ - ดื้อต่อกระบวนการกำจัดเซลล์แบบ apoptosis
COX-2[5-8]	- การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น	- กระตุ้นให้มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของจีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น EGFR และ MAPK - ดื้อต่อกระบวนการกำจัดเซลล์แบบ apoptosis
c-erbB-2[5, 9] (HER-2/neu)	- การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น - การเพิ่มขึ้นของ copy ของจีนในโครโมโซม (gene amplification)	- เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์
c-Met[10]	- การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์
Ets-1[11]	- การแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์
HGF[12]	- การแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ - เพิ่มความสามารถในการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น (enhance metastasis)
hMLH1[13, 14]	- MSI, LOH Methylation	- สูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (loss of DNA repair activity)
Bcl-X, Mcl-l[15]	- การแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น	- ดื้อต่อกระบวนการกำจัดเซลล์แบบ apoptosis
TGF-β1, VEGF[16]	- การแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการแบ่งเซลล์
iNOS[17]	- การแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น	- เพิ่มการทำลายดีเอ็นเอ

1. ความผิดปกติของจีน K-ras และ p53

จากรายงานการวิจัยหลายฉบับพบว่ามีการกลายพันธุ์ (mutation) ของจีน K-ras และ p53 และมีการแสดงออกของจีนทั้งสองชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดี โดย Ohashi และคณะได้รายงานในปี คศ. 1995 ว่าสามารถพบการกลายพันธุ์ของจีน K-ras ได้ตั้งแต่ระยะต้นของกระบวนการก่อมะเร็ง ในขณะที่การกลายพันธุ์ของจีน p53 จะพบในระยะท้ายของกระบวนการก่อมะเร็ง [3]

ในภาวะปกติ K-ras จะอยู่ในรูปของ proto-oncogene ซึ่งไม่ทำงาน (inactive form) แต่หากในกรณีที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นจะทำให้ K-ras อยู่ในรูปที่ทำงาน (active form) หรือเรียกว่า oncogene จากรายงานการวิจัยพบว่าการกลายพันธุ์ของจีน K-ras พบว่ามีอุบัติการณ์สูงถึง 100% ในคนไข้มะเร็งท่อน้ำดีชาวอังกฤษ [18] ในขณะที่พบการกลายพันธุ์อยู่ในช่วง 4-60% ในคนไข้ชาวญี่ปุ่นและคนไทย[19-21] ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ (hot spot) พบที่ตำแหน่ง codon ที่ 12 โดยมีการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน glycine (GGT) ไปเป็น aspartic acid (GAT) หรือ valine (TGT) และยังพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 13 และ codon 61 อีกด้วย[21-23] นอกจากนี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ของจีน K-ras มีความสัมพันธ์กับชนิดของมะเร็งท่อน้ำดีโดยพบมีการกลายพันธุ์อยู่ในอัตราสูงในมะเร็งท่อน้ำดีชนิด periductal-spreading มากกว่าชนิด mass-forming [3]

ในกรณีของจีน p53 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม tumor suppressor gene ทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติหรือทำหน้าที่ชักนำให้มีการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า apoptosis ดังนั้นหากมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับการทำงานของจีน p53 จะส่งผลให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็งได้ จากการศึกษาพบอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของจีน p53 ในมะเร็งท่อน้ำดีอยู่ในช่วง 5-53% โดยเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่เป็น mass-forming[3,19] ซึ่งการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะเป็นชนิด A-G transition มีผลให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ missense คือมีการสร้างเป็นโปรตีนที่ทำงานผิดปกติหรือไม่สามารถทำงานได้ มีเพียงส่วนน้อยที่การกลายพันธุ์เป็นแบบ nonsense คือไม่มีการสร้างโปรตีนออกมาทำงานในเซลล์ [3]

2. ความผิดปกติของจีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis

ในเซลล์ปกติจะมีการทำงานของจีนและโปรตีนที่มีบทบาทในการกระตุ้นและยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis กล่าวคือถ้าเซลล์ได้รับบาดเจ็บระดับหนึ่งเซลล์จะสามารถเหนี่ยวนำให้ตายลง (apoptosis) เพื่อไม่ให้ความผิดปกตินั้นถ่ายทอดยังเซลล์รุ่นหลัง แต่ในกรณีที่เซลล์มีความผิดปกติจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง จะมีความผิดปกติของการทำงาน กล่าวคือจะมีการแสดงออกที่ลดลงของจีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิด apoptosis แต่มีการแสดง ออกที่เพิ่มมากขึ้นของจีนกลุ่มที่ยับยั้งการเกิด apoptosis ทำให้เซลล์ที่เกิดความผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งสามารถเจริญแบ่งตัวต่อไปได้อย่างไม่สิ้นสุด การศึกษาในมะเร็งท่อน้ำดีพบว่าจีนที่มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการ apoptosis หลายชนิดมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นจีน Bcl-2, Bcl-X และ Mcl-l 15, 24 ทั้งในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยและเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

3. ความผิดปกติของกลุ่มจีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene)

ในภาวะปกติเมื่อมีการทำลายดีเอ็นเอเกิดขึ้น เซลล์จะมีระบบซ่อมแซมด้วยกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า DNA reparing enzyme ซึ่งเป็นผลิตผลของ DNA repairing gene แต่หากเซลล์มีการแสดงออกผิดปกติหรือการกลายพันธุ์ของจีนในกลุ่มนี้จะทำให้เกิดการสะสมของดีเอ็นเอที่มีความผิดปกติมากขึ้นจนส่งผลเกิดการกลายพันธุ์ของจีนหลายๆ ตำแหน่ง ในที่สุดการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้กับจีนในทุกกลุ่มทั้ง oncogene, tumor suppressor gene, apoptosis gene รวมไปถึง DNA repairing gene ด้วย ทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติมีการแบ่งตัวอย่างไม่สิ้นสุดและพัฒนาจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ นอกจากความผิดปกติของจีนต่างๆ โดยตรงดังกล่าวแล้ว ยังพบความผิดปกติที่กระบวนการควบคุมการแสดงออกของจีนซึ่งเรียกว่า epigenetic stage ได้อีกด้วย เช่นการเกิดปฏิกิริยา hypermethylation ในบริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ของจีน hMLH1 ซึ่งเป็นจีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมในกรณีที่มี DNA mismatch เกิดขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของจีนดังกล่าวลดต่ำลง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจีนต่างๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น[13, 14]

4. การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของจีนกลุ่ม growth factors และ cytokines ต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่ามี growth factors และ cytokines หลายชนิดที่มีบทบาทกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีแบ่งตัวเช่น interluein-6 (IL-6), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor-α (TGF-α), epidermal growth factor (EGF), c-erbB-2, heterogenous immunoglobulin A (IgA) และ leukocyte inhibitory factor (LIF) เป็นต้น[25-28] โดยการกระตุ้นเป็นได้ทั้งแบบ autocrine หรือ paracrine นอกจากนี้ยังพบว่า receptor ของ growth factors และ cytokines เหล่านี้ยังถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เช่น Met ซึ่งเป็น receptor ของ HGF หรือ c-erbB-2 ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีความคล้ายคลึง (homologous) กับ EGFR จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกรณีที่มีพยาธิสภาพของเยื่อบุทางเดินน้ำดี ซึ่งการแสดงออกของ growth factor และ cytokine ชนิดต่างๆ รวมไปถึง receptor เหล่านี้จะมีผลไป

กระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อยู่ตลอดเวลาโดยเฉพาะเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติอยู่แล้ว จนส่งผลให้เซลล์เหล่านี้มีการเจริญเติบโตที่ไม่สิ้นสุด

การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของจีน Prkar1a/PKAI ในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกชักนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี

คณะผู้วิจัยจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น[29] ได้ทำการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์ โดยการชักนำให้หนูแฮมสเตอร์ให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีด้วยการทำให้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ร่วมกับการให้สารก่อมะเร็งชนิด *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) และทำการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีนในเนื้อเยื่อมะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติโดยเทคนิค high throughput ที่เรียกว่า fluorescence differential display พบจีนที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งแสดงออกที่สูงขึ้นและลดลงจำนวน 24 จีน ในจำนวนนี้จีน Prkar1a มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็ง และจากการตรวจยืนยันการแสดงออกของจีน Prkar1a ในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์โดยเทคนิค SYBR Green I real time PCR พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) ของจีน Prkar1a ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็น hyperplastic cell และ precancerous lesion ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลงไปจนเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด จากการศึกษาเบื้องต้นในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อตับปกติเช่นเดียวกับผลในสัตว์ทดลอง จึงทำให้เชื่อว่าจีน Prkar1a น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดี

จีน Prkar1a เป็น regulatory subunit ของ Protein kinase A type I (PKAI) ซึ่งเป็น protein kinase ชนิดที่พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง ปัจจุบันจีนนี้ถูกใช้เป็นเป้าหมายของยาในการรักษามะเร็งหลายชนิด ซึ่งการทดลองอยู่ในขั้นของ clinical trial ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำจีน Prkar1a เป็นเป้าหมายของยาในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต

สรุป

ในเซลล์ปกติจะมีการทำงานที่สมดุลกันระหว่างกลุ่มจีนที่สำคัญอยู่สี่กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มจีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์อันประกอบด้วยกลุ่มที่เป็น oncogene และ tumor suppressor gene กับกลุ่มจีนที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ในกรณีที่มีการกลายพันธุ์ของจีนเหล่านี้ จนไม่สามารถซ่อมแซมได้ ทำให้ความสมดุลนี้ถูกรบกวนจะทำให้เซลล์สามารถพัฒนาจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด ความรู้ความเข้าใจพยาธิวิทยาของการก่อมะเร็งในระดับโมเลกุลจะทำให้เราสามารถเลือกใช้จีนเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพได้มากยิ่งขึ้นในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Isa T, Tomita S, Nakachi A, Miyazato H, Shimoji H, Kusano T, and et al. Analysis of microsatellite instability, K-ras gene mutation and p53 protein overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatogastroenterology. 2002;49: 604-8.
2. Rashid A, Ueki T, Gao YT, Houlihan PS, Wallace C, Wang BS, and et al. K-ras mutation, p53 overexpression, and microsatellite instability in biliary tract cancers: a population-based study in China. Clin Cancer Res. 2002;8:3156-63.
3. Ohashi K, Nakajima Y, Kanehiro H, Tsutsumi M, Taki J, Aomatsu Y, and et al. Ki-ras mutations and p53 protein expressions in intrahepatic cholangiocarcinomas: relation to gross tumor morphology. Gastroenterology. 1995;109:1612-7.
4. Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes E, and Zimmermann A. p53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. Hepatology. 1995;22:774-9.
5. Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, Demetris AJ, and Sirica AE. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. Hepatology. 2002;36:439-50.
6. Sirica AE, Lai GH, Endo K, Zhang Z, and Yoon BI. Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets. Semin Liver Dis. 2002;22: 303-13.
7. Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, and Gores GJ. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. Hepatology. 2002;35:552-9.
8. Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, and Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. Gastroenterology. 2002; 122:985-93.
9. Ukita Y, Kato M, and Terada T. Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry. J Hepatol. 2002;36:780-5.

10. Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, and Tsuneyoshi M. c-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. Histopathology. 2002;40:269-78.
11. Ito Y, Miyoshi E, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Yokosaki Y, and et al. ets-1 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and cholangiocellular carcinoma. Oncology. 2000;58:248-52.
12. Date K, Matsumoto K, Kuba K, Shimura H, Tanaka M, and Nakamura T. Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. Oncogene. 1998;17:3045-54.
13. Liu D, Momoi H, Li L, Ishikawa Y, and Fukumoto M. Microsatellite instability in thorotrast-induced human intrahepatic cholangiocarcinoma. Int J Cancer. 2002; 102:366-71.
14. Limpaiboon T, Krissadarak K, Sripa B, Jearanaikoon P, Bhuhisawasdi V, Chau-in S, and et al. Microsatellite alterations in liver fluke related cholangiocarcinoma are associated with poor prognosis. Cancer Lett. 2002;181: 215-22.
15. Okaro AC, Deery AR, Hutchins RR, and Davidson BR. The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium. J Clin Pathol. 2001;54:927-32.
16. Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schafer G, Peters M, and et al. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. Cancer Res. 2003;63:1083-92.
17. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, and Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. Cancer Res. 2000;60:184-90.
18. Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C, and et al. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. Cancer Res. 1991;51:3497-502.
19. Furubo S, Harada K, Shimonishi T, Katayanagi K, Tsui W, and Nakanuma Y. Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. Histopathology. 1999;35:230-40.
20. Tada M, Omata M, and Ohto M. High incidence of ras gene mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. Cancer. 1992;69:1115-8.
21. Petmitr S, Pinlaor S, Thousungnoen A, Karalak A, and Migasena P. K-ras oncogene and p53 gene mutations in cholangiocarcinoma from Thai patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1998;29:71-5.
22. Ohashi K, Tsutsumi M, Nakajima Y, Noguchi O, Okita S, Kitada H, and et al. High rates of Ki-ras point mutation in both intra- and extra-hepatic cholangiocarcinomas. Jpn J Clin Oncol. 1994;24:305-10.
23. Tsuda H, Satarug S, Bhudhisawasdi V, Kihana T, Sugimura T, and Hirohashi S. Cholangiocarcinomas in Japanese and Thai patients: difference in etiology and incidence of point mutation of the c-Ki-ras proto-oncogene. Mol Carcinog. 1992;6:266-9.
24. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Monden M, Yamada T, and et al. Bcl-2 expression in cholangiocellular carcinoma is inversely correlated with biologically aggressive phenotypes. Oncology. 2000;59:63-7.
25. Terada T, Ashida K, Endo K, Horie S, Maeta H, Matsunaga Y, and et al. c-erbB-2 protein is expressed in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. Histopathology. 1998;33:325-31.
26. Harada K, Terada T, and Nakanuma Y. Detection of transforming growth factor-alpha protein and messenger RNA in hepatobiliary diseases by immunohistochemical and in situ hybridization techniques. Hum Pathol. 1996;27:787-92.
27. Radaeva S, Ferreira-Gonzalez A, and Sirica AE. Overexpression of C-NEU and C-MET during rat liver cholangiocarcinogenesis: A link between biliary intestinal metaplasia and mucin-producing cholangiocarcinoma. Hepatology. 1999;29:1453-62.
28. Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, Pham L, Podila PV, Caligiuri A, and et al. Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation. Am J Physiol. 1998;274:G767-75.
29. Loilome W, Yongvanit P, Wongkham P, Tepsiri N, Sripa B, Sithithaworn P, and et al. Altered gene expression in Opisthorchis viverrini-associated cholangiocarcinoma in hamster model (in press). Mol Carcinog. 2005