

กระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุล 1: ปฏิสัมพันธ์การตอบสนองจากโฮสต์ต่อพยาธิใบไม้ตับ

กิตติ อินทุยศ^{1,4}, สมชาย ปิ่นละออ^{2,4,*}, พวงรัตน์ ยงวนิชย์^{3,4,*}

¹สาขาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ภาควิชาปรสิตวิทยา ³ภาควิชาชีวเคมี และ ⁴ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและโรคมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Molecular Carcinogenesis of Cholangiocarcinoma I: Host-liver Fluke Interaction

Kitti Intuyod^{1,4}, Somchai Pinlaor^{2,4,*}, Puangrat Yongvanit^{3,4,*}

¹Biomedical Sciences, Graduate School, Khon Kaen University

²Department of Parasitology, ³Department of Biochemistry, ⁴Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้นคือโรคพยาธิใบไม้ตับ opisthorchiasis ที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งนำไปสู่การอักเสบเรื้อรังในบทความฟื้นฟูวิชาการนี้ได้เน้นเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และพยาธิซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังแล้วส่งผลต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ยังได้เสนอกลไกอื่นๆ ที่อาจมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ข้อมูลที่นำเสนอได้รวบรวมจากการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในชุมชนจากอดีตจนถึงปัจจุบัน โดยข้อมูลสนับสนุนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้นำมาเฉพาะจากผลงานตีพิมพ์ของศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทยเท่านั้น แต่ยังสามารถนำข้อมูลที่ตีพิมพ์เผยแพร่จากทั่วโลกได้ด้วย

A major risk factor for cholangiocarcinoma (CCA) in Northeastern of Thailand is opisthorchiasis caused by *Opisthorchis viverrini* infection, which brings to chronic inflammation. In this review we emphasize on host-parasite interface causing chronic inflammation and its contributing role to cholangiocarcinogenesis. Moreover, other mechanisms that enhance CCA development are also postulated. This review is based on animal and community studies from the past to up-to-date. The evidences to support this review are obtained not only from the publications reported by The Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand but also from published data in CCA worldwide.

สรินครินทร์เวชสาร 2555; 27 ฉบับพิเศษ (มะเร็งท่อน้ำดี): 356-63 • Srinagarind Med J 2012; 27 suppl (Cholangiocarcinoma): 356-63

บทนำ

โรคพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiasis viverrini) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งมีพื้นที่ระบาดอยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ได้แก่ ไทย ลาว กัมพูชา และทางตอนใต้ของเวียดนาม¹ โดยในประเทศไทยนั้นมีอัตราการติดพยาธิใบไม้ตับลดลงจากร้อยละ 35.6 ในปี ค.ศ. 1988 เหลือเพียงร้อยละ 9.4 ในปี ค.ศ. 2001 เนื่องจากมีโครงการรณรงค์และควบคุมโรคพยาธิอย่าง

*Corresponding Author: psomec@kku.ac.th, puangrat@kku.ac.th

ต่อเนื่อง² ถึงแม้การใช้ยาพลาซิควอนเทลจะสามารถช่วยลดอัตราการติดพยาธิใบไม้ตับได้ แต่พบว่าในพื้นที่ระบาดบางพื้นที่ก็ยังพบว่ามี การติดเชื้อซ้ำๆ ซากๆ หลังจากการรักษาด้วยยาพลาซิควอนเทล^{3,4} ความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับในจังหวัดขอนแก่นมีตั้งแต่ร้อยละ 2-70 ในขณะที่อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) ของประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไปพบว่ามีตั้งแต่ 94-318 ต่อประชากร 100,000 รายต่อปี⁵ ปัจจุบันความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับในพื้นที่ระบาดนั้นมีแนวโน้มลดลง แต่ว่าอุบัติการณ์ของ CCA ยังคงที่ไม่ลดลงตามการลดลงของความชุกของโรคพยาธิ ดังนั้นการเข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุลจากการติดพยาธิใบไม้ตับจึงมีความสำคัญและมีประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ในด้านการป้องกันโรคมะเร็ง การค้นหากลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง การวินิจฉัยโรคมะเร็งระยะเริ่มต้นและการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี

1. ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างพยาธิใบไม้ตับและโฮสต์

จากการศึกษาของ Bhamarapravati และคณะ ในปี ค.ศ. 1978 พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับมีพยาธิสภาพเหมือนกับผู้ป่วยที่ติดพยาธิใบไม้ตับ โดยในระยะแรกของการติดเชื้อจะมีการอักเสบแบบเฉียบพลันในท่อน้ำดีลำดับที่สอง (secondary order of bile duct) และเนื้อเยื่อพอร์ทัล (portal connective tissue) โดยเฉพาะหลอดเลือดดำในตับขนาดใหญ่ และพบการตายของเนื้อตับเป็นหย่อมๆ แบบ coagulation necrosis เมื่อพยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้วพบว่าเนื้อเยื่อผิวของท่อน้ำดีมี การเพิ่มจำนวนมากขึ้น (hyperplasia) และพบ adenomatous formation นอกจากนี้ตัวเต็มวัยและไข่พยาธิยังเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบ granulomatous ได้อีกด้วยส่งผลให้เกิดพังผืดรอบท่อน้ำดีหรือเพอริดักทอลไฟโบรซิส (periductal fibrosis) และเกิดแผลที่ท่อน้ำดี ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกถึงการติดพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรัง⁶ การหนาตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดีสอดคล้องกับปริมาณของคอลลาเจนชนิด 1 และ 3 ที่เพิ่มขึ้น^{7,8} ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลของพยาธิสภาพที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่มีการติดพยาธิใบไม้ตับคือ การหลุดลอกของเยื่อท่อน้ำดี (desquamation of the biliary epithelium) การเพิ่มจำนวนมากขึ้นของเนื้อเยื่อท่อน้ำดี (epithelial hyperplasia) และการหนาตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดี^{9,10} การหลุดลอกของเยื่อท่อน้ำดีเชื่อว่าเกิดจาก oral sucker และ ventral sucker ของพยาธิซึ่งใช้ในการยึดเกาะกับเยื่อท่อน้ำดี⁶ นอกจากนี้ Thuwajit และคณะพบว่า

สารที่ปล่อยจากตัวพยาธิ (excretory-secretory products) สามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (NIH-3T3) ให้มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นด้วย¹¹ แสดงให้เห็นว่าสารที่ปล่อยจากตัวพยาธิมีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (mitogen) ทำให้สามารถนำไปอธิบายกลไกการเพิ่มจำนวนมากขึ้นของเนื้อเยื่อท่อน้ำดีจากการติดพยาธิใบไม้ตับได้

2. กระบวนการอักเสบจากปฏิสัมพันธ์ระหว่าง การติดพยาธิใบไม้ตับ และโฮสต์

นอกจากพยาธิใบไม้ตับจะสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อท่อน้ำดีได้แล้วยังมีรายงานว่ามีการตรวจพบแอนติเจนของพยาธิในเนื้อตับรอบๆ ท่อน้ำดีทั้งบริเวณรอบๆ ท่อน้ำดีใหญ่ที่มีตัวพยาธิ และท่อน้ำดีเล็กที่ไม่มีตัวพยาธิ โดยตรวจพบตั้งแต่วันที่ 3 ของการติดพยาธิ¹² อาจเป็นไปได้ว่าแอนติเจนของพยาธิสามารถไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ด้านเซลล์ มีการสะสมของเซลล์อักเสบ และเกิดกระบวนการอักเสบตามมา และเมื่อติดพยาธิเรื้อรังก็ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งได้¹³ โดยจากการศึกษาของ Pinlaor และคณะ พบว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นเซลล์แมคโครเฟจ (RAW 264.7 macrophage cell line) ให้มีการแสดงออกของ TLR-2, iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบสูงขึ้น ซึ่งคณะผู้วิจัยเชื่อว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับนั้นกระตุ้นการอักเสบผ่าน TLRs ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ NF-κB จึงทำให้มีการแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้น แล้วทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระที่เรียกว่าไนตริกออกไซด์ (NO) เพิ่มขึ้น^{14,15} การศึกษาในสัตว์ทดลองก็ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งพบว่ามี การสร้างอนุมูลอิสระ NO เพิ่มขึ้นมากกว่าคนที่ไม่ติดพยาธิ¹⁶ โดย NO เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งผ่านกระบวนการอักเสบเรื้อรัง¹⁷

3. DNA ที่เสียหายเป็นกุญแจสำคัญในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจากกระบวนการอักเสบ

ในการติดพยาธิใบไม้ตับนั้น NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์อักเสบนอกจากจะสามารถทำลายพยาธิได้แล้วยังสามารถทำให้เกิดความเสียหายแก่สารพันธุกรรม (DNA) ได้อีกด้วย โดยข้อมูลนี้ได้จากการตรวจพบ 8-oxodG และ 8-nitroguanine ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดความผิดปกติของ DNA ที่เกิดจากภาวะเครียดแบบออกซิเดชันและไนเตรชัน (oxidative and nitrative stress) ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ^{19,20} โดยในปี ค.ศ. 2004 Pinlaor และคณะพบว่ามี การสร้าง 8-oxodG

และ 8-nitroguanine ที่เยื่อผิวของท่อทางเดินน้ำดีและเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับโดยจะพบ 8-oxodG สะสมมากในการติดเชื้อมาตรฐานและพบ 8-nitroguanine มากในการติดเชื้อมาตรฐาน¹⁵ ซึ่งอธิบายได้โดยการติดพยาธิใบไม้ตับในเยื่อผนังนั้นเซลล์อักเสบที่พบจะเป็นชนิด eosinophil และ neutrophil เป็นส่วนใหญ่^{21, 22} จะสร้างสารอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน เช่น superoxide anion ออกมาและถูกเปลี่ยนเป็น H_2O_2 และ hydroxyl free radical ตามลำดับและทำให้เกิด 8-oxodG^{23, 24} ส่วนการติดเชื้อมาตรฐานนั้นจะเริ่มมีการสร้าง NO เพิ่มขึ้นและปริมาณ NO ที่สร้างเพิ่มขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์กับการพบเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells ตรงบริเวณที่ติดพยาธิ และ NO ที่สร้างขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ superoxide anion ทำให้เกิดการสร้าง peroxynitrite ซึ่งสามารถไปทำลาย DNA ทำให้เกิดได้ทั้ง 8-oxodG และ 8-nitroguanine^{25, 26} โดยเฉพาะการติดพยาธิซ้ำๆ ซากๆ เพราะเมื่อมีการติดพยาธิซ้ำๆ ก็จะทำให้เกิดความผิดปกติของ DNA เพิ่มขึ้นทุกครั้ง และตรวจพบการสะสมของ DNA ที่ผิดปกติได้เร็วกว่าการติดพยาธิจำนวนครั้งน้อยกว่า²⁷ แต่เมื่อให้ยาฆ่าพยาธิแล้ว DNA ที่ผิดปกติทั้ง 8-oxodG และ 8-nitroguanine ก็หายไปหรือกลับมาเป็นปกติ²⁸ ผลการศึกษาในคนโดยตรวจวัดปริมาณ 8-oxodG ในปัสสาวะของคนที่ติดพยาธิทั้งก่อนและหลังให้ยารักษา ก็ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์ทดลอง²⁹ นอกจากนี้ peroxynitrite ที่เกิดขึ้นยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation)^{30, 31} ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมันนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด etheno DNA adducts ได้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่างๆ มากมายรวมถึงมะเร็งได้ด้วย ซึ่งในปี ค.ศ. 2008 Dechakhamphu และคณะ พบว่าผู้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรังมีการปริมาณของ etheno DNA adducts ออกมากับปัสสาวะมากกว่าคนปกติ 3-4 เท่า และเมื่อให้ยาพาราซิควอนเทลเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า etheno DNA adducts ในปัสสาวะมีปริมาณลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าการติดพยาธิใบไม้ตับนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด etheno DNA adducts ได้และเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็งที่เหนี่ยวนำจากการติดเชื้อมาตรฐานด้วย³² ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าคนที่ติดพยาธิซ้ำๆ ซากๆ มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งที่เหนี่ยวนำมากกว่าคนที่ติดพยาธิครั้งเดียว

นอกจากนี้ NO ที่เพิ่มสูงขึ้นจากการติดพยาธิจะเกิด endogenous nitrosation กับสาร secondary amine ได้ในบริเวณที่เกิดกระบวนการอักเสบ^{16, 33, 34} และได้สารที่เป็นพิษซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งชนิดไนโตรซามีน คือ N-nitrosodimeth-

ylamine (NDMA) และเมื่อให้ยารักษาพยาธิไปแล้ว 4 เดือน สารก่อมะเร็งที่เกิดขึ้นเองในร่างกายจากปฏิกิริยาร่วมกันของการสลายตัวของไฮดรอกซีต่อพยาธินี้ก็มีความเข้มข้นลดลง³⁵ ผลของการศึกษาในคนครั้งนี้สนับสนุนการทดลองในสัตว์ทดลองเมื่อป้อนหนูด้วยระยะติดต่อ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับร่วมกับให้สารก่อมะเร็ง NDMA ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งที่เหนี่ยวนำได้^{36, 37} นอกจากนี้สาร NDMA ที่เกิดขึ้นสามารถเมแทบอลิซึมต่อไปอีก โดยเอ็นไซม์ CYP450 ทำให้เกิดเป็นสารก่อมะเร็ง (ultimate carcinogen) ที่สามารถไปเติมหมู่เมทิลให้กับ DNA ได้^{38, 39}

4. ออกซิเดชันของโปรตีน และลิพิด เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งที่เหนี่ยวนำโดยน้ำดี

กระบวนการอักเสบสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS และ RNS ได้ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น DNA ได้นั้น ยังสามารถไปทำให้เกิดปฏิกิริยากับกลุ่มโปรตีน และลิพิดอีกด้วย เช่น ทำให้เกิดโปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl)⁴⁰ ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนเปลี่ยนแปลง และสูญเสียหน้าที่ปกติไป จากการศึกษาโดย Thanan และคณะพบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งมีโปรตีนคาร์บอนิลประมาณ 40 ชนิดที่มีระดับสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็ง กลุ่มที่มีระดับสูงมาก ได้แก่ carbonylated serotransferrin, carbonylated heat shock protein 70 kDa protein 1 (HSP70.1) และ carbonylated α 1-antitrypsin (A1AT) ซึ่งทั้ง carbonylated serotransferrin, carbonylated HSP70.1 และ carbonylated A1AT มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยด้วย นอกจากนี้ยังพบมีการสะสมของธาตุเหล็กสูงในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติและพบสูงในบริเวณที่มี carbonylated serotransferrin สูง และที่สำคัญคือในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มี carbonylated serotransferrin จะพบธาตุเหล็กปริมาณสูงกว่าเนื้อเยื่อมะเร็งที่ไม่มี carbonylated serotransferrin อีกด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่าการที่เกิดกระบวนการ carbonylation ของ serotransferrin จากการเกิดภาวะเครียดออกซิเจนจากการอักเสบ ทำให้ serotransferrin สูญเสียหน้าที่ไป ดังนั้นทำให้ธาตุเหล็กออกมาสู่เนื้อเยื่อมากขึ้น จึงกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดแบบออกซิเดชันผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Fenton reaction ทำให้เกิด carbonylation ของ HSP70.1 และ A1AT ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทต่อกระบวนการด้านภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจนและยับยั้งเอ็นไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) การที่โปรตีนทั้งสองตัวนี้เกิดการสูญเสีย

การทำหน้าที่ไป ส่งผลให้มะเร็งท่อน้ำดีเข้าสู่ระยะก้าวหน้า (progression) และระยะลุกลาม (metastasis) ได้ดียิ่งขึ้น⁴⁰

นอกจากนี้ ROS และ RNS ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอักเสบยังสามารถทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชันของลิพิดที่มีผลต่อเซลล์ทั้งแบบทางอ้อม เช่น etheno DNA adducts ซึ่งเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง lipid peroxidation product และเบสบนสาย DNA และที่มีผลทางตรงคือสามารถออกซิไดซ์คอเลสเตอรอลด้วยโดยผลผลิตที่เกิดขึ้นเรียกว่า oxysterols ซึ่งการศึกษาจำนวนมากพบว่า oxysterols มีความสามารถทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้ อาทิเช่น โรคหัวใจ และหลอดเลือด อัลไซเมอร์ กระดูกพรุน และมะเร็ง เป็นต้น สำหรับในมะเร็งท่อน้ำดี ที่เกิดจากการติดพยาธิใบไม้ตับ จากการศึกษาของ Jusakul และคณะพบว่า มี oxysterols จำนวน 5 ชนิดในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี แต่มีเพียง 2 ชนิดที่พบสูงอย่างมีนัยสำคัญ คือ 3-keto-cholest-4-ene (3K4) และ cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (Triol) โดยได้ทำการศึกษายาทของ 3K4 และ Triol ต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า 3K4 และ Triol สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ท่อน้ำดีปกติ (cholangiocytes, MMNK-1 cells) และสามารถกระตุ้นให้เกิดความเสียหายแก่ DNA ของเซลล์ท่อน้ำดีโดยทำให้เกิด DNA adducts แบบ etheno dA, etheno dC และ 8-oxodG เป็นต้น ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวจึงอาจเป็นไปได้ว่า 3K4 และ Triol ที่เกิดขึ้นจากการอักเสบเรื้อรังจากการติดพยาธิใบไม้ตับ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA และถ้า DNA ที่ผิดปกตินี้ไม่สามารถซ่อมแซมได้จะทำให้เซลล์ท่อน้ำดีเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ผิดปกติและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งกลายเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในที่สุด⁴¹

5. การเกิดพังผืดรอบท่อน้ำดีเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

จากการศึกษาของ Prakobwong และคณะในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับพบว่าการเกิดพังผืดหรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดี (periductal fibrosis) เกิดแบบขึ้นอยู่กัระยะเวลา (time dependent) ซึ่งผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าการเกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์นี้มีความเกี่ยวข้องกับระยะเวลาของการอักเสบที่เกิดจากการติดพยาธิใบไม้ตับ⁴² โดยเมื่อให้ยาฆ่าพยาธิในสัตว์ทดลองที่ติดพยาธิในระยะเฉียบพลัน ในวันที่ 21 และในระยะเรื้อรังที่ 4 เดือน พบว่ารอยโรค หรือพังผืดรอบท่อน้ำดีหลังการรักษาในระยะเรื้อรังยังคงอยู่ หรือสลายไม่หมดแม้กำจัดพยาธิออกไปแล้ว⁴³ ในเวลาต่อมา Prakobwong และคณะก็พบว่าในหนูที่ให้สาร NDMA ร่วมกับการติดพยาธิใบไม้ตับเพื่อเหนี่ยวนำ

ให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการก่อมะเร็งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการเกิดพังผืดรอบท่อน้ำดีซึ่งจะพบได้มากกว่าในหนูกลุ่มอื่นๆ คือกลุ่มที่ติดพยาธิใบไม้ตับหรือให้สาร NDMA เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่า MMP-9 ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์นั้นยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน Rac1 ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของ DNA ผ่านทางภาวะเครียดแบบออกซิเดชันและไนเตรชันซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้อีกด้วย⁴⁴ และเมื่อนำตัวบ่งชี้ของการเกิดพังผืดรอบท่อน้ำดีที่พบในหนู ได้แก่ hydroxyproline, collagen I และ MMP7 มาประเมินเพื่อแยกระดับของความผิดปกติของระบบทางเดินน้ำดีในผู้ป่วย พบว่าสามารถตรวจแยกโรคได้ตามระดับความรุนแรงของการผิดปกติของระบบทางเดินน้ำดี⁴⁵ สำหรับในคน การศึกษาโดย Sripa และคณะพบว่าจากการติดพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นให้ระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ คือ IL-6 มีระดับสูงขึ้นและระดับไซโตไคน์ที่เพิ่มสูงขึ้นนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดพังผืดรอบท่อน้ำดีในผู้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับโดยผู้ที่มีระดับ IL-6 สูงจะมีโอกาสในการเกิดพังผืดรอบท่อน้ำดีได้มากกว่าผู้ที่มีระดับ IL-6 ต่ำ⁴⁶ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ อีกที่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าพังผืดรอบท่อน้ำดีนั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี จะเห็นได้ว่าการติดพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรังนั้นสามารถทำให้เกิดการสะสมของพังผืดรอบท่อน้ำดี และมีผลกระทบต่อระบบทางเดินน้ำดีให้ผิดปกติซึ่งอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีอีกทางหนึ่ง

6. กลไกอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

กลไกอื่นๆ ที่เชื่อว่ามีส่วนในการก่อมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ epigenetic change เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell) และ micro RNA (miRNAs) เป็นต้น epigenetic change คือ การเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่เป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม โดยมีกระบวนการที่สำคัญ คือ DNA methylation ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการดัดแปลงเบสไซโตซีนที่อยู่ด้านปลาย 5' ของกวานีน (CpG) โดยมีการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) ที่ CpG ซึ่งพบมากบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ โดยอาจจะมีการเติมมากขึ้น (hypermethylation) เช่น tumor suppressor gene หรือเติมน้อยลง (hypomethylation) เช่น oncogene ทำให้การแสดงออกของยีนลดลงหรือมากขึ้นตามลำดับ^{47,48} จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า DNA methylation มีบทบาทในการก่อมะเร็งหลายชนิด สำหรับในมะเร็งท่อน้ำดีนั้น epigenetic change นั้นพบว่าส่วนใหญ่เกิดจาก

กระบวนการ hypermethylation ของ tumor suppressor genes และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ การซ่อมแซม DNA และกระบวนการตายแบบ apoptosis เป็นต้น⁴⁹

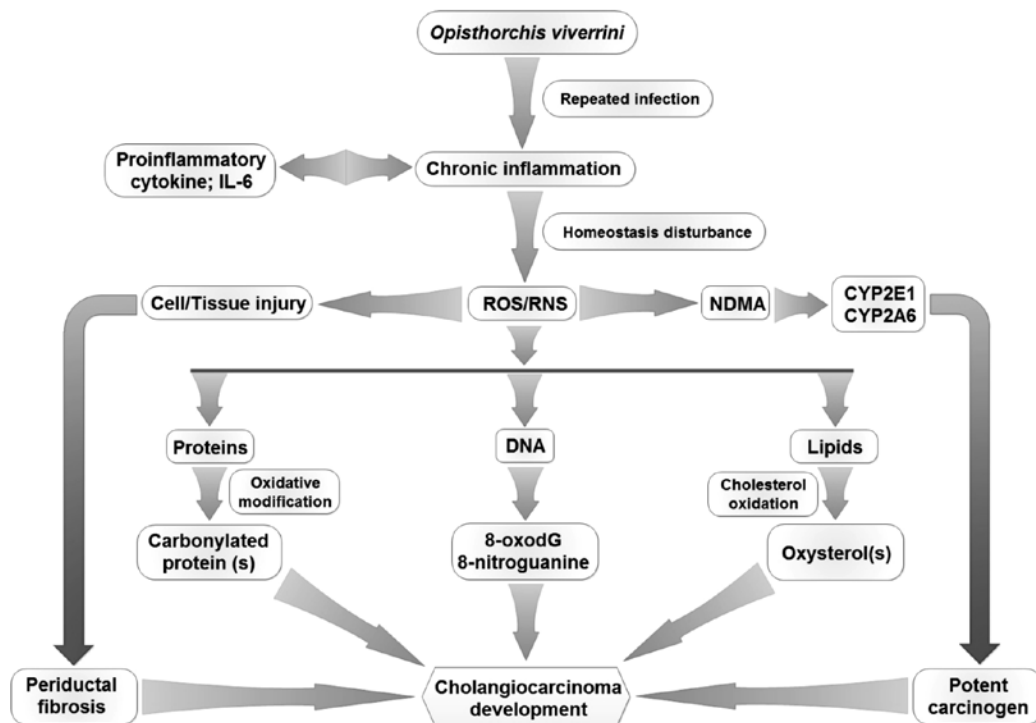
เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เป็นแนวคิดใหม่ ที่เชื่อว่าในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เป็นมะเร็งจะมีเซลล์กลุ่มหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ต้นกำเนิด คือ เมื่อแบ่งตัวแล้วสามารถย้อนกลับมาเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเดิมได้ (self-renewal) สามารถแบ่งตัวเป็นเซลล์ได้หลายชนิดและทำให้มะเร็งเจริญมากขึ้น⁵⁰ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ มะเร็งรังไข่ มะเร็งตับอ่อน มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น แต่สำหรับมะเร็งท่อน้ำดียังมีการศึกษาน้อย เมื่อไม่นานมานี้ Wang⁵¹ และคณะได้ทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของมะเร็งท่อน้ำดีชนิดนอกตับได้สำเร็จ แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งท่อน้ำดียังต้องมีการศึกษาต่อไป

miRNAs เป็นสาย RNA สั้นสั้นๆ ขนาด 20-22 นิวคลีโอไทด์ ค้นพบครั้งแรกโดย Lee และคณะในหนอนพยาธิ *Caenorhabditis elegans*⁵² ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเข้าไปจับกับ mRNA ที่ตำแหน่งที่เป็นคู่สมกัน ซึ่งทำให้กระบวนการแปลรหัสของสาย mRNA นั้นถูกยับยั้ง⁵³ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า miRNAs นั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งตับอ่อน มะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ มะเร็งตับ เป็นต้น⁵⁴ สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี Chen และคณะได้ทำการศึกษา miRNAs ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดในตับ พบว่ามี miRNAs ประมาณ 38 ชนิดที่มีการแสดงออกแตกต่างจากเซลล์ปกติ⁵⁵ ในปี ค.ศ. 2009 Selaru และคณะพบว่า miR-21 มีการแสดงออกสูงขึ้นในมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งส่งผลให้มีการแสดงออกของ programmed cell death 4 (PDCD4) และ tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP3) ลดลง ส่งผลให้เกิดการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดี⁵⁶

นอกจากนี้ Zhang และคณะก็ยังพบว่าระดับ miR-26a สูงขึ้นในมะเร็งท่อน้ำดีและมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดีได้อีกด้วย⁵⁷ โดยรายละเอียดจะได้กล่าวในบทต่อไป

สรุป

การติดพยาธิใบไม้ตับในระยะเฉียบพลันทำให้เกิดกระบวนการอักเสบและทำลายเซลล์ตับ ในระยะเรื้อรังเกิดกระบวนการอักเสบแบบเรื้อรังและการหนาตัวของท่อทางเดินน้ำดี กระบวนการอักเสบแบบเรื้อรังโดยเฉพาะการติดพยาธิซ้ำๆ ซากๆ มีการสร้างอนุมูลอิสระทั้งชนิดออกซิเจนและไนโตรเจนเพิ่มขึ้น และการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระลดลงแล้วทำให้เกิดภาวะเครียดแบบออกซิเดชันและไนเตรชันแล้วทำให้เกิดความเสียหายแก่สารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น DNA โปรตีน ไขมัน เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีตามมา นอกจากนี้การอักเสบที่เกิดขึ้นยังสามารถกระตุ้นให้เกิดพังผืดรอบท่อน้ำดี ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีเช่นกัน จากการศึกษาในปัจจุบันยังพบว่ากลไกอื่นๆ ก็มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด การพัฒนา และ/หรือการเจริญมะเร็งท่อน้ำดี เช่น epigenetic change เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และ microRNA เป็นต้น จากปัจจัยดังกล่าวทำให้เราเข้าใจกลไกในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมากขึ้น ซึ่งสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีป้องกันและรักษามะเร็งท่อน้ำดีได้ กลไกต่างๆ ดังที่กล่าวมาดังสรุปไว้ในรูปภาพที่ 1 ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มีสาเหตุจากโรคพยาธิใบไม้ตับที่สำคัญคือการ **ลด ละ เลิก** อุปนิสัยการรับประทานปลาน้ำจืดสุกๆ ดิบๆ เช่น ปลาช่อนน้อย ปลาช่อนนา เป็นต้น ซึ่งจะมีระยะติดต่อของพยาธิและเสี่ยงต่อการติดพยาธิ ถ้าคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงจะติดพยาธิ ก็ควรนำอุจจาระไปตรวจเพื่อหาไข่ของพยาธิ เพื่อจะได้รีบทำการรักษาและหายขาดจากโรคพยาธิ และไม่รับประทานปลาดิบอีก



รูปที่ 1 กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (ปรับปรุงจาก Yongvanit และคณะ)¹⁹

กิตติกรรมประกาศ

นายกิตติ อินทุยศ ได้รับทุนสนับสนุนจากทุน คปท. รุ่นที่ 13 (PHD/0166/2553) สมชาย ปิ่นละออ และ พวงรัตน์ ยงวนิชย์ ได้รับสนับสนุนโดยทุน The Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Health Cluster (SHeP-GMS), and Thailand Research Fund, Thailand.

เอกสารอ้างอิง

1. IARC. OPISTHORCHIS VIVERRINI AND CLONORCHIS SINENSIS. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2011; 100:342-70.
2. Jongsuksuntigul P, Imsomboon T. Opisthorchiasis control in Thailand. Acta Trop 2003; 88:229-32.
3. Saowakontha S, Pipitgool V, Pariyanonda S, Tesana S, Rojsathaporn K, Intarakhao C. Field trials in the control of *Opisthorchis viverrini* with an integrated programme in endemic areas of northeast Thailand. Parasitology 1993; 106:283-8.
4. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. PLoS Med 2007; 4:e201.
5. Sriamporn S, Pisani P, Pipitgool V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard S, Parkin DM. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. Trop Med Int Health 2004; 9:588-94.
6. Bhamarapravati N, Thammavitt W, Vajrasthira S. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. Am J Trop Med Hyg 1978; 27:787-94.
7. Viranuvatti V, Stitnimankarn T. Liver fluke infection and infestation in Southeast Asia. Prog Liver Dis 1972; 4:537-47.
8. Hutadilok N, Ruenwongsa P. Liver collagen turnover in hamsters during infection by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Mol Biochem Parasitol 1983; 8:71-7.
9. Harinasuta T, Riganti M, Bunnag D. *Opisthorchis viverrini* infection: pathogenesis and clinical features. Arzneimittelforschung 1984; 34:1167-9.
10. Riganti M, Pungpak S, Punpoowong B, Bunnag D, Harinasuta T. Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1989; 20:95-100.

11. Thuwajit C, Thuwajit P, Kaewkes S, Sripa B, Uchida K, Miwa M, et al. Increased cell proliferation of mouse fibroblast NIH-3T3 in vitro induced by excretory/secretory product (s) from *Opisthorchis viverrini*. Parasitology 2004; 129:455-64.
12. Sripa B, Kaewkes S. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. Int J Parasitol 2000; 30:735-40.
13. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res 1994; 305:253-64.
14. Ohshima H, Bandaletova TY, Brouet I, Bartsch H, Kirby G, Ogunbiyi F, et al. Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). Carcinogenesis 1994; 15:271-5.
15. Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, et al. Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. Nitric Oxide 2004; 11:175-83.
16. Haswell-Elkins MR, Satarug S, Tsuda M, Mairiang E, Esumi H, Sithithaworn P, et al. Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. Mutat Res 1994; 305:241-52.
17. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3:276-85.
18. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science 1991; 254:1001-3.
19. Yongvanit P, Pinlaor S, Bartsch H. Oxidative and nitrative DNA damage: key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis. Parasitol Int 2012; 61:130-5.
20. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. Biol Chem 2006; 387:365-72.
21. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. Pharmacol Rev 1999; 51:213-340.
22. Nathan C. Immunology: Oxygen and the inflammatory cell. Nature 2003; 422:675-6.
23. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. Mutat Res 1999; 443:37-52.
24. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. Mutat Res 2001; 488:65-76.
25. Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. Carcinogenesis 1995; 16:2045-50.
26. Burney S, Niles JC, Dedon PC, Tannenbaum SR. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. Chem Res Toxicol 1999; 12:513-20.
27. Pinlaor S, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, et al. Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. Carcinogenesis 2004; 25:1535-42.
28. Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, Tada-Oikawa S, Ma N, Pinlaor P, et al. iNOS-dependent DNA damage via NF-kappaB expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. Int J Cancer 2006; 119:1067-72.
29. Thanan R, Murata M, Pinlaor S, Sithithaworn P, Khuntikeo N, Tangkanakul W, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and effect of antiparasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17:518-24.
30. Darley-usmar VM, Hogg N, O'leary VJ, Wilson MT, Moncada S. The Simultaneous Generation of Superoxide and Nitric Oxide Can Initiate Lipid Peroxidation in Human Low Density Lipoprotein. Free Radical Research 1992; 17:9-20.
31. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys 1991; 288:481-7.
32. Dechakhamphu S, Yongvanit P, Nair J, Pinlaor S, Sithithaworn P, Bartsch H. High excretion of etheno adducts in liver fluke-infected patients: protection by praziquantel against DNA damage. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17: 1658-64.
33. Satarug S, Haswell-Elkins MR, Tsuda M, Mairiang P, Sithithaworn P, Mairiang E, et al. Thiocyanate-independent nitrosation in humans with carcinogenic parasite infection. Carcinogenesis 1996; 17:1075-81.
34. Srivatanakul P, Ohshima H, Khat M, Parkin M, Sukaryodhin S, Brouet I, et al. *Opisthorchis viverrini* infestation and endogenous nitrosamines as risk factors for cholangiocarcinoma in Thailand. Int J Cance. 1991; 48:821-5.

35. Satarug S, Haswell-Elkins MR, Sithithaworn P, Bartsch H, Ohshima H, Tsuda M, et al. Relationships between the synthesis of N-nitrosodimethylamine and immune responses to chronic infection with the carcinogenic parasite, *Opisthorchis viverrini*, in men. *Carcinogenesis*. 1998; 19:485-91.
36. Flavell DJ, Lucas SB. Promotion of N-nitrosodimethylamine-initiated bile duct carcinogenesis in the hamster by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Carcinogenesis*. 1983; 4:927-30.
37. Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1978; 38:4634-9.
38. Kirby GM, Pelkonen P, Vatanasapt V, Camus AM, Wild CP, Lang MA. Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol Carcinog* 1994; 11:81-9.
39. Satarug S, Lang MA, Yongvanit P, Sithithaworn P, Mairiang E, Mairiang P, et al. Induction of cytochrome P450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasite infection, opisthorchiasis viverrini. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:795-800.
40. Thanan R, Oikawa S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Pinlaor S, et al. Inflammation-induced protein carbonylation contributes to poor prognosis for cholangiocarcinoma. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:1465-72.
41. Jusakul A, Loilome W, Namwat N, Haigh WG, Kuver R, Dechakhamphu S, et al. Liver fluke-induced hepatic oxysterols stimulate DNA damage and apoptosis in cultured human cholangiocytes. *Mutat Res* 2012; 731:48-57.
42. Prakobwong S, Pinlaor S, Yongvanit P, Sithithaworn P, Pairojkul C, Hiraku Y. Time profiles of the expression of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, cytokines and collagens in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* with special reference to peribiliary fibrosis and liver injury. *Int J Parasitol* 2009; 39:825-35.
43. Pinlaor S, Prakobwong S, Boonmars T, Wongkham C, Pinlaor P, Hiraku Y. Effect of praziquantel treatment on the expression of matrix metalloproteinases in relation to tissue resorption during fibrosis in hamsters with acute and chronic *Opisthorchis viverrini* infection. *Acta Trop* 2009; 111:181-91.
44. Prakobwong S, Yongvanit P, Hiraku Y, Pairojkul C, Sithithaworn P, Pinlaor P, et al. Involvement of MMP-9 in peribiliary fibrosis and cholangiocarcinogenesis via Rac1-dependent DNA damage in a hamster model. *Int J Cancer* 2010; 127:2576-87.
45. Prakobwong S, Charoensuk L, Hiraku Y, Pinlaor P, Pairojkul C, Mairiang E, et al. Plasma hydroxyproline, MMP-7 and collagen I as novel predictive risk markers of hepatobiliary disease-associated cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 2011. doi: 10.1002/ijc.26443
46. Sripa B, Mairiang E, Thinkhamrop B, Laha T, Kaewkes S, Sithithaworn P, et al. Advanced periductal fibrosis from infection with the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* correlates with elevated levels of interleukin-6. *Hepatology*. 2009; 50:1273-81.
47. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1148-59.
48. Cooper DN, Gerber-Huber S. DNA methylation and CpG suppression. *Cell Differ* 1985; 17:199-205.
49. Isomoto H. Epigenetic alterations associated with cholangiocarcinoma (review). *Oncol Rep* 2009; 22:227-32.
50. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66:9339-44.
51. Wang M, Xiao J, Shen M, Yahong Y, Tian R, Zhu F, et al. Isolation and characterization of tumorigenic extrahepatic cholangiocarcinoma cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 2011; 128:72-81.
52. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843-54.
53. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136: 215-33.
54. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 199-227.
55. Chen L, Yan HX, Yang W, Hu L, Yu LX, Liu Q, et al. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2009; 50:358-69.
56. Selaru FM, Olaru AV, Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, et al. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology* 2009; 49:1595-601.
57. Zhang J, Han C, Wu T. MicroRNA-26a Promotes Cholangiocarcinoma Growth by Activating beta-catenin. *Gastroenterology*. 2012. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.045

