

สารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดี: สถานภาพปัจจุบัน

อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์^{1,2}, ศิริพร ปรงวิทยา^{2,3}, กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ^{1,2}, ชัยศิริ วงศ์คำ^{1,2}, โสพิศ วงศ์คำ^{1,2*}

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Biomarkers in Bile Duct Cancers: Current Status

Atit Silsirivanit^{1,2}, Siriporn Prongvitaya^{2,3}, Kanlayanee Sawanyawisuth^{1,2}, Chaisiri Wongkham^{1,2}, Sopit Wongkham^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

²Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Thailand

³Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

แม้ปัจจุบันจะมีการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคโนโลยีขั้นสูง เช่น อัลตราซาวด์ การถ่ายภาพรังสีคอมพิวเตอร์ การเจาะชิ้นเนื้อมะเร็ง และการตรวจเซลล์มะเร็งในน้ำดีที่เก็บผ่านการส่องกล้อง แต่จำนวนผู้ป่วยที่เข้าถึงการตรวจเหล่านี้มีค่อนข้างจำกัดทั้งด้วยราคาและความเสี่ยงจากการตรวจ ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ชีวภาพจากซีรัมจึงยังเป็นการตรวจมาตรฐานสำหรับวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีโดยทั่วไปซึ่งสามารถใช้ได้ติดตามผลการรักษา การพยากรณ์โรคและบ่งบอกการเกิดซ้ำของมะเร็งด้วย สารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีมีหลากหลาย แต่ละชนิดให้ค่าการตรวจวินิจฉัยที่แตกต่างกันขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยเฉพาะกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่าการตรวจวินิจฉัยเนื่องจากปัจจัยเสี่ยงและการก่อมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่างจากประเทศอื่น สารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีที่เหมาะสมกับผู้ป่วยไทยจึงควรพิจารณาเลือกจากการศึกษาที่ใช้ผู้ป่วยไทยและกลุ่มควบคุมที่ครอบคลุมผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและผู้ที่มีพยาธิใบไม้ตับซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย เช่น MUC5AC และ CA-S121 เป็นต้น การเลือกใช้สารบ่งชี้ชีวภาพหลายชนิดร่วมกับข้อมูลวินิจฉัยอื่นประกอบจะช่วยให้เพิ่มความเชื่อมั่นในการแปลและรายงานผล ซึ่งต้องคำนึงถึงความถูกต้องในการเก็บและรักษาตัวอย่าง และการควบคุมคุณภาพของภาควิเคราะห์

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำดี ตัวบ่งชี้ชีวภาพ สารบ่งชี้มะเร็ง

Although at present, there are several advanced techniques for demonstrating cholangiocarcinoma (CCA), e.g., ultrasonography and CT scanning; cytology and brushings done at the time of endoscopic retrograde cholangiography to demonstrate the present of tumor cells in bile; and fine needle aspiration to establish tumors. However, these techniques establish the diagnosis of CCA in only a minority of patients due to the cost and risk from taking samples. Therefore, the availability of a formal proof of malignancy such as serum markers is still a constant goal in the diagnosis of CCA. There are a number of biomarkers in serum for demonstrating CCA which can also be used as markers for monitoring, prognosis and recurrence of cancer. Each biomarker provides different diagnostic values based on the composition of the control group used in the study. Since the risk and etiology of CCA in Thai patients are different from other countries, the appropriate biomarker for CCA in Thai patients should be considered using the Thai cohort, of which patients with benign biliary diseases and liver fluke infection persons were included as the control group, e.g., MUC5AC and CA-S121. Using combination of biomarkers together with other investigations will increase the power and accuracy of CCA diagnosis. The appropriate sample collection, storage and the quality control of the tests are also important for using biomarkers to differentiate CCA.

Keywords: cholangiocarcinoma, bile duct, tumor marker, serum marker

บทนำ

การวินิจฉัยมะเร็งที่ให้ผลแม่นยำที่สุดคือการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา แต่การได้ชิ้นเนื้อเพื่อวินิจฉัยจากการผ่าตัดหรือการตัดชิ้นเนื้อ (tissue biopsy) มีความเสี่ยงสูง ดังนั้นก่อนที่จะแพทย์จะวินิจฉัยมะเร็งจากชิ้นเนื้อ แพทย์จะทำการวินิจฉัยมะเร็งเบื้องต้นด้วยวิธีอื่นที่มีความเสี่ยงต่ำซึ่งมีหลายระดับ มะเร็งบางชนิดสามารถตรวจคัดกรองเบื้องต้นได้ด้วยการจับหรือคลำ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก บางชนิดสามารถสังเกตเห็นได้ เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งในช่องปาก แต่ยังมีมะเร็งอีกหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งที่เกิดกับอวัยวะภายใน เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ มะเร็งปอด มะเร็งตับ และมะเร็งท่อน้ำดี เป็นต้น ที่ต้องอาศัยการวินิจฉัยในระดับที่สูงขึ้นและมีความเสี่ยงต่ำกว่า เช่น การถ่ายภาพรังสี และการตรวจหาตัวบ่งชี้มะเร็งในเลือดหรือน้ำคั่งหลัง ทั้งสองวิธีมีความเสี่ยงต่ำ แต่การถ่ายภาพรังสี มีข้อจำกัดของเครื่องมือที่มีราคาแพง ต้องอาศัยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญในการแปลผลและมีค่าใช้จ่ายในการบริการสูง สำหรับการตรวจหาตัวบ่งชี้มะเร็งในเลือดหรือน้ำคั่งหลังสามารถดำเนินการในห้องเวชศาสตร์ชันสูตรทั่วไปไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แพทย์จึงนิยมใช้ตัวบ่งชี้มะเร็งในการช่วยวินิจฉัยหรือคัดกรองมะเร็งเบื้องต้นก่อนยืนยันผลโดยใช้วิธีที่มีราคาแพงหรือความเสี่ยงสูง

สารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีการพัฒนาตัวช้าแต่มีคุณสมบัติในการแพร่ลุกลามสูง¹ การรักษาที่ดีที่สุดขณะนี้คือการผ่าตัดซึ่งจะได้ผลดีหากตรวจพบมะเร็งได้ตั้งแต่วัยแรก ดังนั้นนักวิจัยได้พยายามอย่างมากที่จะศึกษาและพัฒนาสารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการวินิจฉัย (diagnostic marker) มะเร็งท่อน้ำดีให้มีความจำเพาะ ความไวและความถูกต้องมากที่สุด ผลการศึกษาเกี่ยวกับสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีมีรายงานไม่มากแต่เพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์จึงควรพิจารณาเลือกใช้ให้เหมาะสม สารบ่งชี้ชีวภาพที่ใช้จำแนกผู้ที่เป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ที่ไม่เป็นโรคมียุทธศาสตร์ที่ต่างกัน สามารถพิจารณาจากค่าการตรวจวินิจฉัย (diagnostic values) (ตารางที่ 1) ได้แก่ ค่าความไว (sensitivity, ร้อยละของผู้ป่วยที่การตรวจให้ผลบวกต่อจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษานั้น) ค่าความจำเพาะ (specificity, ร้อยละของคนที่ไม่เป็นโรคที่การตรวจให้ผลลบต่อจำนวนคนที่ไม่เป็นโรคทั้งหมดในการศึกษานั้น) ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV, คือ โอกาสที่คนที่การตรวจให้ผลบวกจะเป็นโรคจริง คำนวณจากสัดส่วนของจำนวนผู้ป่วยที่ผลการตรวจ

เป็นบวกต่อจำนวนคนที่มีผลบวกทั้งหมด) ค่าการทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV, คือ โอกาสที่คนที่การตรวจให้ผลลบจะไม่เป็นโรค คำนวณจากสัดส่วนของจำนวนผู้ที่ไม่เป็นโรคที่มีผลการตรวจเป็นลบต่อจำนวนคนที่มีผลลบทั้งหมด)

ตารางที่ 1 การคำนวณค่าการตรวจวินิจฉัย (calculation of diagnostic values)

| | Biomarker | | Total | Diagnostic values |
|----------|-----------|----------|-------|--|
| | Negative | Positive | | |
| Controls | A | B | A+B | Sensitivity = D / (C + D) Specificity = A / (A + B) |
| Patients | C | D | C+D | PPV = B / (B + D) |
| Total | A+C | B+D | | NPV = A / (A + C) |

การจะเลือกใช้สารบ่งชี้ชีวภาพตัวใดนั้นนิยมพิจารณาจากค่าการตรวจวินิจฉัย ซึ่งต้องพิจารณาให้ละเอียดถึงข้อจำกัดและเงื่อนไขในการได้มาซึ่งค่าการตรวจวินิจฉัยนั้น ซึ่งนอกจากขึ้นกับจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแล้วยังขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการศึกษานั้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากค่าความจำเพาะของการตรวจขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาเป็นกลุ่มควบคุมในการศึกษานั้น ความจำเพาะที่ได้จากการทดสอบหนึ่งๆ จึงเป็นค่าที่ใช้ได้เฉพาะกลุ่มควบคุมนั้นๆ และอาจเปลี่ยนไปเมื่อใช้กับกลุ่มควบคุมอื่น สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี กลุ่มตัวอย่างที่เป็นกลุ่มควบคุมที่เหมาะสมคือ คนปกติและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่ตับและท่อน้ำดีที่ไม่ใช่มะเร็งท่อน้ำดี รวมถึงคนที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย และผู้ที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดีและตับที่ไม่ใช่มะเร็ง (benign liver diseases, BLD) เช่น cirrhosis primary sclerosing cholangitis (PSC), primary biliary cirrhosis (PBC) และ cholestasis ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในยุโรป เป็นต้น

สารบ่งชี้ชีวภาพในซีรัมที่นิยมใช้เพื่อประกอบการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบันมีหลายชนิด แต่ละชนิดให้ค่าความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน² (ตารางที่ 2) เช่น หมู่เนื้องอกจำเพาะ ได้แก่ คาร์ซิโนเอมโบรนิคแอนติเจน (carcinoembryonic antigen, CEA) และคาร์โบไฮเดรตแอนติเจน 19-9 (carbohydrate antigen 19-9; CA 19-9), total sialic acid (TSA) และ คาร์โบไฮเดรตแอนติเจน-S121 (carbohydrate antigen-S121; CA-S121) กลุ่มเอ็นไซม์ ได้แก่ Matrix metalloproteinase-7 (MMP7), Biliary alkaline phosphatase (BALP), และ Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) และมิวซิน MUC5AC เป็นต้น

ตารางที่ 2 สารบ่งชี้ชีวภาพในซีรัม (serum markers reported for cholangiocarcinoma)

| Serum markers | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) | Composition of the Controls | Ref. |
|---------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|-----------------------------|-------|
| CEA (cut off 22 ug/ml) | 53-69 | 82-86 | 59 | 87 | BLD, HE | 3,4 |
| CA19-9 (cut off 100 U/ml) | 53-79 | 81-99 | 44-72 | 72-99 | BLD, HE | 3-7 |
| MMP7 (cut off 5.5 ng/ml) | 75 | 78 | 61 | 87 | BBD | 8 |
| NGAL (cut off 110 ng/ml) | 76 | 72 | 73 | 75 | BBD | 9 |
| CYFRA 21-1 | 75-87 | 92-95 | * | * | HCC, BLD | 10,11 |
| IL6 | 80 | 98 | 92 | 96 | HCC, MAL, BLD, HE | 12 |
| Periostin | 88 | 89 | 54 | 98 | HCC, MAL, BLD | 13 |
| RCAS1 | 74 | 96 | 77 | 94 | HCC, BLC, HE | 14 |
| TSA | 72-83 | 58-86 | 73-80 | 70-89 | HCC, BLD, HE | 15,16 |
| BALP | 65 | 88 | 65 | 88 | GI-CA, BBD, HE | 17 |
| MUC5AC | 63-71 | 90-97 | 90-93 | 69-79 | GI-CA, BLD, OV, HE | 18,19 |
| CA-S121 | 88 | 90 | 81 | 93 | GI-CA, BBD, OV, HE | 20 |

BBD = benign biliary diseases; BLD = benign liver diseases; GI-CA = gastrointestinal cancer; HCC = hepatoma; HE = healthy person; MAL = malignant; OV = liver fluke infected person

CEA และ CA19-9 เป็นสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีที่นิยมใช้เนื่องจากตรวจพบสารดังกล่าวสูงขึ้นในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับคนปกติและผู้ป่วยกลุ่ม BLD³⁻⁷ อย่างไรก็ตามเราสามารถตรวจพบสารบ่งชี้ชีวภาพทั้งสองชนิดได้ในซีรัมของผู้ป่วยโรคอื่นอีกหลายชนิดเช่นกัน เช่น มะเร็งตับอ่อน^{21, 22} มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งรังไข่²³ และ rheumatoid arthritis²⁴ เป็นต้น จึงไม่สามารถใช้ CEA และ CA19-9 ในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยมะเร็งและโรคเหล่านี้ได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ CEA หรือ CA19-9 จึงควรใช้ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยอื่น เช่น ultrasounography (US), magnetic resonance imaging (MRI), และ computed tomography (CT) เป็นต้น²⁵ นอกจากนี้ Leelawat และคณะ ได้รายงานการเพิ่มสูงขึ้นของเอ็นไซม์ MMP-7 และ NGAL ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับคนปกติและผู้ป่วย BLD โดยมีค่า cutoff ของ MMP-7 ในซีรัม 5.5 ng/ml⁹ และ NGAL ในซีรัมที่ระดับ 110 ng/ml⁹

นอกจากการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยกลุ่ม BLD แล้ว ยังมีสารบ่งชี้ชีวภาพอีกหลายชนิดที่สามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) และมะเร็งอื่นที่แพร่กระจายมาที่ตับ (liver metastatic cancer; LMC) เช่น cytokeratin 19 fragment

(CYFRA21-1) ในซีรัม พบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับ CYFRA21-1 สูงกว่าผู้ป่วยมะเร็งตับ และกลุ่มผู้ป่วย BLD อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 2.7-3 ng/ml^{10,11}

อินเตอร์ลิวคิน 6 (interleukin-6; IL-6) เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่พบสูงขึ้นระหว่างที่มีกระบวนการอักเสบ ซึ่งส่วนใหญ่สร้างจากเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เช่น เม็ดเลือดขาวทั้งชนิด lymphoid (B- และ T-lymphocyte) และ myeloid (neutrophil, monocyte) เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เป็นต้น พบว่าในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีปริมาณ IL-6 เพิ่มขึ้นมากเมื่อเทียบกับคนปกติและผู้ป่วยระบบท่อน้ำดีและมะเร็งตับ โดยมีค่าความไวร้อยละ 73 และความจำเพาะ ร้อยละ 92 ตามลำดับ²⁶ อย่างไรก็ตามเนื่องจาก IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่ถูกสร้างจากเซลล์หลากหลายชนิด ดังนั้นปริมาณ IL-6 ในซีรัมจึงเพิ่มสูงขึ้นได้ในหลายสภาวะ เช่น ผู้สูงอายุ (aging) การติดเชื้อและการอักเสบ (infection and inflammatory) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) ต่อมลูกหมาก (prostate cancer)²⁷⁻²⁹ ดังนั้นการพิจารณาใช้ IL-6 เพื่อการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีข้อจำกัดเนื่องจากสามารถตรวจพบการเพิ่มสูงขึ้นของ IL6 ในผู้ป่วยที่เป็นโรคหรือมีพยาธิสภาพอื่น ที่ไม่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดีอีกจำนวนมาก

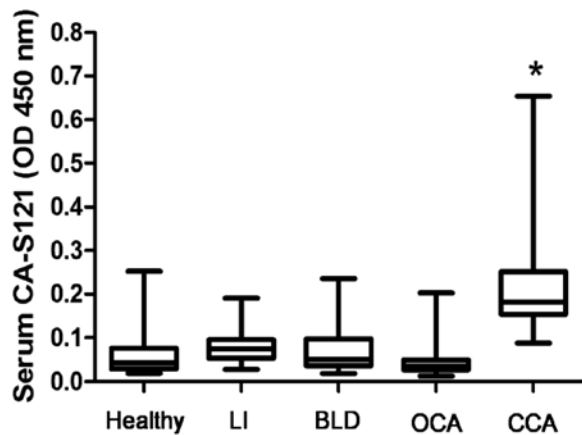
การศึกษาระดับของ periostin และ receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) พบว่า ระดับของสารบ่งชี้ชีวภาพทั้งสองในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับสูงขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติและผู้ป่วยระบบท่อน้ำดีในน้ำดี^{13, 14} อย่างไรก็ตามการศึกษาโดย Enjoji และคณะ³⁰ พบว่านอกจากมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ระดับ RCAS1 ยังสูงขึ้นในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนด้วย นอกจากนี้ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังพบปริมาณ KL-6 mucin และ TSA เพิ่มสูงกว่าคนปกติและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและโรคตับอื่นๆ^{15, 16, 31} โดยมีค่า cutoff ของระดับ KL-6 mucin ที่ 248 U/ml และ TSA ที่ระดับ 2.33 mmole/l²¹

สารบ่งชี้ชีวภาพที่รายงานในปัจจุบัน เช่น อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสที่จำเพาะกับท่อน้ำดี (biliary alkaline phosphatase: BALP) มิวซิน MUC5AC และคาร์โบไฮเดรต แอนติเจน-S121 (CA-S121) สามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพในระบบท่อน้ำดีในน้ำดี มะเร็งตับ และมะเร็งอื่นๆ ในระบบทางเดินอาหาร (other gastrointestinal cancer: GI-CA) ได้ด้วย เช่น มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) เป็นต้น

ALP เป็นเอ็นไซม์ที่พบทั่วไปในเซลล์เยื่อต่างๆ มีหลากหลายชนิด (isoform) แตกต่างกันตามเนื้อเยื่อที่สร้าง ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ ALP โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ALP ชนิดที่จำเพาะกับท่อน้ำดี BALP ซึ่งมักพบในซีรัมของผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อน้ำดีและมีภาวะตัวเหลือง-ตาเหลือง (jaundice) แต่จากการศึกษาโดย Bhudhisawasdi และคณะ¹⁷ พบว่าระดับ BALP เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อเทียบกับคนปกติ ผู้ป่วย BLD และผู้ป่วย GI-CA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยร้อยละ 65 และ 88 ตามลำดับ โดยไม่สัมพันธ์กับภาวะตัวเหลือง-ตาเหลือง ดังนั้นการตรวจระดับ BALP จึงอาจเป็นสารบ่งชี้ที่ใช้ประกอบการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะอุดตันของท่อน้ำดีได้

มิวซิน เป็นไกลโคโปรตีนที่สร้างจากเซลล์เยื่อของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ มีหลายชนิด บางชนิดเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound mucin) บางชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ (secreted mucin) พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีสร้างและหลั่งมิวซินบางชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับท่อน้ำดีปกติ เช่น มิวซิน-1 (MUC1), MUC4, MUC5AC และ MUC6 เป็นต้น MUC5AC เป็นมิวซินคัดหลัง สามารถตรวจพบได้ในสารคัดหลั่ง จากการศึกษามิวซิน MUC5AC

ในซีรัมโดยวิธี western blot พบว่า ซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีมิวซิน MUC5AC ปริมาณสูงกว่าคนปกติ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiasis) และผู้ป่วย BLD นอกจากนี้ปริมาณ MUC5AC ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังสูงกว่าผู้ป่วยมะเร็งอื่นในระบบทางเดินอาหารอย่างมีนัยสำคัญด้วย¹⁹ เนื่องจากการตรวจมิวซิน MUC5AC ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในห้องเวชศาสตร์ชันสูตรทั่วไป จึงมีการพัฒนาชุดตรวจมิวซิน MUC5AC ในซีรัมโดยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)¹⁸ ซึ่งให้ผลดีเช่นเดียวกับการใช้ western blot นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตแอนติเจน-S121 (CA-S121) ซึ่งเป็นหมู่น้ำตาลคาร์โบไฮเดรตบนโมเลกุล MUC5AC การตรวจหา CA-S121 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบ CA-S121 เฉพาะในท่อน้ำดีที่เป็นมะเร็ง ไม่พบในเซลล์ท่อน้ำดีปกติ เซลล์ตับและเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้น CA-S121 จึงมีความจำเพาะสูงต่อมะเร็งท่อน้ำดี การตรวจ CA-S121 ด้วยวิธี lectin sandwich ELISA พบว่า CA-S121 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีปริมาณสูงกว่าคนปกติและผู้ป่วยอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 1) โดยมีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีร้อยละ 88 และ 90 ตามลำดับ²⁰ การตรวจระดับ CA-S121 ในซีรัมจึงเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงในปัจจุบัน



รูปที่ 1 Serum CA-S121 level of cholangiocarcinoma (CCA, N = 97) are higher than those of healthy person (Healthy; N=51), liver fluke infected persons (LI, N = 52), benign liver diseases (BLD; N=43) and Other gastrointestinal cancer patients (OCA; N=41). *(P < 0.001)

สารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการพยากรณ์และติดตามการรักษาโรค (prognostic and monitoring marker)

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่มีอาการแสดงในระยะแรก จึงทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยเมื่อโรคเข้าสู่ระยะท้ายของโรค ซึ่งแนวทางเลือกในการรักษาขึ้นอยู่กับภาวะของโรคและประโยชน์ทางการรักษาที่เหมาะสมของผู้ป่วยแต่ละราย นอกจากนี้พิจารณาจากระยะดำเนินโรค (staging) ของมะเร็งเองแล้ว ยังขึ้นกับผลการรักษาและประสิทธิภาพประสิทธิผลของการรักษานั้น สารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการพยากรณ์โรค เป็นสารบ่งชี้ชีวภาพที่มีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรค สามารถใช้ทำนายทิศทางการดำเนินของโรค เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ช่วยให้แพทย์ตัดสินใจเลือกแนวทางการรักษาที่เหมาะสมต่อภาวะและโรคของผู้ป่วย สารบ่งชี้ชีวภาพที่สัมพันธ์กับมะเร็งโดยตรงนอกจากใช้ติดตามผลการรักษาแล้วยังสามารถใช้บ่งบอกการกลับเป็นซ้ำของโรค (recurrence) ได้ สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีมีสารบ่งชี้ชีวภาพหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการพยากรณ์และติดตามการรักษาโรค (ตารางที่ 3)

ระดับ CA19-9 ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคและอัตราการรอดชีพของป่วยมะเร็งท่อน้ำดี³²⁻³⁴ โดยผู้ป่วยที่มีระดับซีรัม CA19-9 ในซีรัมสูงกว่า 100 U/ml จะมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและอัตราการรอดชีพที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ CA19-9 ต่ำกว่า 100 U/ml^{33, 34} สำหรับ CYFRA21-1

พบว่าปริมาณ CYFRA21-1 ในซีรัมที่สูงกว่า 2.7 ng/ml สัมพันธ์กับขนาดและจำนวนก้อนมะเร็งที่มาก และการแพร่กระจายของมะเร็งในระบบน้ำเหลือง (lymphatic invasion) รวมทั้งอัตราการรอดชีพที่ต่ำ¹¹ ในขณะที่ระดับ MUC5AC และ CA-S121 ในซีรัมที่สูงสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่าระดับ MUC5AC มีความสัมพันธ์กับขนาดก้อนมะเร็งและระยะของโรคที่รุนแรงกว่า^{18, 35, 36} นอกจากนี้ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระดับของ MUC5AC หรือ CA-S121 สูงในซีรัมแสดงถึงพยากรณ์ของโรคที่ไม่ดี โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีอัตราการรอดชีพที่น้อยกว่าผู้ป่วยที่มีสารบ่งชี้ชีวภาพทั้งสองต่ำ^{18, 20, 35, 36}

นอกจากนี้ระดับของ CA-S121, IL-6 และ RCAS1 ในซีรัมยังสัมพันธ์กับผลการรักษา จากการศึกษารายงานของ Cheon และคณะ²⁶ พบว่าระดับ IL-6 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อก่อนมะเร็งมีขนาดลดลงหลังจากที่ได้รับการรักษาด้วยวิธี photodynamic therapy ในทำนองเดียวกันพบว่าระดับ RCAS1 และ CA-S121 ในซีรัมลดลงหลังการผ่าตัดเอาก่อนมะเร็งออก²⁰ โดยผู้ป่วยที่มีระดับ RCAS1 หลังผ่าตัดเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องบ่งชี้ถึงภาวะการกลับเป็นซ้ำของมะเร็ง ดังนั้นจึงอาจใช้ระดับ RCAS1 ในซีรัมในการติดตามการรักษาและเฝ้าระวังการกลับเป็นซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดีได้³⁷

ตารางที่ 3 สารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการพยากรณ์และติดตามโรค (prognostic and monitoring markers)

| Biomarkers | Indicated level | Association | Ref. |
|------------|----------------------------------|---|----------|
| CA19-9 | ≥ 100 U/ml | - Poor prognosis - Low survival rate | 32-34 |
| CYFRA21-1 | ≥ 2.7 ng/ml | - Large tumor size - Number of tumors - Lymphatic invasion - Low survival rate | 11 |
| MUC5AC | WB positive OD. ELISA > 0.074 | - Large tumor size - TNM stage IVA-B - Low survival rate | 18,35,36 |
| CA-S121 | OD. ELISA > 0.23 | - Decrease after tumor removal - Low survival rate | 28 |
| IL-6 | | - Decreased after photodynamic therapy | 26 |
| RCAS1 | | - Decrease after tumor removal - Increase when tumor recurrence | 37 |

ปัจจัยที่มีผลต่อการประเมินค่าสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งในซีรัม

ธรรมชาติของสารบ่งชี้ชีวภาพในซีรัมเป็นสารชีวโมเลกุล ซึ่งจะสูญเสียหรือการทำงานลดลงหากไม่มีการจัดเก็บในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าความผิดพลาดในการประเมินค่าสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งในซีรัมเกิดจากการจัดเก็บตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมถึงร้อยละ 30-75 และเกิดจากขั้นตอนการวิเคราะห์ ร้อยละ 13-31³⁸ ปัจจัยที่มีผลต่อการประเมินค่าสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งในซีรัมมีหลายปัจจัยดังนี้

1. **ชนิดของตัวอย่าง** ซีรัม เป็นส่วนของน้ำเลือดที่ได้หลังการปั่นแยกส่วนประกอบของเลือดและเม็ดเลือดออกแล้ว ปัจจุบันมีหลอดแยกซีรัม (serum separator tube, SST) ซึ่งเป็นหลอดที่มีเจลกั้นอยู่ตรงกลางทำให้สามารถรักษาความคงตัวของสารชีวโมเลกุลและคุณภาพของซีรัมได้นานกว่าหลอดทั่วไป³⁹ ส่วนพลาสมา (plasma) แตกต่างจากซีรัม คือ ในหลอดเก็บพลาสมาจะมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) เช่น sodium fluoride (NaF), heparin และ EDTA เป็นต้น การเลือกใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดใดขึ้นกับสิ่งที่ต้องการตรวจวัด อย่างไรก็ตามสารป้องกันการแข็งตัวอาจมีผลต่อการตรวจวัดสารชีวเคมีบางชนิด³⁹ จึงต้องพิจารณาให้รอบคอบก่อนใช้

2. **การเก็บรักษาส่งตรวจ** นิยมเก็บซีรัมที่อุณหภูมิต่ำกว่าการจัดเก็บที่อุณหภูมิใดหรือการแช่แข็ง จึงขึ้นกับการคงตัวของสารบ่งชี้ที่ต้องการตรวจวัด การแช่แข็งและการละลายมีต่อสภาพธรรมชาติของชีวโมเลกุล การทดสอบเพื่อตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ AFP, CEA, CA125 และ CA19-9 พบว่าการแช่แข็งและการละลายซีรัมที่จัดเก็บที่ -40°C นาน 10 เดือน มีผลต่อระดับ AFP, CEA และ CA125 ส่วนการแช่แข็งและการละลายบ่อยๆ มีผลต่อระดับ CA19-9⁴⁰

3. **การควบคุมคุณภาพการตรวจวัด** การตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็งที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immune-metric assay) ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (kits) มักให้ผลแตกต่างกันขึ้นกับการจับจำเพาะ (specificity) และความแรงในการจับ (binding affinity) ของสารที่ตรวจวัดกับแอนติบอดี นอกจากนี้ในชุดตรวจสำเร็จรูปแต่ละชุดยังใช้สารมาตรฐาน (reference material) เพื่อเทียบเคียงที่แตกต่างกัน⁴¹ ดังนั้นการประเมินผลจึงต้องเรียนรู้ปัจจัยเหล่านี้ด้วย

4. **สารรบกวนการตรวจวัด** สารในซีรัมหรือพลาสมาที่รบกวนการตรวจวัดสารบ่งชี้ทางชีวภาพ ได้แก่ บิลิรูบิน (bilirubin), ฮีโมโกลบิน (haemoglobin), อัลบูมิน (albumin) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งจะรบกวนการตรวจวัดเมื่อมีระดับสูงเกิน เช่น การตรวจวัดระดับ CEA ในซีรัม

จะถูกรบกวนเมื่อมีระดับบิลิรูบิน >300 มิลลิกรัมต่อลิตร, ฮีโมโกลบิน $>12,000$ มิลลิกรัมต่อลิตร, อัลบูมิน $>50,000$ มิลลิกรัมต่อลิตร, ไตรกลีเซอไรด์ $>8,500$ มิลลิกรัมต่อลิตร และรูมาตอยด์แฟคเตอร์ (rheumatoid factor) $> 500,000$ IU/L เป็นต้น

ข้อพึงระวังในการเลือกใช้และการแปลผล

ปัจจุบันยังไม่พบสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งชนิดใดที่จำเพาะต่อมะเร็งเพียงชนิดเดียวหรือเพียงภาวะเดียว ดังนั้นการเลือกใช้สารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อการวินิจฉัย การติดตามหรือการพยากรณ์โรค จึงขึ้นกับข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการตรวจวัดนั้น ซึ่งควรพิจารณาถึงกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษา กลุ่มควบคุมที่ดีคือกลุ่มควบคุมที่ประกอบด้วยตัวอย่างที่มีความหลากหลายและครอบคลุมกลุ่มบุคคลที่มีภาวะโรคคล้ายคลึงหรือสัมพันธ์กับผู้ป่วยมะเร็งที่ศึกษา โดยเฉพาะกลุ่มบุคคลที่เคยมีรายงานแล้วว่ามีการบ่งชี้ชีวภาพนั้นสูงในซีรัม สำหรับการรายงานผลและการแปลผลนั้นมีความสำคัญไม่น้อยกว่าการวิเคราะห์ผล ซึ่งนอกจากมีผลต่อแนวทางการวินิจฉัยและรับการรักษาแล้วยังมีผลต่อจิตใจของผู้ได้รับการประเมินอย่างมากด้วย จึงควรทำการแปลผลด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากหลายการศึกษาพบว่าสารบ่งชี้ชีวภาพเพื่อบ่งบอกภาวะการเป็นมะเร็งนั้น สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้อง กับมะเร็ง เช่น ระดับ serum squamous cell antigen (SCC), CA 19-9 และ CA 125 เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ต้องมีการฟอกเลือดล้างไต (haemodialysis)⁴² ระดับ CA125 ในซีรัมจะสูงขึ้นชั่วคราว (transient elevation) ในระหว่างการมีประจำเดือน ซึ่งเกิดในช่วงการตกไข่ (ovulation) และเกี่ยวข้องกับ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิร่างกาย⁴³ ดังนั้นการแปลและการรายงานผลจึงต้องวิเคราะห์ปัจจัยอื่นโดยรวมของผู้ป่วยประกอบด้วย

สรุป

สารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบันมีหลากหลายชนิด ซึ่งให้ค่าการตรวจวินิจฉัยที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย **ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก และค่าการทำนายผลลบ** ซึ่งค่าเหล่านี้นอกจากขึ้นกับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งที่นำมาศึกษาแล้ว ยังขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการศึกษานั้น สำหรับสารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีที่เหมาะสมกับผู้ป่วยในประเทศไทยควรพิจารณาเลือกจากการศึกษาที่ใช้ผู้ป่วยไทยและกลุ่มควบคุมที่ครอบคลุมผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและผู้ที่มีติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ เนื่องจากเป็นกลุ่มเสี่ยงของมะเร็ง

ท่อน้ำดีในประเทศไทย การเลือกใช้สารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีหลายชนิดร่วมกันจะช่วยเพิ่มความเชื่อมั่นในการแปลผล ซึ่งควรประเมินร่วมกับปัจจัยอื่นโดยรวมของผู้ป่วยในการรายงานผล สารบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีนอกจากใช้ร่วมกับผลวินิจฉัยอื่นในการวินิจฉัยมะเร็งแล้ว ยังมีประโยชน์ในการติดตามผลการรักษา การพยากรณ์โรคและบ่งบอกการเกิดซ้ำของมะเร็งด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูน่าส่งเสริมกลุ่มนักวิจัยอาชีพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช. วงศ์คำ และคณะ) และโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ผ่านศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยด้านสุขภาพที่จำเพาะของประชากรในประเทศอนุภาค ลุ่มน้ำโขง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Khuntikao N. Current Concept in Management of Cholangiocarcinoma. *Srinagarind Med J* 2005; 20:143-9.
2. Wongkham S. Tumor Marker in Cholangiocarcinoma. *Srinagarind Med J* 2005; 20:4.
3. Qin XL, Wang ZR, Shi JS, Lu M, Wang L, He QR. Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. *World J Gastroenterol* 2004; 10:427-32.
4. Ramage JK, Donaghy A, Farrant JM, Iorns R, Williams R. Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1995; 108:865-9.
5. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:204-7.
6. Leelawat K, Leelawat S, Ratanachu-Ek T, Trubwongchareon S, Wannaprasert J, Tripongkaruna S, et al. Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12:4195-8.
7. Levy C, Lymp J, Angulo P, Gores GJ, Larusso N, Lindor KD. The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinomas in patients with primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci* 2005; 50:1734-40.
8. Leelawat K, Narong S, Wannaprasert J, Ratanashu-ek T. Prospective study of MMP7 serum levels in the diagnosis of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16:4697-703.

9. Leelawat K, Narong S, Wannaprasert J, Leelawat S. Serum NGAL to Clinically Distinguish Cholangiocarcinoma from Benign Biliary Tract Diseases. *Int J Hepatol* 2011; 2011:873548.
10. Uenishi T, Kubo S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Yamamoto T, et al. Cytokeratin-19 fragments in serum (CYFRA 21-1) as a marker in primary liver cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:1894-9.
11. Uenishi T, Yamazaki O, Tanaka H, Takemura S, Yamamoto T, Tanaka S, et al. Serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) as a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:583-9.
12. Goydos JS, Brumfield AM, Frezza E, Booth A, Lotze MT, Carty SE. Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Ann Surg* 1998; 227:398-404.
13. Fujimoto K, Kawaguchi T, Nakashima O, Ono J, Ohta S, Kawauchi A, et al. Periostin, a matrix protein, has potential as a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 2011; 25:1211-6.
14. Watanabe H, Enjoji M, Nakashima M, Noguchi K, Kinukawa N, Sugimoto R, et al. Clinical significance of serum RCAS1 levels detected by monoclonal antibody 22-1-1 in patients with cholangiocellular carcinoma. *J Hepatol* 2003; 39:559-63.
15. Wongkham S, Boonla C, Kongkham S, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Sripa B. Serum total sialic acid in cholangiocarcinoma patients: an ROC curve analysis. *Journal of Clinical Chemistry* 2001; 34:537-41.
16. Kongtawelert P, Tangkijvanich P, Ong-Chai S, Poovorawan Y. Role of serum total sialic acid in differentiating cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2178-81.
17. Bhudhisawasdi V, Muisuk K, Areejitranusorn P, Kularbkaew C, Khampitak T, Saeseow OT, et al. Clinical value of biliary alkaline phosphatase in non-jaundiced cholangiocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 130:87-92.
18. Bamrungphon W, Prempracha N, Bunchu N, Rangdaeng S, Srisukho S, Boonla C, et al. A new mucin antibody/enzyme-linked lectin-sandwich assay of serum MUC5AC mucin for the diagnosis of cholangiocarcinoma. *Cancer Letters* 2007; 247:301-8.
19. Wongkham S, Sheehan JK, Boonla C, Patrakitkomjorn S, Howard M, Kirkham S, et al. Serum MUC5AC mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Letters* 2003; 195:93-9.

20. Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu Y, Kuwahara K, et al. A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer* 2011; 117:3393-403.
21. Singh S, Tang SJ, Sreenarasimhaiah J, Lara LF, Siddiqui A. The clinical utility and limitations of serum carbohydrate antigen (CA19-9) as a diagnostic tool for pancreatic cancer and cholanginma. *Diss and sSciences* 2011; 56:2491-6.
22. Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YE, Wu JX, Shan Y, et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31:164-9.
23. Engelen MJ, de Bruijn HW, Hollema H, et al. Serum CA 125, carcinoembryonic antigen, and CA 19-9 as tumor markers in borderline ovarian tumors. *Gynecologic oncology* 2000; 78:16-20.
24. Bergamaschi S, Morato E, Bazzo M, Neves F, Fialho S, Castro G, et al. Tumor markers are elevated in patients with rheumatoid arthritis and do not indicate presecrtonal ral heumatic dDiseases 2012; 15:179-82.
25. Charatcharoenwithaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2008; 48:1106-17.
26. Cheon YK, Cho YD, Moon JH, Jang JY, Kim YS, Lee MS, et al. Diagnostic utility of interleukin-6 (IL-6) for primary bile duct cancer and changes in serum IL-6 levels following phdyn American journalJ gGastroenterology 2007; 102:2164-70.
27. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation caTend mMolecular mMedicine 2008; 14:109-19.
28. Kim S, Keku TO, Martin C, Galanko J, Woosley JT, Schroeder JC, et al. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorect as. *Cancer Reresearch* 2008; 68:323-8.
29. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, et al. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2702-6.
30. Enjoji M, Nakashima M, Yamaguchi K, Kotoh K, Nakamuta M. Significance of RCAS1 antigen in hepatocellular, cholangiocellular and pancreatic carcinomas. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2005; 20:1143-8.
31. Xu H, Inagaki Y, Tang W, et al. Elevation of serum KL-6 mucin levels in patients with cholangiocarcinoma. *Hepato-gastroenterology* 2008; 55:2000-4.
32. Briggs CD, Neal CP, Mann CD, Steward WP, Manson MM, Berry DP. Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer* 2009; 45:33-47.
33. Heimbach JK, Gores GJ, Haddock MG, et al. Predictors of disease recurrence following neoadjuvant chemoradiotherapy and liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma. *Transplantation* 2006; 82:1703-7.
34. Huang JL, Biehl TR, Lee FT, Zimmer PW, Ryan JA, Jr. Outcomes after resection of cholangiocellular carcinoma. *American journal of surgery* 2004; 187:612-7.
35. Matull WR, Andreola F, Loh A, et al. MUC4 and MUC5AC are highly specific tumour-associated mucins in biliary tract cancer. *British journal of cancer* 2008; 98:1675-81.
36. Boonla C, Wongkham S, Sheehan JK, et al. Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* 2003; 98:1438-43.
37. Enjoji M, Nakamuta M, Yamaguchi K, et al. RCAS1, a useful serum marker to predict the recurrence of cancer: two cases of cholangiocarcinoma and pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences* 2004; 49:1654-6.
38. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. *Clinical chemistry* 2002; 48:691-8.
39. Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ, Yandle TG. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clin Biochem* 2001; 34:107-12.
40. Gao YC, Yuan ZB, Yang YD, Lu HK. Effect of freeze-thaw cycles on serum measurements of AFP, CEA, CA125 and CA19-9. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2007; 67:741-7.
41. Sweep FC, Fritsche HA, Gion M, Klee GG, Schmitt M. Considerations on development, validation, application, and quality control of immuno(metric) biomarker assays in clinical cancer research: an EORTC-NCI working group report. *Int J Oncol* 2003; 23:1715-26.
42. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002; 48:1151-9.
43. Nonogaki H, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Kobayashi F, Mori T. Serial changes of serum CA125 levels during menstrual cycles. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1991; 17:369-78.

