

การศึกษาทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เกี่ยวกับตำแหน่งที่พบ  
อัลฟาพีโตโปรตีน ในเซลล์มะเร็งของตับคน



นางสาว เกลียวพันธ์ เถลิงพล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๒

000158

Immunofluorescent Studies on Localization of  
Alpha-fetoprotein in Human Liver Cancer Cells

MISS KLEOPHANT THAKERNGPOL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1979

วิทยานิพนธ์เรื่อง

การศึกษาทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เกี่ยวกับตำแหน่งที่พบอัลฟา  
ฟีโตโปรตีน ในเซลล์มะเร็งของตับคน

โดย

นางสาว เกด็ยวพันธ์ เถกิงพล


ภาควิชา

จุลชีววิทยา

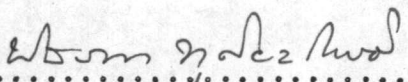
อาจารย์ที่ปรึกษา

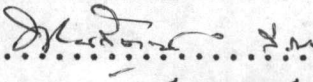
ศาสตราจารย์นายแพทย์ทินรัตน์ สถิตนิมานการ

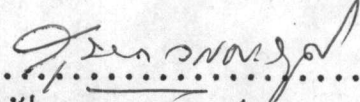
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาคามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

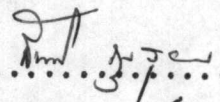
  
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประคิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสวาท ทุติยะโพธิ์)

  
.....กรรมการ  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ทินรัตน์ สถิตนิมานการ)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุมนา วรรณชะภูติ)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ ฤงสูวรรณ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การศึกษาทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เกี่ยวกับตำแหน่งที่พบอัลฟา  
 พีโตโปรตีน ในเซลล์มะเร็งของตับคน

ชื่อ                              นางสาว เกลียวพันธ์ เถกิงพล

อาจารย์ที่ปรึกษา        ศาสตราจารย์นายแพทย์ทินรัตน์ สถิตนิมานการ

ภาควิชา                        จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา                ๒๕๒๑



บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงอัลฟาพีโตโปรตีน (เอ เอฟ พี) ซึ่งเป็นซีรัมโปรตีนเฉพาะ  
 ที่พบมากในซีรัมของทารก และของคนที่เป็นมะเร็งตับปฐมภูมิ

เมื่อแยกชนิดของมะเร็งตับทางจุลพยาธิวิทยา ในผู้ป่วย ๒๕ ราย พบว่าเป็นมะเร็ง  
 ตับปฐมภูมิ ๑๔ ราย (๕๖ %) และเป็นมะเร็งตับทุติยภูมิ ๑๑ ราย (๔๔ %)

จากการตรวจซีรัมของผู้ป่วยด้วยวิธีเคาเตอร์อิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิส พบ ๕ ใน  
 ๑๔ ราย (๓๕.๗ %) ให้ผลบวก เอ เอฟ พี ในมะเร็งตับปฐมภูมิ ซึ่งพบมากในมะเร็งตับ  
 ปฐมภูมิชนิดคิฟเพอเรนซิเอทเลว คือ ๗๑.๔ % ในมะเร็งตับปฐมภูมิชนิดคิฟเพอเรนซิเอทปาน  
 กลางพบ ๕๐.๐ % สำหรับมะเร็งตับทุติยภูมิให้ผลลบทุกราย

จากการศึกษาค้นคว้าวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อตรวจหา เอ เอฟ พี ในเซลล์  
 มะเร็งตับ แสดงว่า เอ เอฟ พี ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน ซัยโตพลาสซึม ซัยโตพลาสซึมไมโท-  
 เบริน และในเซลล์ของไฟโบรบลาสต์ รวมทั้งหลอดเลือด การสังเคราะห์ของ เอ เอฟ พี ใน  
 เซลล์มะเร็งตับ ไม่เหมือนกันในแต่ละราย และพบว่าประมาณ ๓๐ % หรือน้อยกว่านั้นในเซลล์  
 มะเร็งตับที่สร้าง เอ เอฟ พี และด้วยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจพบ เอ เอฟ พี ในเซลล์มะเร็ง  
 ตับปฐมภูมิ ถึง ๘๕.๗ % และ ๑๘.๒ % ในไฟโบรบลาสต์รอบ ๆ เซลล์มะเร็งตับทุติยภูมิ

จากผลของการวิจัยนี้แสดงว่า วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ สามารถที่จะตรวจหา เอ เอช วี ได้ในเปอริเซนตที่สูงกว่าวิธีวิเคราะห์ เอ เอช วี และยังเป็นการพิสูจน์ว่า เอ เอช วี จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในพาราเรนคัยมัลเซลล์เป็นส่วนใหญ่

Thesis Title           Immunofluorescent Studies on Localization of Alpha-fetoprotein in Human Liver Cancer Cells.

Name                   Miss Kleophant Thakerngpol

Thesis advisor        Professor Doctor Tinrat Stitnimankarn

Department           Microbiology

Academic Year        1978

#### ABSTRACT

This experiment is to study Alpha-fetoprotein (AFP), which is a specific protein of fetal serum, and is found in the sera of patients with primary carcinoma of the liver.

Histologic sections of 25 patients with carcinoma of the liver were analyzed. The tumours were classified histologically as hepatocellular carcinoma in 14 (56 %) cases, and metastatic carcinoma of the liver or adenocarcinoma in 11 (44 %).

The qualitative determination of serum AFP was done by counter-immunoelectrophoresis. It was found that 9 of 14 (64.3 %) hepatoma cases were AFP-positive. AFP-positive serum was highest in poorly differentiated grade III hepatocellular carcinoma (71.4 %), and 50.0 % was found in moderately differentiated grade II hepatocellular carcinoma. The AFP test had been negative in the sera from all patients with metastatic carcinoma of the liver.

The localization of AFP in carcinomatous cells of the liver was determined by direct immunofluorescent antibody technique. It was demonstrated that AFP was synthesized in the cytoplasm, cytoplasmic membrane, in the fibroblasts and blood vessels. The synthesis by neoplastic cells containing AFP varied with the case; about 30 % or less of the tumour cells do produce AFP. By this method AFP was detected in 85.7 % of hepatocellular carcinoma, and 18.2 % in the fibroblasts around the metastatic tumour cells.

The results obtained from this study confirmed that the immunofluorescent antibody technique could detect the AFP in higher percentage than the assay method, and the production of AFP was mainly in parenchymal cells.



## ACKNOWLEDGEMENT

To Doctor Tinrat Stitnimankarn, Professor and Chairman of the Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, the author wishes to express her gratitude, for his encouragement, constant interest, and critical advice through this study, including the interpretation of the histopathological examination.

The author is pleased to record her indebtedness and her gratitude to Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her valuable suggestions and generous permission to carry out this work.

Assistant Professor Sumana Vardhanabhuti, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, gave advice and assistance in the completion of the immunofluorescent studies, to whom the author is deeply indebted.

The author wishes to extend her gratitude to Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his valuable guidance for improving the techniques, which were used in this study.

The author is indebted to Associate Professor Kijja Sindhvananda, Department of Surgery, and Assistant Professor Sasiprapa Boonyapisit, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, who kindly supplied the specimens used in this study.


Particular thanks are due to Miss Janya Khomlamt, for the



determination of serum alpha-fetoprotein, to Mr. Chaiyoot Bouwatana, for making illustrations, and to Miss Kulvan Luchadech, for typing this manuscript.

Finally, this study was partly supported by a grant of the Graduate School, Chulalongkorn University, which was gratefully acknowledged.

## CONTENTS

|   | Page |
|---|------|
| ABSTRACT (Thai) .....   | IV   |
| ABSTRACT (English) .....  | VI   |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....  | VIII |
| TABLES .....  | XI   |
| FIGURES .....   | XIII |
| ABBREVIATIONS .....   | XV   |
|  |      |
| <b>CHAPTER</b>  |      |
| I INTRODUCTION .....  | 1    |
| II MATERIALS AND METHODS .....  | 28   |
| III RESULTS .....   | 42   |
| IV DISCUSSION .....   | 69   |
| V CONCLUSION .....  | 74   |
| REFERENCES .....  | 76   |
| VITA .....  | 88   |

TABLES

| TABLE   | Page |
|---|------|
| 1. Some physicochemical properties of AFP .....   | 4    |
| 2. Chemical composition of AFP .....  | 5    |
| 3. Amino acid Composition of AFP .....  | 6    |
| 4. AFP tests in different age-group in patients with primary<br>liver cancer .....  | 13   |
| 5. Incidence of AFP in the sera of patients with PLC in<br>relation to sex .....  | 13   |
| 6. Incidence of AFP in the sera of patients with PLC in<br>relation to the weight of the tumoral liver .....              | 14   |
| 7. AFP frequency as a function of tumour differentiation ...  | 14   |
| 8. Reports on serum AFP in patients with hepatoma from diff-<br>erent geographic areas .....                              | 15   |
| 9. AFP in liver diseases .....  | 17   |
| 10. AFP concentrations in pregnancy sera .....  | 22   |
| 11. Serum AFP concentrations in child-mother pairs .....  | 23   |
| 12. Half-life of AFP in maternal serum after delivery .....   | 23   |
| 13. Reported indications for AFP assays .....   | 24   |
| 14. Histological classification of hepatocellular carcinoma .   | 53   |
| 15. Histological classification of metastatic carcinoma of<br>the liver .....   | 53   |
| 16. Age, sex and race distribution .....  | 54   |
| 17. Relationship between localization of AFP, serum AFP, and<br>histological grading of primary hepatocellular carcinoma. | 61   |

## TABLES(cont.)

| TABLE  | Page |
|--|------|
| 18. Relationship between localization of AFP, serum AFP, and histological grading of metastatic carcinoma of the liver .....   | 62   |
| 19. Number of cases in each histological grade of hepatocellular carcinoma and AFP localization of tumour cells .              | 63   |
| 20. Number of cases in each histological grade of metastatic carcinoma of the liver and AFP localization in tumour cells. .... | 63   |
| 21. Intensity of AFP localization and histological grading of hepatocellular carcinoma .....                                   | 64   |
| 22. Intensity of AFP localization and histological grading of metastatic carcinoma of the liver .....                          | 64   |
| 23. Histological grade of hepatocellular carcinoma correlated to serum AFP .....   | 66   |
| 24. Interrelation between serum AFP and the intensity of AFP in hepatocellular carcinoma .....                                 | 67   |
| 25. Interrelation between serum AFP and the intensity of AFP in metastatic carcinoma of the liver .....                        | 68   |

## FIGURES

| FIGURE   | Page |
|--|------|
| 1. Serum AFP level in diseases .....   | 18   |
| 2. AFP levels in rat serum during DAB carcinogenesis .....   | 25   |
| 3. Synthesis of fluorescein isothiocyanate starting with<br>nitrophthalic acid and resorcinol .....  | 35   |
| 4. Schematic representation of direct staining reaction ..   | 36   |
| 5. Histological section of grade II, moderately differen-<br>tiated carcinoma, begining of necrosis in some area ...                                 | 44   |
| 6. Histological section of grade II, moderately differen-<br>tiated carcinoma compared to the normal hepatic cells<br>(lower left) .....             | 45   |
| 7. Histological section of grade III, poorly differentiated<br>carcinoma, the tumour cells were irregular and large in<br>size .....                 | 46   |
| 8. Multinucleated tumour giant cells and mitotic figures<br>were numerous in grade III, poorly differentiated<br>carcinoma .....                     | 47   |
| 9. Light microscopic features of undifferentiated grade IV,<br>carcinoma, the tumour cells were grouped and separated<br>by connective tissues ..... | 48   |
| 10. A photomicrograph of an adenocarcinoma, well differen-<br>tiated .....   | 50   |
| 11. Histological section of a moderately differentiated<br>adenocarcinoma .....  | 51   |

## FIGURES (cont.)

| FIGURE   | Page |
|--|------|
| 12. Faint immunofluorescent staining of AFP in grade II, moderately differentiated carcinoma .....   | 55   |
| 13. A moderate type of immunofluorescence for AFP was shown in the cytoplasm and cytoplasmic membrane. There were small clusters of tumour cells showing increased amount of AFP ..... | 56   |
| 14. Diffuse finely granular with marked fluorescence of the cytoplasm was found. The brighter cells were found usually near the blood vessels .....                                    | 57   |
| 15. Linear immunofluorescence for AFP was shown along the fibroblast cells in grade III, poorly differentiated carcinoma with positive serum-AFP .....                                 | 58   |
| 16. Moderate intensity of AFP localization in metastatic carcinoma of the liver .....  | 59   |

## ABBREVIATIONS

|         |   |
|---------|---|
| AFP     | Alpha-fetoprotein                           |
| AVH     | Acute viral hepatitis                       |
| C       | Celcius                                     |
| CAH     | Chronic aggressive hepatitis                |
| Cir     | Cirrhosis                                   |
| CIEP    | Counterimmunoelectrophoresis                |
| CPH     | Chronic persistent hepatitis                |
| FITC    | Fluorescein isothiocyanate                  |
| HBsAg   | Hepatitis B surface antigen                 |
| kg      | Kilogram (1 kilogram = $10^3$ gram)         |
| M       | Molarity                                    |
| Malig   | Malignancy                                  |
| mg      | Milligram (1 milligram = $10^{-3}$ gram)    |
| $\mu$ g | Microgram (1 microgram = $10^{-6}$ gram)    |
| min     | Minute                                      |
| ml      | Millilitre (1 millilitre = $10^{-3}$ litre) |
| ng      | Nanogram (1 nanogram = $10^{-9}$ gram)      |
| PLC     | Primary liver cancer                        |
| RIA     | Radioimmunoassay                            |
| rpm     | Round per minute                            |
| SAH     | Subacute hepatitis                          |