

การแสดงออกของอินดิวิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) และไซโคลออกซีจีเนสสอง (cyclooxygenase-2, COX-2) ผ่านเอ็นเอฟแคปปาบี (NF-κB) ในโรคพยาธิใบไม้ตับ: การศึกษาจากสัตว์ทดลองไปสู่คน

บทคัดย่อ—การติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV) เหนี่ยวนำในเตรตีฟและออกซิเดทีฟดีเอ็นเอดาเมตผ่านกระบวนการอักเสบเรื้อรังนำไปสู่การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในคน เพื่อพิสูจน์กลไกของพยาธิ OV เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ เราจึงศึกษาการแสดงออกของอินดิวิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) เอ็นเอฟแคปปาบี (NF-κB) ไซโคลออกซีจีเนสสอง (cyclooxygenase-2, COX-2) โทโลอีรีเซฟเตอร์ แอนติออกซิแดนท์เอ็นไซม์ และอินฟลามมาทอรีไซโตไคน์ใน (1) เซลล์มะเร็งแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV, ใน (2) ตับหนูแฮมสเตอร์ที่ให้พยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) และใน (3) เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่ติดเชื้อพยาธิ OV กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV

1) ในเซลล์มะเร็งแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ผลการตรวจโดยวิธี flow cytometry และ immunocytochemistry แสดงว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำการแสดงออกของ TLR2 แต่ไม่ใช่ TLR4 ผลการตรวจโดยวิธี Western blotting และ immunocytochemistry พบว่า NF-κB, iNOS และ COX-2 ถูกแสดงออกในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ตามความเข้มข้น จากผลที่พบนี้แนะนำว่าพยาธิ OV เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบผ่านทาง TLR2 เพื่อให้มีการแสดงออกของ NF-κB ไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS และ COX-2

2) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ป้อนด้วยพยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA พยาธิ OV เสริมฤทธิ์กับสารก่อมะเร็ง NDMA เหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ผลการตรวจทางพยาธิฮิสโตพบว่าการติดเชื้อพยาธิ OV อย่างเดียวเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดี ในขณะที่หนูกลุ่มที่ให้สารก่อมะเร็ง NDMA และ OV เสริมฤทธิ์ทำให้เกิดท่อน้ำดีขนาดเล็กและมะเร็งท่อน้ำดีที่ 6 เดือน ผลการตรวจโดยวิธี RT-PCR และ real-Time RT-PCR พบว่า OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA เสริมฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของ iNOS, NF-κB และ COX-2 สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกของ antioxidant enzymes เช่น Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ลดลง ในขณะที่การแสดงออกของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้น แนะนำว่าเกิดภาวะ oxidative และ nitrative stress การสะสมของ Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) ตัวบ่งชี้ของการแบ่งตัวของเซลล์ ในเยื่อบุผิวท่อน้ำดีและในเซลล์อักเสบสัมพันธ์กับการแสดงออกของ iNOS เหล่านี้ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าการแสดงออกของ iNOS, NF-κB และ COX-2 เกี่ยวข้องกับผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารก่อมะเร็ง NDMA และการติดเชื้อพยาธิ OV ดังนั้นจึงเหล่านี้อาจเป็น

ประโยชน์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเสี่ยงการเป็นมะเร็ง และอาจเป็นเงินเป้าหมายในการใช้สาร
ป้องกันการเกิดมะเร็งต่อไป

3) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนติดพยาธิ OV ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ผลการตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR พบว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน IL-1, TLR-2, NF- κ B, COX-2, SOD2 และ CAT ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ การแสดงออกของยีน IL-1, NF- κ B, SOD2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกของ TLR-2, COX-2 และ CAT เพิ่มขึ้นที่ 12 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV อัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant เพิ่ม 12 และ 26 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนติดพยาธิ OV และกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV พบว่าแบบแผนของการแสดงออกของยีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ ยกเว้นการแสดงออกของยีน TLR-2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าอัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT เพิ่มขึ้นเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าแอนติเจนของพยาธิ OV เหนี่ยวนำภาวะออกซิเดทีฟสเตรสผ่านการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งอาจนำไปใช้สารป้องกันการเกิดมะเร็งในการติดพยาธิ OV ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

คำสำคัญ: อินดิคาเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทเรส ไซโคออกซิจีเนสสอง เอ็นเอฟแคปปาบี โทลไลรีเซฟเตอร์สอง แอนติออกซิแดนท์เอ็นไซม์ อินฟลามมาทอรีไซโตไคน์ พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*, สารไนโตรโซไคเมทิลกลามีน มะเร็งท่อน้ำดี

Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) via NF- κ B in opisthorchiasis: from animal to human study

Abstract— *Opisthorchis viverrini* (OV) infection induces nitrative and oxidative DNA damage through chronic inflammation, leading to cholangiocarcinoma (CCA) development in human. To clarify the mechanism of OV-induced inflammatory response, we investigated the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor-kappaB (NF- κ B), cyclooxygenase-2 (COX-2), Toll-like receptor (TLR), antioxidant enzymes, and inflammatory cytokine in (1) RAW 264.7 macrophage cell line treated with an extract of OV antigen, in (2) the liver of hamsters treated with OV and *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and in (3) white blood cell of OV-infected patient treated with an extract of OV antigen.

1) In RAW 264.7 macrophage cell line treated with an extract of OV antigen, flow cytometry and immunocytochemistry showed that OV antigen induced the expression of TLR2 but not TLR4. Western blotting and immunocytochemistry revealed that NF- κ B, iNOS and COX-2 were expressed in RAW 264.7 cells treated with OV antigen in a dose-dependent manner. These results suggest that OV induces inflammatory response through TLR2-mediated pathway leading to NF- κ B-mediated expression of iNOS and COX-2.

2) In the liver of hamsters treated with OV and NDMA, OV and NDMA synergistically induced CCA in hamsters. Histopathological examination revealed that OV infection alone induced fibrosis around bile duct, whereas NDMA and OV synergistically induced the formation of small bile ducts and CCA at 6 months. RT-PCR and real-Time RT-PCR showed that OV plus NDMA induced synergistically increased the expression of iNOS, NF- κ B and COX-2 in relation to CCA development. Expression of genes of antioxidant enzymes, such as Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) genes, was decreased, while the expression of iNOS and COX-2 increased, suggesting that oxidative and nitrative stress occurred. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) accumulation, indicating cell proliferation, in the bile duct epithelium and inflammatory cells was associated with the expression of these genes. These results suggest that the expression of iNOS, NF- κ B and COX-2 is involved in the synergistic carcinogenic

effect of NDMA and OV infection. Therefore, these genes and their products may be useful biomarkers to evaluate the potential risk of development of tumor and the candidate genes for cancer chemoprevention.

3) In white blood cell (WBC) of OV-infected subjects treated with an extract of OV antigen, real-time RT-PCR revealed that OV antigen induced the expression of IL-1, TLR-2, NF- κ B, COX-2, and SOD2, CAT mRNA in WBC of healthy subject. Expression of IL-1, NF- κ B, SOD2 mRNA increased earlier at 6h and then expression of TLR-2, COX-2 and CAT genes increased at 12h post-treatment with an extract of OV antigen. The ratio of COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant, mRNA expression increased 12- and 26-fold compared with untreated control. In WBC of OV-infected subjects treated with an extract of OV antigen revealed that expression profile of these genes were similar to healthy subjects, except TLR-2 gene increased earlier at 6h post-treatment with an extract of OV antigen. Interestingly, the ratio of COX-2/CAT mRNA expression increased 140, 90, 30, and 40-fold compared with untreated control and these levels were significantly higher than those of healthy subject. These results suggest that OV antigen induces oxidative stress through inflammatory response which may implicate for chemoprevention in OV infection-associated CCA development.

Keywords— inducible nitric oxide synthase, NF- κ B, cyclooxygenase-2, Toll-like receptor-2, antioxidant enzymes, inflammatory cytokine, *Opisthorchis viverrini*, N-nitrosodimethylamine, cholangiocarcinoma