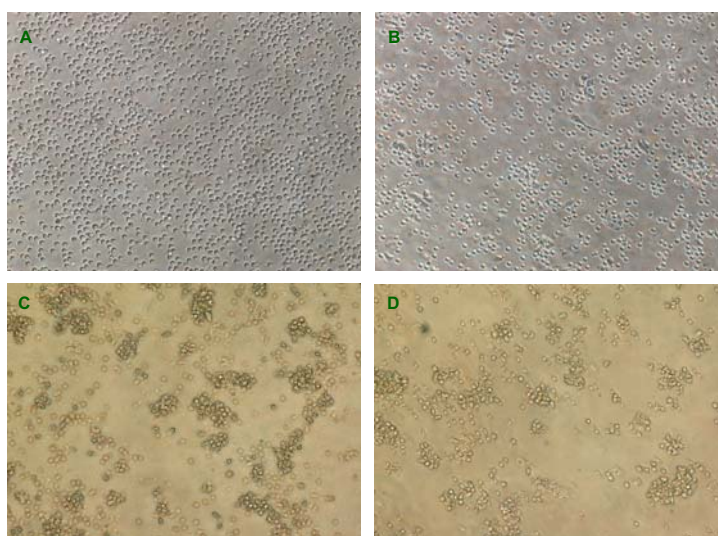


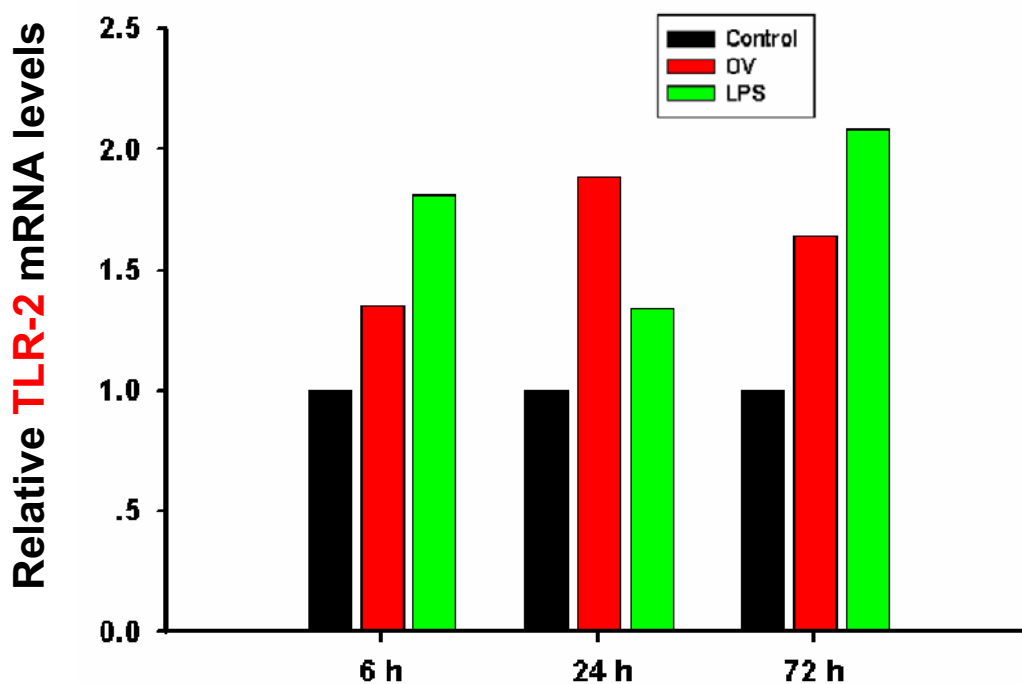
3) การศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV

ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิ OV ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV เปรียบเทียบกับคนปกติ 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 เท่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิ OV และกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV พบว่าแบบแผนของการแสดงออกของยีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ ยกเว้นการแสดงออกของยีน TLR-2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าอัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT เพิ่มขึ้นเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าแอนติเจนของพยาธิ OV เหนี่ยวนำภาวะออกซิเดทีฟสเตรสผ่านการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งอาจนำไปใช้สารป้องกันการเกิดมะเร็งในการติดพยาธิ OV ที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดี

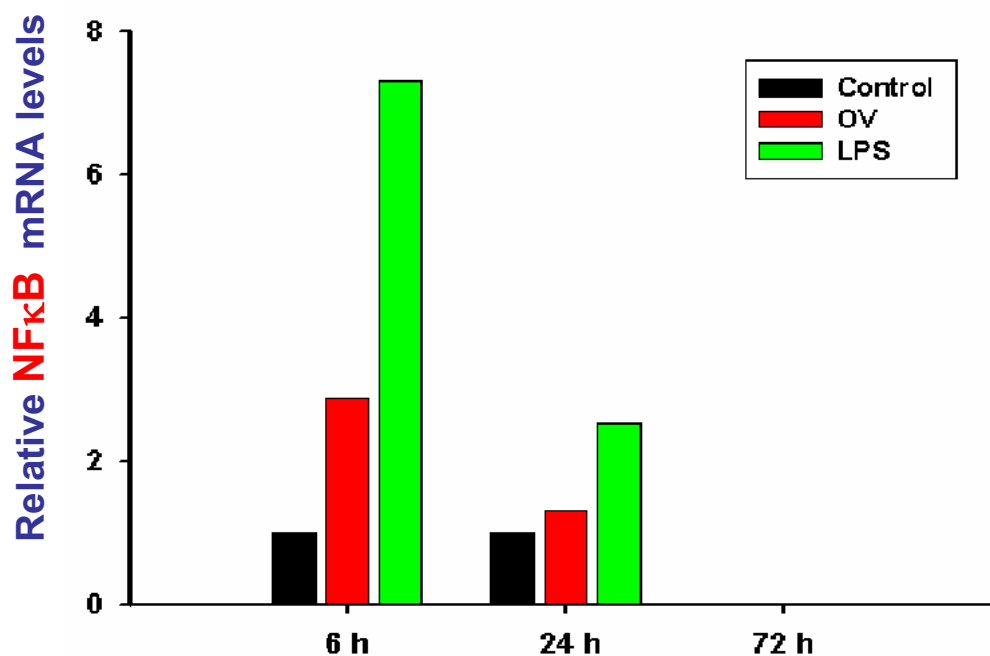
3.1 แสดงการหาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว และกระตุ้นด้วย แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ OV



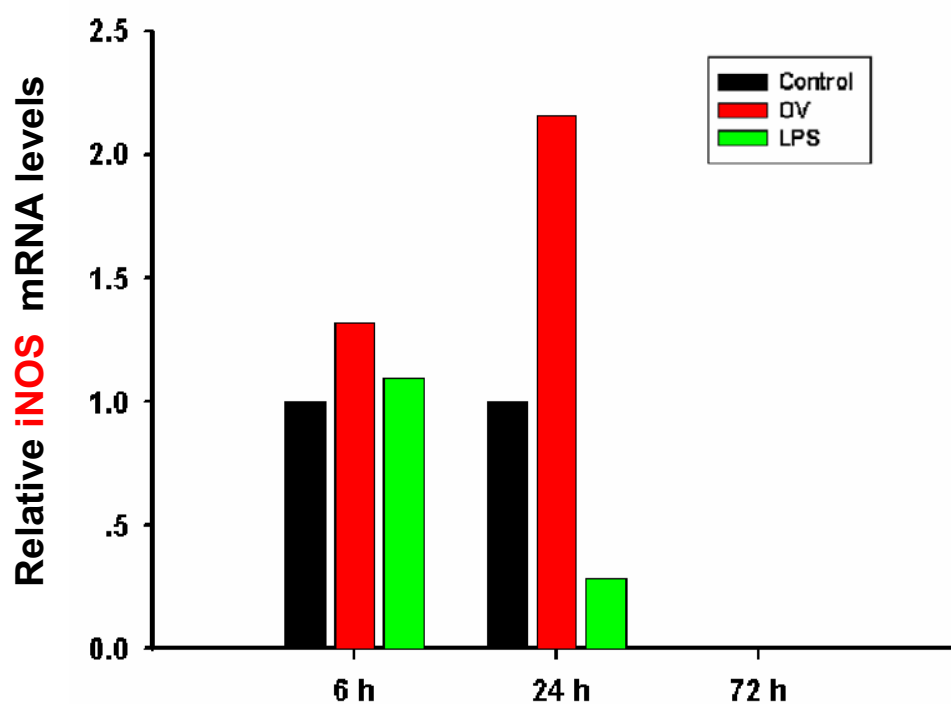
รูปภาพที่13 แสดงรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 + 20%FCS (A) เซลล์ที่กระตุ้นด้วย OV crude extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ใส่ OV-antigens และ LPS กระตุ้น (B) กระตุ้นด้วย 100 ug/ml of OV-crude extract (C) และ กระตุ้นด้วย 10 ug/ml LPS (D)



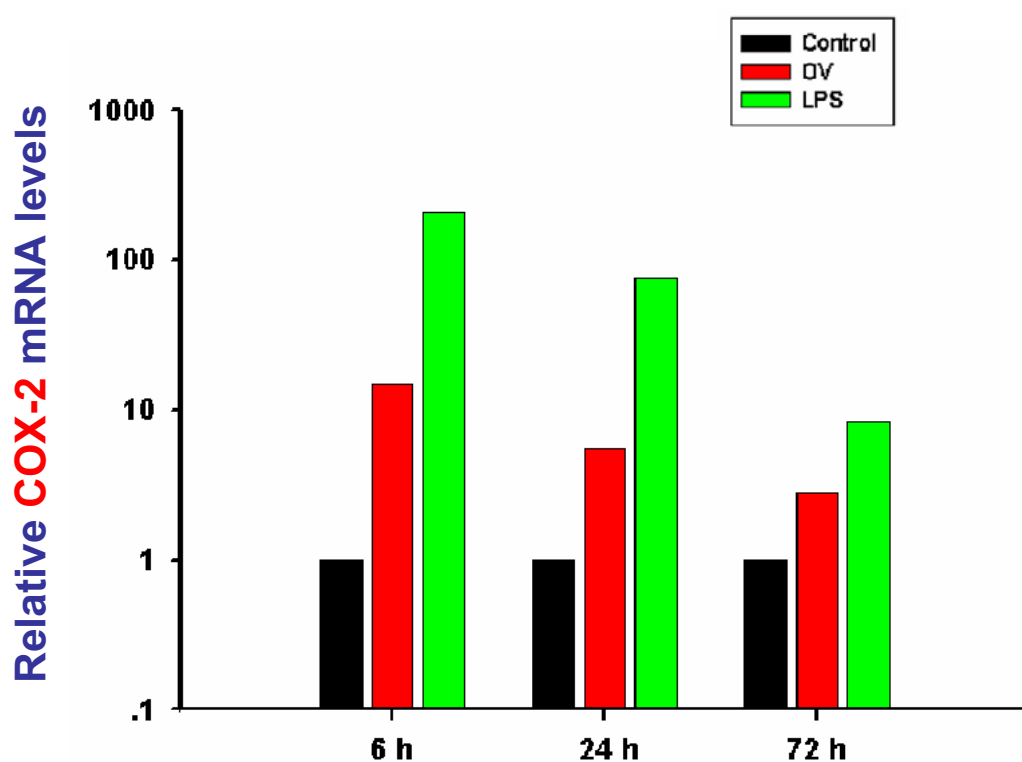
รูปภาพที่ 14 การแสดงออกของจีน TLR-2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ OV ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH ตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR analysis



รูปภาพที่ 15 การแสดงออกของจีน NF-κB ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH ตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR analysis



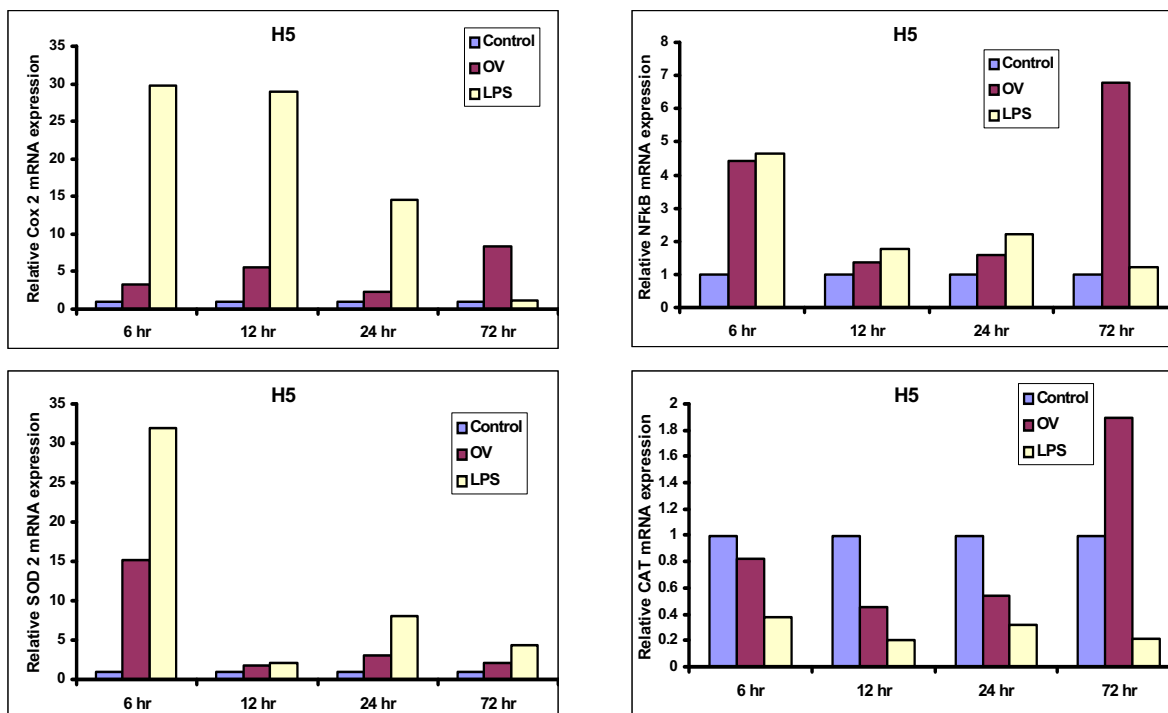
รูปภาพที่ 16 การแสดงออกของจีน iNOS ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH



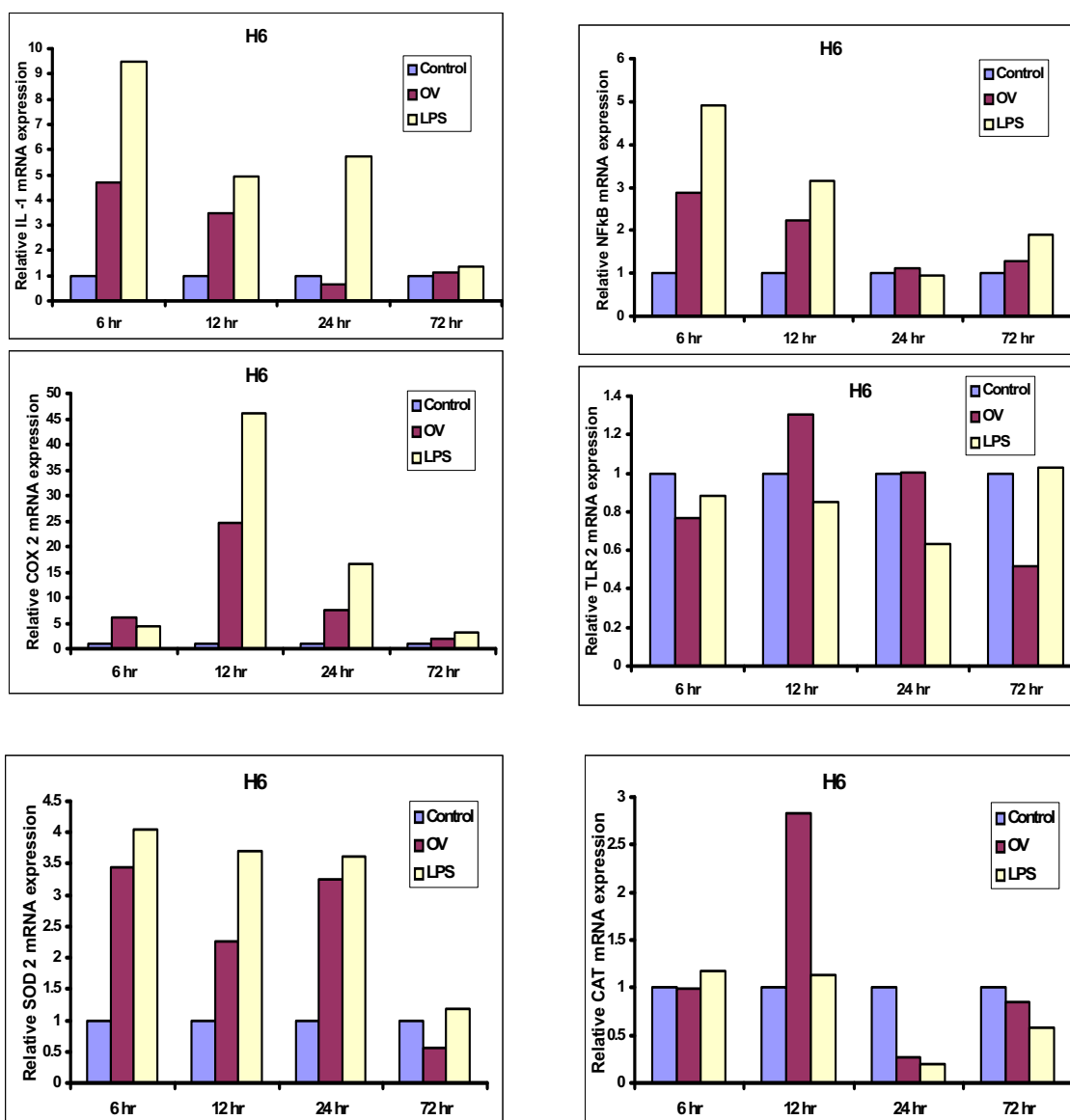
รูปภาพที่ 17 การแสดงออกของจีน COX-2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH

3.2 การแสดงออกของยีน TLR2, COX2, NF-kB, SOD2, CAT และ IL-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อกระตุ้นด้วย OV crude antigens ตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR

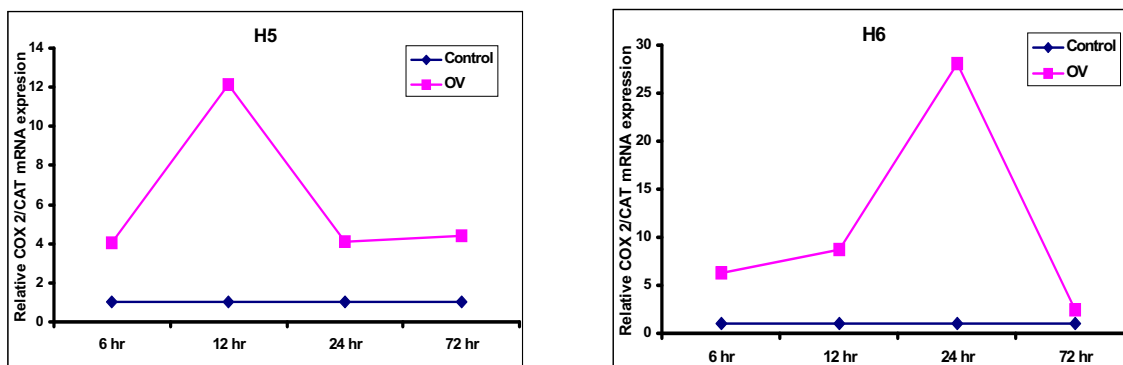
3.2.1 ในคนปกติ เมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติด้วยสารสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ (OV crude antigens) ความเข้มข้น 100 ug/ml พบว่า OV crude antigens กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผ่านการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังต่อไปนี้ IL-1 เป็น inflammatory cytokine ที่จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ รวมถึง TLR2, NFkB และ COX2 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณของการแสดงออกของยีน SOD2 และ CAT ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า OV crude antigens สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน การแสดงออกของยีนแต่ละยีนจะมีรูปแบบแผนของการแสดงออกที่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงสมดุลของระบบ oxidant/anti-oxidant ในการทดลองนี้ใช้ค่า Relative COX2/CAT mRNA expression เป็นตัวบ่งชี้สมดุลดังกล่าว พบว่าสัดส่วนการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุมูลอิสระมีมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่า OV crude antigens สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress จากการเสียสมดุลซึ่งส่งผลให้มีแนวโน้มให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ oxidant มากกว่าระบบ antioxidant นอกจากนี้แล้วจากผลการทดลองพบว่า รูปแบบของภาวะ oxidative stress ในเม็ดเลือดขาวนั้นจะค่อยๆสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens และสูงสุดที่ 12-24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จากนั้นภาวะ oxidative stress จะค่อยๆลดต่ำลงซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการกระบวนการ cell repairing ผ่านการแสดงออกของยีน SOD2 และ CAT โดยที่การกระตุ้น oxidative stress นั้นน่าจะเป็นผลมาจากการกระตุ้นผ่านทาง TH1 cytokine คือ IFN-g จากนั้นกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบผ่านการแสดงออกของยีน IL1 ถึงอย่างไรก็ตามภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นนั้นไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับคนไข้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ



รูปภาพที่ 18 แสดง Relative mRNA expression ของจีน COX2, NF-kB, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน ของคนปกติ อาสาสมัครหมายเลข **H5**, Control: เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี 20% fetal calf serum gold และ 1% penicilin+streptomycin, OV: เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี 20% fetal calf serum gold และ 1% penicilin+streptomycin ร่วมกับ 100 ug/ml ของ OV crude antigens, LPS: เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี 20% fetal calf serum gold และ 1% penicilin+streptomycin ร่วมกับ 1ug/ml ของ lipopolysaccharide (LPS) ในการทดลองนี้ใช้เป็น positive control ผลการแสดงผลของจีนคำนวณแบบ relative Ct method เปรียบเทียบกับ GAPDH การแสดงผลของจีน NF-kB และ COX2 แสดงออกตั้งแต่ 6-72 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ส่วนการแสดงผลของจีน SOD2 และ CAT เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 6-72 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 6 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

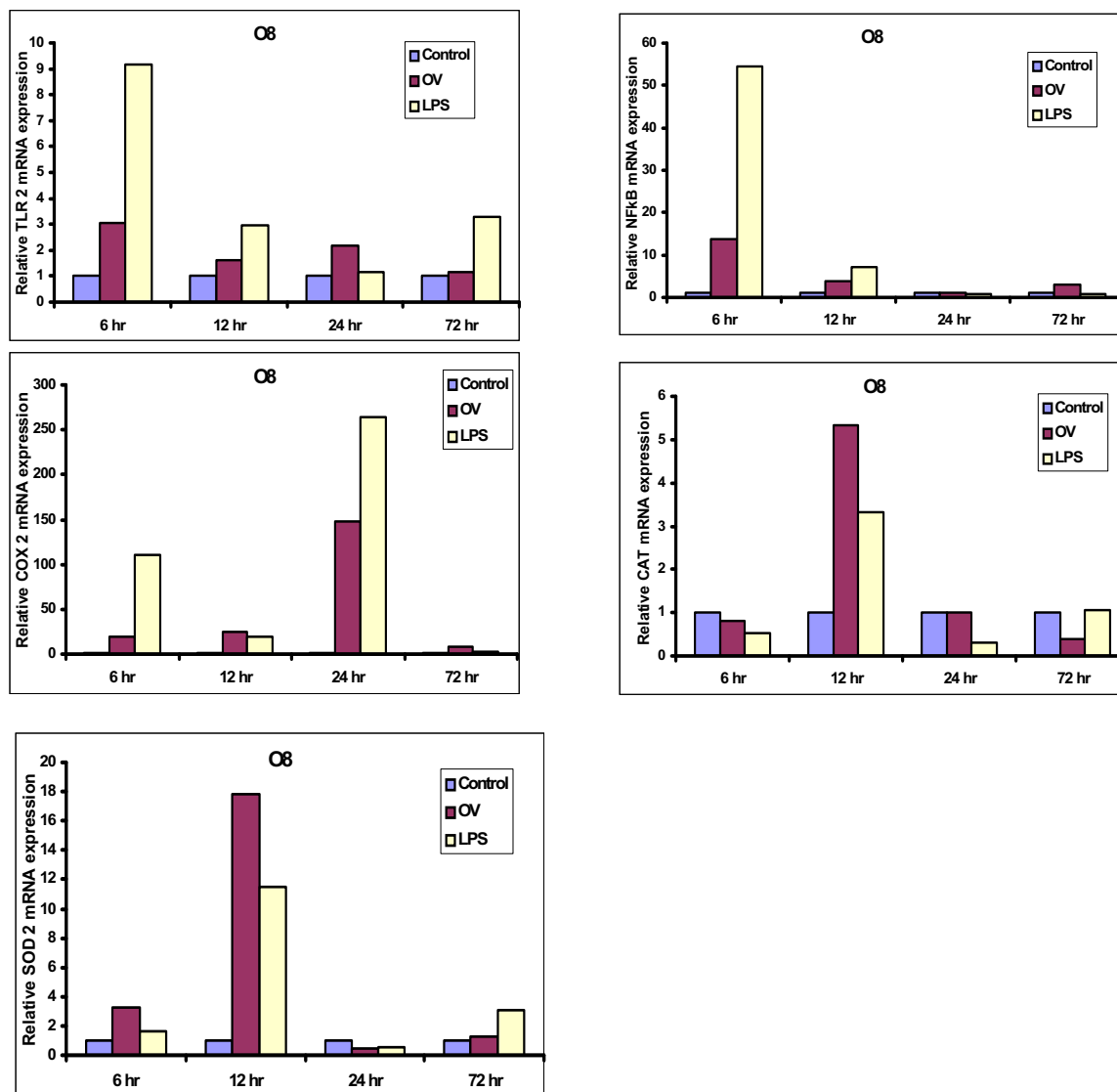


รูปภาพที่ 19 แสดง Relative mRNA expression ของยีน IL-1, COX2, TLR2, NF-kB, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน ของคนปกติอาสาสมัครหมายเลข H6 ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 ผลการแสดงออกของ IL-1 และ NF-kB นั้นถูกกระตุ้นให้แสดงออกสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน COX2 และ TLR2 สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วนการแสดงออกของยีน SOD2 สูงสุดที่ 6 ชั่วโมง แต่ถูกยับยั้งที่ 72 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น การแสดงออกของยีน CAT สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง แต่ถูกยับยั้งการแสดงออกที่ 24 และ 72 ชั่วโมง

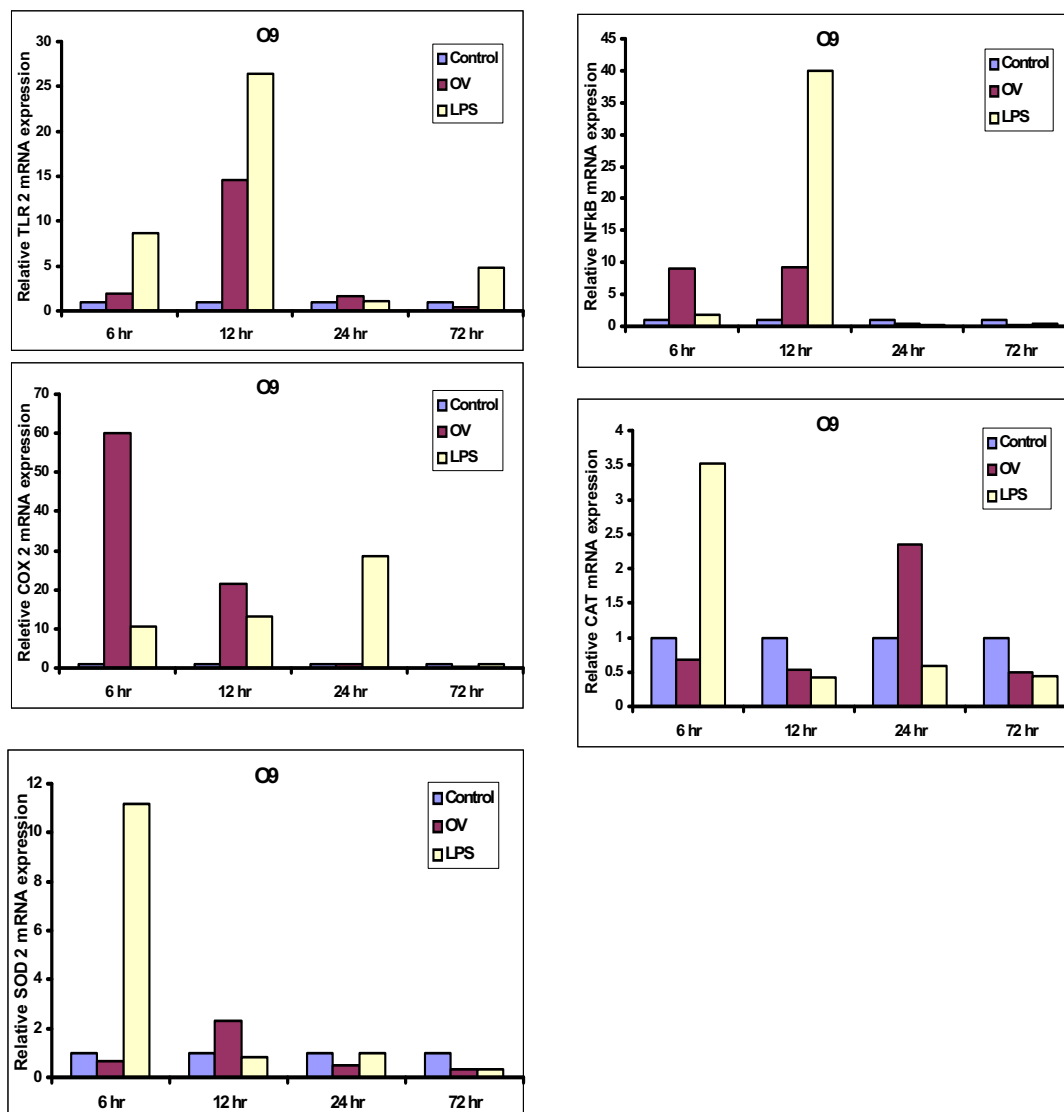


รูปภาพที่ 20 แสดงแบบแผนของการตอบสนองของ Relative COX2/CAT mRNA expression ตัวบ่งชี้ภาวะ oxidative stress ในอาสาสมัครคนปกติหมายเลข H5 และ H6 ที่ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens พบว่า อัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant เพิ่มขึ้น 12 และ 26 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น โดยพบว่าเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นตามลำดับ

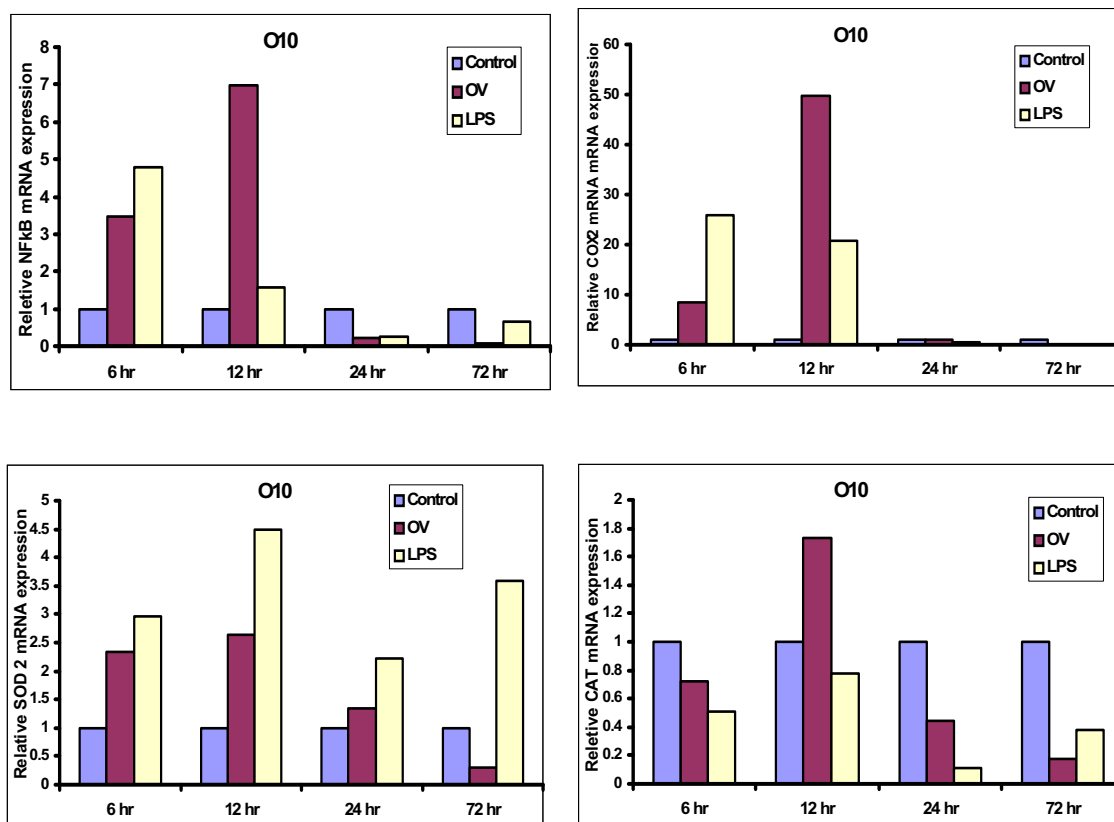
3.2.2 ในคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV เมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนติดพยาธิใบไม้ตับด้วยสารสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ (OV crude antigens) ความเข้มข้น 100 ug/ml พบว่า OV crude antigens กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผ่านการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังต่อไปนี้ IL-1, TLR2, NFkB และ COX2 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีน SOD2 และ CAT ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า OV crude antigens สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ขึ้นเดียวกัน โดยแบบแผนของการแสดงออกของยีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ แต่เมื่อพิจารณาถึงสมดุลของระบบ oxidant/anti-oxidant ในการทดลองนี้ใช้ค่า Relative COX2/CAT mRNA expression พบว่ามีสัดส่วนเพิ่มเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วของการตอบสนองในแต่ละคนแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคลแตกต่างกัน



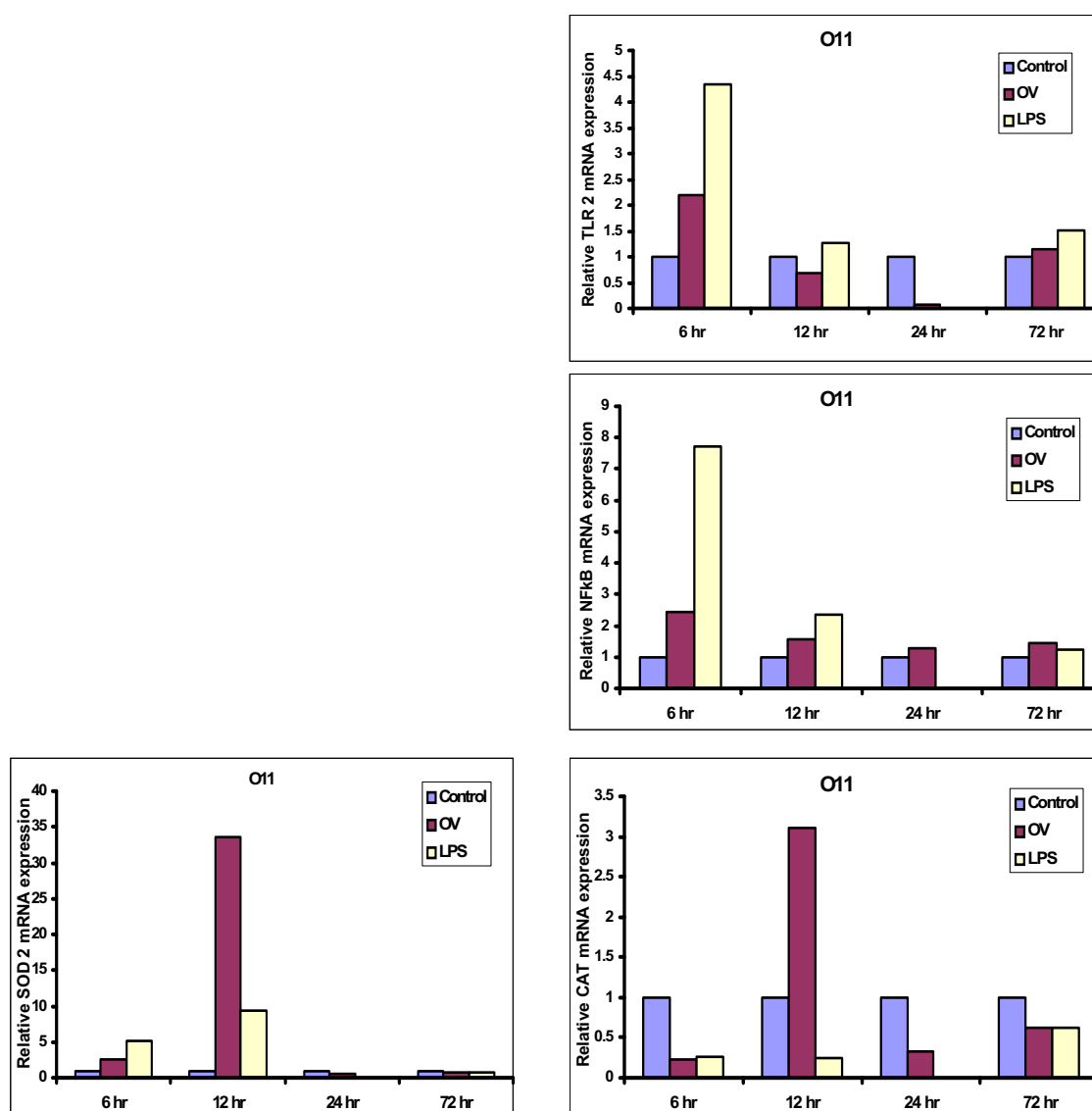
รูปภาพที่ 21 แสดง Relative mRNA expression ของยีน TLR2, NF-κB COX2 , SOD2 และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนไข้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่างๆกัน ในอาสาสมัครหมายเลข **O8** ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 การแสดงออกของยีน TLR2 และ NF-κB สูงสุดที่ 6 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน SOD2 และ CAT สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีน COX-2 สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของยีน CAT ถูกยับยั้งที่ 72 ชั่วโมง



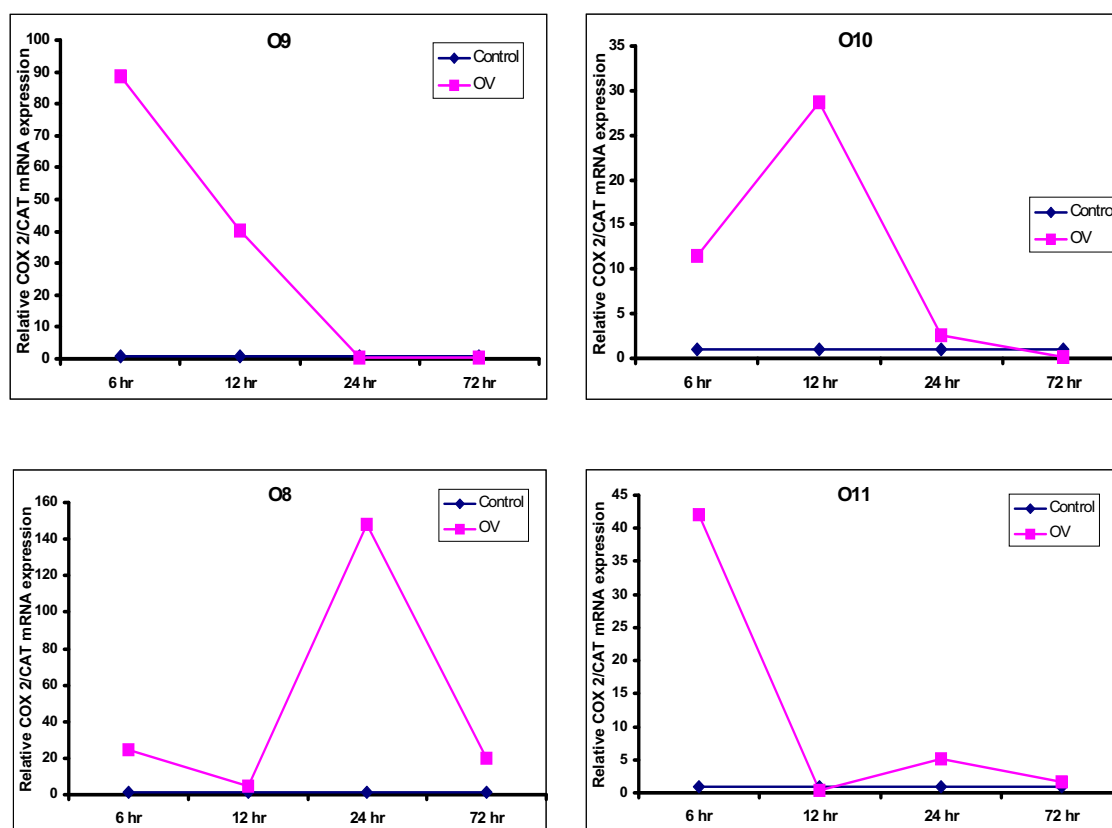
รูปภาพที่ 22 แสดง Relative mRNA expression ของจีน TLR2, NFkB COX2 , SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่างๆกัน ของอาสาสมัครหมายเลข **O9** ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 พบว่าการแสดงออกของจีนเหล่านี้มีทั้งแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น และถูกยับยั้งการแสดงออกในเวลาที่แตกต่างกัน



รูปภาพที่ 23 แสดง Relative mRNA expression ของยีน NF-kB, COX2, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพาหิไบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน ของอาสาสมัครหมายเลข **O10** ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 การแสดงออกของยีนพบว่า การแสดงออกของยีน NF-kB, COX-2 และ SOD2 นั้นถูกกระตุ้นให้แสดงออกสูงขึ้นตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรก และระดับสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วนที่ 72 ชั่วโมง การแสดงออกจะต่ำกว่ากลุ่มควบคุม การแสดงออกของยีน CAT นั้นถูกกระตุ้นสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วนที่เวลาอื่นพบว่ามีการแสดงออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม



รูปภาพที่ 24 แสดง Relative mRNA expression ของยีน TLR2, NF-kB, COX2 , SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนไข้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน ของอาสาสมัครหมายเลข **O11** การเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 พบว่าการแสดงออกของยีน IL-1, TLR-2, COX-2 และ NF-kB แสดงออกสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง ส่วนการแสดงออกของ SOD2 และ CAT สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง และต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เวลา 24-72 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วย OV crude antigens



รูปภาพที่ 25 แสดงรูปแบบของการตอบสนองของ Relative COX2/CAT mRNA expression ตั้ว
 บ่งชี้ภาวะ oxidative stress ในอาสาสมัครคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV
 crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าแต่ละคนมีความเร็วและแบบแผนของการ
 ตอบสนองแตกต่างกัน และมีระดับของอัตราส่วนสูงมากเป็น 90, 30, 140 และ 40 เท่า
 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Output ที่ได้จากโครงการ

โครงการวิจัยนี้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว ยังเป็น การพัฒนานักวิจัยผู้รับทุน และสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ได้ดังนี้

1. เป็นการส่งเสริมการวิจัยแก่นักวิจัยผู้รับทุน ให้สามารถผลิตผลงานวิจัยอย่างต่อเนื่องหลังจาก จบการศึกษาในระดับปริญญาเอก และเป็นการพัฒนานักวิจัยผู้รับทุนเองโดยสามารถเป็นอาจารย์ที่ ปรีกษาหลักแก่นักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา จนกระทั่งสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ให้สำเร็จ การศึกษาในระดับปริญญาโทสาขาปรสิตวิทยา จำนวน 2 คน นอกจากนี้ยังเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมแก่นักศึกษาในระดับปริญญาเอกสาขาชีวเคมีอีกจำนวน 3 คน และปัจจุบันเป็นอาจารย์ที่ ปรีกษาหลักของนักศึกษาในระดับปริญญาเอกสาขาปรสิตวิทยา จำนวน 1 คน และคาดว่าจะในปี การศึกษาใหม่นี้จะมีนักศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาปรสิตวิทยา อีกจำนวน 1 คน

2. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่

โครงการวิจัยนี้สามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ภายใต้โครงการคปก.สาขาชีวเคมีทาง การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ของ รศ.ดร.พวงรัตน์ ยงวณิชย์ ซึ่งเป็น mentor แก่ผู้วิจัย จำนวน 2 คน คือ

1.1 การศึกษาในสัตว์ทดลองเป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ของนางสาวสมคิด เดชะคำภู ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาเอก ชั้นปีที่ 4

1.2 การศึกษาในคนเป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ของนางสาวเรณู ทานันท์ ปัจจุบันกำลัง ศึกษาในระดับปริญญาเอก ชั้นปีที่ 5 และคาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษานี้ ประมาณเดือน เมษายน 2551

3. ได้องค์ความรู้ใหม่

- ได้องค์ความรู้ในการตอบสนองของเซลล์อักเสบต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ OV ผ่าน กระบวนการอักเสบและมีการสร้างอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ ไปทำลายสารชีวโมเลกุลและก่อ พยาธิสภาพของโรคตามมา ผ่านการแสดงออกของจีน TLR2, NF-kB แล้วมีการแสดงออกของ iNOS และ COX2

- ได้ทราบถึงบทบาทของจีน iNOS, COX-2, NF-kB, SOD1, SOD2, GPx และ CAT ใน กระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากพยาธิใบไม้ตับผ่านกระบวนการอักเสบ ซึ่งข้อมูลนี้จะได้นำมา ทดลองหาสารเพื่อนำมาป้องกันโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

4. ผลงานวิจัยสามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

4.1 ตีพิมพ์เผยแพร่ไปแล้ว 1 เรื่อง

Pinlaor, S., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Pinlaor, P., Ma, N., Sithithaworn, P., and Kawanishi, S. (2005). *Opisthorchis viverrini* antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line. *Int J Parasitol* **35**(6), 591-6.

4.2 คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่อีก 2 เรื่อง

1. Synergistic effect of *Opisthorchis viverrini* infection and *N*-nitrosodimethylamine on the expression of iNOS, NF-kappaB and COX-2 in an animal model of cholangiocarcinoma. โดยจะส่งไปตีพิมพ์ที่ *Carcinogenesis* หรือ *Cancer Science*
2. Induction of mRNA expression involving in oxidative and nitrative stress in white blood cells co-cultured with *Opisthorchis viverrini* antigen คาดว่าจะตีส่งไปตีพิมพ์ที่: *Int J Parasitol*

5. กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

ผลงานอื่นๆ เช่นการไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

1. นำเสนอผลการวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เมื่อเดือนตุลาคม 2549 เรื่อง “Synergistic effect of *Opisthorchis viverrini* infection and *N*-nitrosodimethylamine on the expression of iNOS, NF-kappaB and COX-2 in an animal model of cholangiocarcinoma” โดย Somchai Pinlaor et, al.
2. นำเสนอผลการวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ APOCP ที่กรุงเทพฯ เมื่อวันที่ 3-4 พฤศจิกายน 2549 นี้เรื่อง “induction of mRNA expression involving in oxidative and nitrative stress in white blood cells co-cultured with *Opisthorchis viverrini* crude extract” โดย Raynoo Thanan et, al. และได้รับรางวัลชนะเลิศของการประกวดผลงานในการนำเสนอแบบโปสเตอร์
3. ผู้วิจัยเป็นวิทยากรในการประชุมอบรมเชิงปฏิบัติการปรสตีวิทยาครั้งที่ 3-4 ในวันที่ 3-4 พฤษภาคม 2550 และวันที่ 17-18 พฤษภาคม 2550 นี้ ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเป็นวิทยากรในหัวข้อเรื่อง “กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ: จากอดีตจนถึงปัจจุบัน”
4. ผู้วิจัยใช้เป็นข้อมูลประกอบการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา แก่นักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกสาขาปรสตีวิทยา
 - รหัส 364 702 วิชา Advanced Parasitology ในหัวข้อ กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี บรรยายจำนวน 2 ชั่วโมง
 - รหัส 364 703 วิชา Experimental Parasitology ในหัวข้อ การเพาะเลี้ยงพยาธิใบไม้ และประโยชน์การนำมาใช้ บรรยายจำนวน 1 ชั่วโมง ปฏิบัติการ 12 ชั่วโมง

Rapid Communication

Opisthorchis viverrini antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line

Somchai Pinlaor^{a,e}, Saeko Tada-Oikawa^b, Yusuke Hiraku^b, Porntip Pinlaor^{c,e},
Ning Ma^d, Paiboon Sithithaworn^{a,e}, Shosuke Kawanishi^{b,*}

^aDepartment of Parasitology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^bDepartment of Environmental and Molecular Medicine, Mie University School of Medicine, 2-174, Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan

^cDepartment of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^dDepartment of Anatomy, Mie University School of Medicine, Mie 514-8507, Japan

^eLiver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Received 28 December 2004; received in revised form 17 February 2005; accepted 18 February 2005

Abstract

Opisthorchis viverrini infection induces inflammation in and around the bile duct, leading to cholangiocarcinoma in humans. To examine the mechanism of *O. viverrini*-induced inflammatory response, we assessed the expression of Toll-like receptors (TLRs) in RAW 264.7 macrophage cell line treated with an extract of *O. viverrini* antigen. Flow cytometry and immunocytochemistry showed that *O. viverrini* antigen induced the expression of TLR2 but not TLR4. Western blotting and immunocytochemistry revealed that nuclear factor- κ B (NF- κ B), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were expressed in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen in a dose-dependent manner. These results suggest that *O. viverrini* induces inflammatory response through TLR2-mediated pathway leading to NF- κ B-mediated expression of iNOS and COX-2.

© 2005 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Opisthorchis viverrini*; Toll-like receptor 2; Inducible nitric oxide synthase; Nuclear factor- κ B; Cyclooxygenase-2; RAW 264.7 macrophage cell line

Opisthorchis viverrini infection is a major risk factor of cholangiocarcinoma (CCA) development in humans (IARC, 1994). Nitric oxide (NO) produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been implicated in inflammation-mediated carcinogenesis (Hussain et al., 2003) including *O. viverrini*-caused CCA (Haswell-Elkins et al., 1994). Recently, we have demonstrated that chronic inflammation triggered by repeated *O. viverrini* infection mediates iNOS-dependent DNA damage in intrahepatic bile duct epithelium and inflammatory cells of hamsters, which may play an important role in CCA development (Pinlaor et al., 2003, 2004a). However, the underlining mechanism of *O. viverrini*-induced inflammatory response remains to be clarified.

Sripa and Kaewkes (2000) observed *O. viverrini* antigen in bile ducts of the liver, liver cells, Kupffer cells, macrophages, epithelioid and giant cells in the egg granuloma. The presence of the antigens was associated with heavy inflammatory cell infiltration, particularly with mononuclear cells. Importantly, Akai et al. demonstrated that antibody level against *O. viverrini* antigen was positively associated with the severity of hepatobiliary disease and CCA (Akai et al., 1994). Thus, local parasite-specific immune responses induced by *O. viverrini* antigens would play a role in the pathogenesis of opisthorchiasis associated with CCA development.

Toll-like receptors (TLR) are an important membrane receptor family, which actively participates in the stimulation of the innate immune response. To date, 10 TLR homologs have been found in humans. It has been reported that TLR2 and TLR4 contribute to immune response to parasitic infection including protozoa (Kropf et al., 2004)

* Corresponding author. Tel./fax: +81 59 231 5011.

E-mail address: kawanishi@doc.medic.mie-u.ac.jp (S. Kawanishi).

and helminth (van der Kleij et al., 2002). TLRs activate homologous signal transduction pathways leading to nuclear localization of NF- κ B/Rel-type transcription factors. NF- κ B is a key player in inflammation that regulates expression of various genes involved in controlling inflammatory response such as proinflammatory mediator, iNOS and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression (Balkwill and Coussens, 2004; Surh et al., 2001). In addition, COX-2 is involved in carcinogenesis through the induction of inflammatory process (Surh et al., 2001). The expression of COX-2 is increased in tumor tissue of CCA patients (Endo et al., 2002). Relevantly, NF- κ B functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer (Pikarsky et al., 2004).

In the present study, we investigated expression of TLRs, NF- κ B, iNOS and COX-2 in RAW 264.7 macrophage cell line treated with *O. viverrini* antigen using flow cytometry and immunofluorescence techniques. To confirm the expression of these molecules, we also performed Western blotting.

O. viverrini crude antigen was prepared as described previously (Pinlaor et al., 2004b) with a minor modification. Four months after hamsters were infected with 50 *O. viverrini*, adult worms were collected. Following the addition of protease inhibitors (0.1 mM phenylmethyl

sulphonyl fluoride, 0.1 mM L-1-tosylamine-2-phenylethyl chloromethyl ketone and 0.1 mM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E64)), the worms were homogenized with 10 passes of a microhomogenizer with a Teflon-coated pestle. The homogenate was frozen in liquid nitrogen and then thawed at 37 °C. The homogenate was centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 30 min. The supernatant containing crude somatic antigen was stored at –80 °C until use. The protein concentration in the supernatant was determined using the Coomassie® Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

RAW 264.7 mouse macrophage cell line was cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco/BRL, New York, NY, USA) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 100 mg/l kanamycin. The cells (1×10^6 cells) were detached from culture dishes by vigorous pipetting, and were centrifuged and resuspended in 1 ml fresh medium. Cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with crude *O. viverrini* antigen at 37 °C for indicated durations.

For analysis of TLR expression, *O. viverrini* antigen-treated RAW 264.7 cells were treated with 1 μ g/ml of rabbit polyclonal anti-TLR2 antibody or mouse monoclonal anti-TLR4 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and then incubated with 1 μ g/ml of Alexa

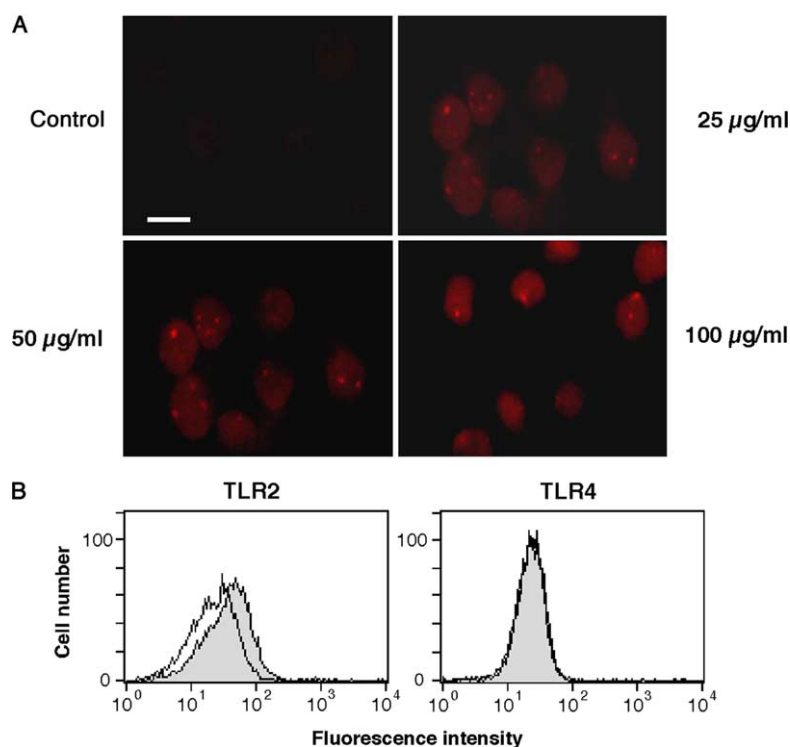


Fig. 1. TLR expression induced by *Opisthorchis viverrini* antigen. (A) Immunocytochemical analysis of TLR2 expression in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. RAW 264.7 cells were treated with *O. viverrini* antigen for 12 h at 37 °C, and then treated with anti-TLR2 antibody overnight at room temperature. The cells were incubated with Alexa 594 anti-rabbit IgG antibody for 3 h and then viewed under a fluorescent microscope. Scale bar = 10 μ m. (B) Flow cytometric fluorescence distribution of RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. RAW 264.7 cells were treated with 100 μ g/ml of *O. viverrini* antigen for 12 h at 37 °C, and then incubated with anti-TLR2 or anti-TLR4 antibody for 30 min. The cells were then incubated with Alexa 488 anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG antibody for 30 min and then analyzed with a flow cytometer. Open peaks, nontreated control cells; shaded peaks, *O. viverrini* antigen-treated cells.

488-labeled goat antibody against mouse IgG or against rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The cells were resuspended in PBS, and then analyzed on a flow cytometer (FACScan; Becton Dickinson).

Localization of NF- κ B and iNOS expression was assessed as described previously (Pinlaor et al., 2004a) with a minor modification. RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen were smeared on a glass slide. After drying at 60 °C for 2 h, cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. The cells were treated with 0.1% Triton X⁻¹ 100 for 15 min and then incubated with 1% skim milk for 30 min.

For simultaneous analysis of iNOS and NF- κ B expression, the cells were incubated with the primary antibodies, rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (1:300, Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, USA) and mouse monoclonal anti-NF- κ B antibody (1:300, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) overnight at room

temperature. Then, the cells were incubated with Alexa 594-labeled goat antibody against rabbit IgG and Alexa 488-labeled goat antibody against mouse IgG (1:400, Molecular Probes) for 3 h. The cells were examined under an inverted Laser Scan Microscope (LSM 410, Zeiss, Gottingen, Germany).

For analysis of the expression of TLR2, TLR4 and COX-2, the cells were incubated with the primary antibody [rabbit polyclonal anti-TLR2 antibody, mouse monoclonal anti-TLR4 antibody (1 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology) or rabbit polyclonal anti-COX-2 antibody (1:400, Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, USA)] overnight at room temperature. Subsequently, the cells were incubated with Alexa 594-labeled goat antibody against rabbit IgG or Alexa 488-labeled goat antibody against mouse IgG (1:400, Molecular Probes). The cells were examined under an inverted Laser Scan Microscope as described above.

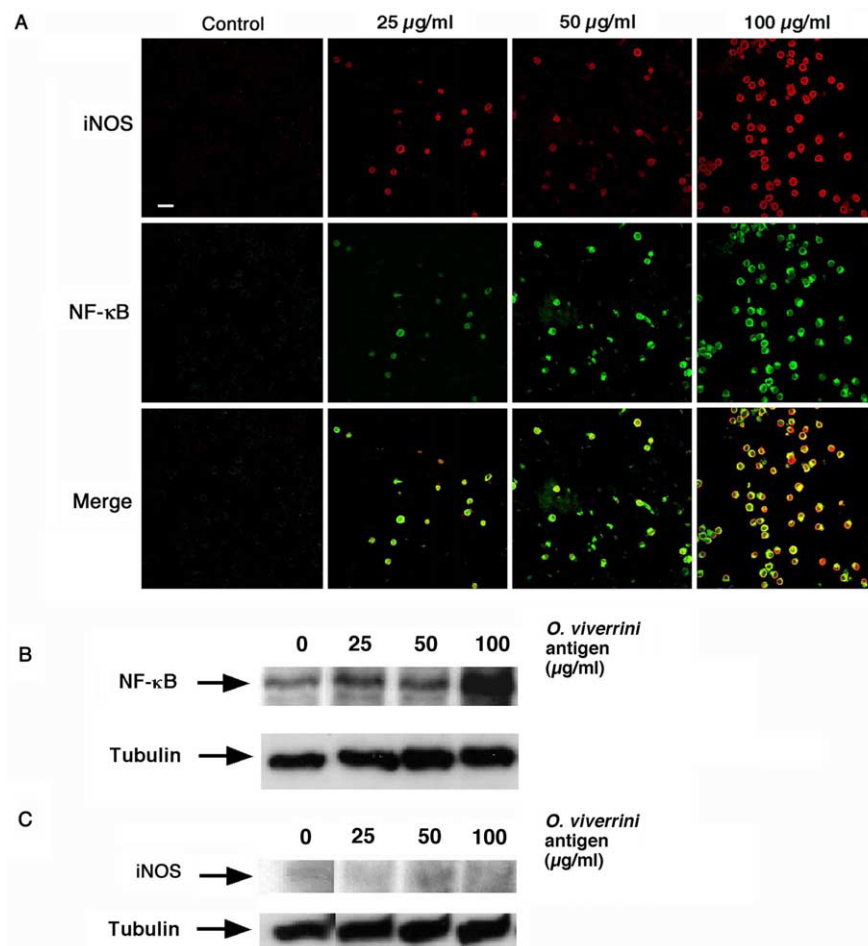


Fig. 2. Expression of NF- κ B and iNOS induced by *Opisthorchis viverrini* antigen. (A) Immunocytochemical analysis of iNOS and NF- κ B expression in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of *O. viverrini* antigen for 12 h, and then incubated with anti-iNOS and anti-NF- κ B antibodies followed by Alexa 594 anti-rabbit IgG or Alexa 488 anti-mouse IgG antibodies for 3 h and then viewed under an inverted Laser Scan Microscope. iNOS expression (red color) is observed in the cytoplasm, whereas NF- κ B (green color) is expressed in both nucleus and cytoplasm. Scale bar=10 μ m. (B, C) Western blotting analysis of NF- κ B and iNOS expression in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. Proteins extracted from *O. viverrini* antigen-treated RAW 264.7 cells were immunoblotted and probed with mouse monoclonal anti-NF- κ B antibody (B) or rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (C). (For interpretation of the reference to colour in this legend, the reader is referred to the web version of this article.)

RAW 264.7 cells treated with crude *O. viverrini* antigen were solubilized in sample buffer and boiled for 5 min. Samples were separated by 4–20% SDS-PAGE and blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were incubated with 5% skim milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS, pH 7.5). The membranes were then incubated with the primary antibody [mouse monoclonal anti-NF- κ B antibody (1:1000), rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (1:2000) or rabbit polyclonal anti-COX-2 antibody (1:1000)]. The membranes were washed in TBS and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) or anti-rabbit IgG antibody (1:2000, New England Biolabs, Beverly, MA, USA). After extensive washings in TBS, enhanced chemiluminescence assay was performed using an ECL detection reagent (Amersham) and positive bands were detected on X-ray films.

Fig. 1 shows the expression of TLRs in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. Immunocytochemistry revealed that *O. viverrini* antigen increased the expression of TLR2 dose-dependently (Fig. 1A), but not TLR4 (data not shown). TLR2 was not expressed in nontreated control cells (Fig. 1A). Flow cytometry confirmed that *O. viverrini* antigen increased the fluorescence intensity of TLR2, but not TLR4 (Fig. 1B).

Fig. 2 shows the expression of NF- κ B and iNOS in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. iNOS expression (red color) was observed in the cytoplasm, whereas NF- κ B expression (green color) was observed in

both nucleus and cytoplasm (Fig. 2A). *O. viverrini* antigen increased expression of NF- κ B and iNOS dose-dependently. Western blotting showed that the expression of NF- κ B (approximately 65 kDa, Fig. 2B) and iNOS (approximately 130 kDa, Fig. 2C) were increased dose-dependently in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen.

Fig. 3 shows COX-2 expression in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. The immunoreactivity of COX-2 increased in the cytoplasm depending on the concentration of *O. viverrini* antigen (Fig. 3A). COX-2 expression was not observed in nontreated control cells (Fig. 3A). Western blotting showed that COX-2 protein (approximately 70 kDa) was increased dose-dependently in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen (Fig. 3B).

This is the first study showing that *O. viverrini* antigen induces the expression of TLR2, which may participate in NF- κ B-mediated expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. The expression of these proteins was dependent on the concentration of *O. viverrini* antigen. TLR family recognizes conserved organism structures and activates signaling pathways (Barton and Medzhitov, 2003). Relevantly, it was reported that in schistosome infection, purified schistosomal antigen activates TLR2 in dendritic cells (van der Kleij et al., 2002). *O. viverrini* may mediate TLR2-dependent pathway through binding its lipoproteins as demonstrated using bacterial lipoproteins (Aliprantis et al., 1999). Our data can reasonably explain the clinical data showing that parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease were associated with *O. viverrini* infection (Haswell-Elkins et al., 1991). On the other hand, TLR4

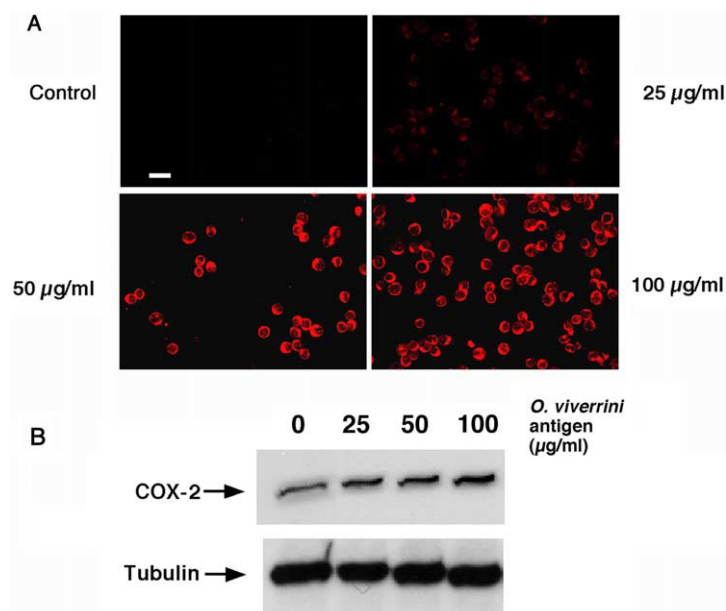


Fig. 3. COX-2 expression induced by *Opisthorchis viverrini* antigen. (A) Immunocytochemical analysis of COX-2 expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of *O. viverrini* antigen for 12 h, and then incubated with anti-COX-2 antibody followed by Alexa 594 anti-rabbit IgG antibody and then viewed under an inverted Laser Scan Microscope. COX-2 expression was observed in the cytoplasm dose-dependently, but not in untreated cells. Scale bar = 10 µm. (B) Western blotting analysis of COX-2 expression in RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen. Proteins extracted from RAW 264.7 cells treated with *O. viverrini* antigen were immunoblotted and probed with anti-COX-2 antibody.

contributes to efficient control of infection with protozoa such as *Leishmania major* (Kropf et al., 2004), and lipopolysaccharide, a major component of the outer surface of Gram-negative bacteria (Andonegui et al., 2003). In the present study, TLR4 expression was not increased in *O. viverrini* antigen-treated cultured cells. It has been reported that constitutively active TLR4 induces NF- κ B activation and subsequent production of inflammatory cytokines (Medzhitov et al., 1997). Thus, TLR4 may also participate in pathogenesis of *O. viverrini* infection.

Our results showed that NF- κ B was expressed in both the nucleus and cytoplasm, suggesting that *O. viverrini* antigen induces not only NF- κ B expression, but also its nuclear translocation and activation. NF- κ B regulates the expression of iNOS and COX-2 (Surh et al., 2001; Balkwill and Coussens, 2004). We have previously reported that *O. viverrini* infection strongly induces iNOS in bile duct epithelial cells and inflammatory cells (Pinlaor et al., 2004a). This finding can be explained by assuming that *O. viverrini* antigen mediates NF- κ B-mediated iNOS expression depending on TLR, since it has been reported that *O. viverrini* antigen is present in both epithelial bile duct and inflammatory cells (Sripa and Kaewkes, 2000). Relevantly, Harada et al. have reported that NF- κ B is expressed through TLR and related molecules in cultured biliary epithelial cells treated with bacterial LPS (Harada et al., 2003). COX-2 expression induces inflammatory cell infiltration (Surh et al., 2001) and participates in carcinogenesis (Oshima et al., 2004). Moreover, COX-2 expression is increased in tumor tissue of cholangiocarcinoma patients (Endo et al., 2002). Thus, COX-2 may participate in the pathogenesis of *O. viverrini* infection through an additional inflammatory response.

We have recently demonstrated that *O. viverrini* infection induces inflammation-mediated DNA damage through NO production via iNOS expression (Pinlaor et al., 2004a). DNA damage was observed in bile duct epithelial cells and inflammatory cells in the liver of hamsters with repeated *O. viverrini* infection and was associated with the progression of pathological changes (Pinlaor et al., 2004a). In the present study, in vitro experiments have shown that *O. viverrini* antigen induces the expression of TLR2, NF- κ B, iNOS and COX-2 in macrophage cell line. It is reasonably considered that TLR2 expression mediates NF- κ B expression and its nuclear translocation, leading to expression of iNOS and COX-2. In conclusion, the pathogenesis of *O. viverrini* infection, including carcinogenesis, may be mediated by inflammatory response triggered by its antigen via TLR2-dependent pathway.

Acknowledgements

This work was supported by Khon Kaen University, Research Fund and Faculty of Medicine, Khon Kaen

University, Thailand, and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

References

- Akai, P.S., Pungpak, S., Chaicumpa, W., Viroj, K., Bunnag, D., Befus, A.D., 1994. Serum antibody response to *Opisthorchis viverrini* antigen as a marker for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 471–474.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., Zychlinsky, A., 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736–739.
- Andonegui, G., Bonder, C.S., Green, F., Mullaly, S.C., Zbytniuk, L., Raharjo, E., Kubes, P., 2003. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J. Clin. Invest.* 111, 1011–1020.
- Balkwill, F., Coussens, L.M., 2004. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431, 405–406.
- Barton, G.M., Medzhitov, R., 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300, 1524–1525.
- Endo, K., Yoon, B.I., Pairojkul, C., Demetris, A.J., Sirica, A.E., 2002. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology* 36, 439–450.
- Harada, K., Ohira, S., Isse, K., Ozaki, S., Zen, Y., Sato, Y., Nakanuma, Y., 2003. Lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. *Lab. Invest.* 83, 1657–1667.
- Haswell-Elkins, M.R., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Elkins, D.B., Wongratanaheewin, S., Kaewkes, S., Mairiang, P., 1991. Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 84, 213–218.
- Haswell-Elkins, M.R., Satarug, S., Tsuda, M., Mairiang, E., Esumi, H., Sithithaworn, P., Mairiang, P., Saitoh, M., Yongvanit, P., Elkins, D.B., 1994. Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305, 241–252.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 276–285.
- IARC Working Group, 1994. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 61. IARC Lyon pp. 121–175.
- Kropf, P., Freudenberg, M.A., Modolell, M., Price, H.P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D.F., Muller, I., 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 72, 1920–1928.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr., C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Oshima, H., Oshima, M., Inaba, K., Taketo, M.M., 2004. Hyperplastic gastric tumors induced by activated macrophages in COX-2/mPGES-1 transgenic mice. *EMBO J.* 23, 1669–1678.
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y., 2004. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461–466.
- Pinlaor, S., Yongvanit, P., Hiraku, Y., Ma, N., Semba, R., Oikawa, S., Murata, M., Sripa, B., Sithithaworn, P., Kawanishi, S., 2003. 8-Nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 567–571.
- Pinlaor, S., Ma, N., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Semba, R., Oikawa, S., Murata, M., Sripa, B., Sithithaworn, P., Kawanishi, S., 2004a. 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* 25, 1535–1542.
- Pinlaor, S., Sripa, B., Sithithaworn, P., Yongvanit, P., 2004b. Hepatobiliary changes, antibody response, and alteration of liver enzymes in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini*. *Exp. Parasitol.* 108, 32–39.
- Sripa, B., Kaewkes, S., 2000. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *Int. J. Parasitol.* 30, 735–740.
- Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* 480–481, 243–268.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G., Yazdanbakhsh, M., 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277, 48122–48129.



INDUCTION OF mRNA EXPRESSION INVOLVING IN OXIDATIVE AND NITRATIVE STRESS IN WHITE BLOOD CELLS CO-CULTURED WITH *Opisthorchis viverrini* CRUDE EXTRACT

Raynoo Thanan^{1,2,4}, Somchai Pinlaor^{3,4}, Watcharin Loilome^{2,4}, Anchalee Techasen^{1,2,4}, Nisana N Tepsiri^{2,4}, Paiboon Sithithaworn^{3,4} and Puangrat Yongvanit^{2,4}

¹Graduate School, ²Department of Biochemistry, ³Department of Parasitology, ⁴Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand



1. Abstract

We performed the experiments to prove that *Opisthorchis viverrini* infection induces oxidative and nitritative stress via inflammatory process in human. White blood cell (WBC) primary culture was exposed with OV crude antigens by the co-culture technique. Lipopolysaccharide (LPS) stimulation was used as the positive control. The amount of OV antigens and duration of co-culturing were optimized for the appropriate condition of the experiments. After co-culturing, WBC was collected for mRNA extraction to determine candidate gene expressions involving in reactive oxygen and reactive nitrogen species production, from which COX-2, TLR-2, NFκB expressions were primarily analyzed. Our preliminary data after 6, 24 and 72 hr induction of WBC by crude OV antigen showed that COX-2, iNOS, NFκB and TLR-2 mRNA were overexpressed.

2. Introduction

We had demonstrated that a single- and repeated-infections with *Opisthorchis viverrini* (OV) could mediate oxidative and nitritative DNA damage in hamster model. This may play role in initiation and/or promotion steps of CCA carcinogenesis through chronic inflammation as shown in Fig 1. Thus, we would further prove by a co-culture experiment whether oxidative and nitrosative stress in human is occurred via this mechanism.

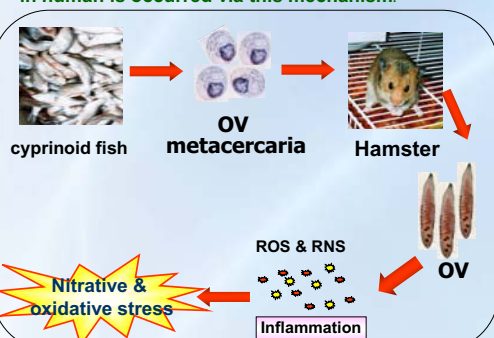


Fig 1. OV induced nitritative and oxidative stress in hamster model (Previous study by Pinlaor et al)

7. Financial Support

This work is supported by KKU-49 grant of Khon Kaen University and Thailand Research Fund through Royal Golden Jubilee Ph.D. Program to RT and PY.

3. Methodology

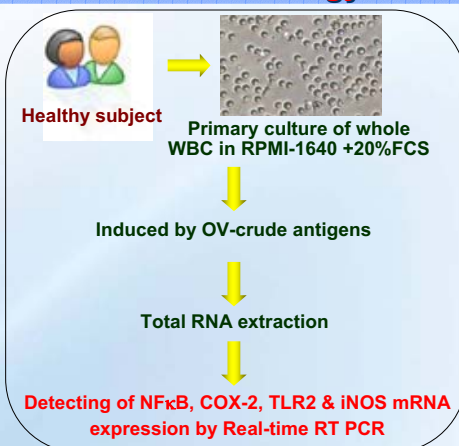


Fig 2. Experimental protocol of OV crude extract antigens inducing nitritative and oxidative stress in human WBC co-culture

4. Result



Fig 3. The morphology of WBC. Whole WBC was isolated from buffy coat then cultured in RPMI-1640+20%FCS (A). Twenty-four hours later the cells were co-cultured with OV crude extract for 24 h as well as control; no OV-antigens & LPS (B), induced by 100 ug/ml of OV-crude extract (C), and induced by 10 ug/ml of LPS (D).

5. Conclusion

Our study suggests that COX-2, iNOS, NFκB and TLR-2 genes could be induced in WBC at different time intervals as early and late response gene to OV crude antigens. The results indicated that OV infection may play roles in causing oxidative and nitritative stress in human. Fundamental knowledge of this study may be applied for chemoprevention study to inhibit cholangiocarcinogenesis in the future.

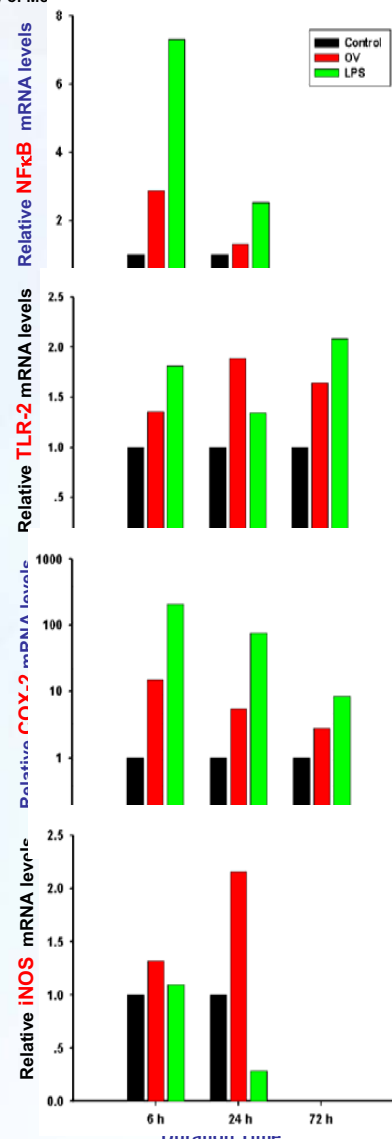


Fig 4. Relative mRNA expression of NFκB, TLR2, COX-2 and iNOS genes in whole WBC co-cultured with OV crude extract. After whole WBC was induced by OV crude antigens, whole WBC was collected and RNA was extracted. The levels of mRNA was analyzed by Real time RT PCR.

Synergistic effect of *Opisthorchis viverrini* infection and *N*-nitrosodimethylamine on the expression of iNOS, NF- κ B and COX-2 in an animal model of cholangiocarcinoma

Somchai Pinlaor^{a,*}, Puangrat Yongvanit^{b,e}, Somkid Dechakhamphu^{b,e}, Thidarut Boonmars^{a,e}, Paiboon Sithithaworn^{a,e}, Yusuke Hiraku^c, Shosuke Kawanishi^{c,d}

^aDepartment of Parasitology, ^bDepartment of Biochemistry, and ^cLiver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,

^dDepartment of Environmental and Molecular Medicine, Mie University Graduate School of Medicine, Japan, and ^eFaculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science, Japan

Introduction



OV



OV in bile duct



Fermented fished



CCA patient



CCA

Infection with the liver fluke *Opisthorchis viverrini* (OV) and *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) are the major risk factors of cholangiocarcinoma (CCA). OV infection is endemic in the Northeastern Thailand. Nitrate and nitrite are contained in fermented fish, the most favored food in this region. NDMA can be endogenously produced by the interaction of nitrite with secondary amines. The synergistic carcinogenic effect of OV plus NDMA is likely to occur in the environment.

We have recently reported OV infection mediates nitrate and oxidative DNA damage in an animal model through iNOS and NF- κ B expression. The expression of Toll-like receptor 2, iNOS and NF- κ B is a dose dependent with the induction by OV antigen in macrophage RAW cell line. Therefore, the study of these genes expression in cholangiocarcinogenesis may be useful for chemoprevention and biomarker of CCA development.

Objective

To investigate the expression of iNOS, NF- κ B, COX-2 and antioxidant enzymes in the liver of hamsters treated with OV and NDMA.

Methodology

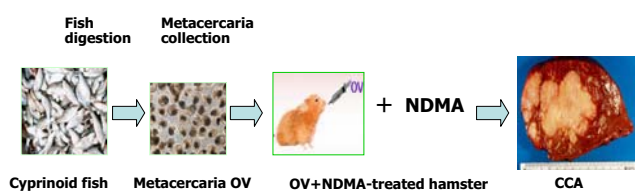


Fig.1 Methodological study in an animal model.

Experimental Design

Table.1 The experimental design of this study.

Groups	Time after treatment and the number of animals					
	21 D	1 M	2 M	3 M	4 M	6 M
OV	5	5	5	5	5	5
NDMA	5	5	5	5	5	5
OV + NDMA	5	5	5	5	5	5
Normal hamsters	5	5	5	5	5	5
Total number	20	20	20	20	20	20

References

1. Pinlaor S, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Srija B, Sithithaworn P, Kawanishi S. 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(8):1535-42.
2. Pinlaor S, Srija B, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Wongkham S, Pairojkul C, Bhudhisawasdi V, Oikawa S, Murata M, Semba R, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion. *World J Gastroenterol* 2005;11(30):4644-9.
3. Pinlaor S, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Pinlaor P, Ma N, Sithithaworn P, Kawanishi S. *Opisthorchis viverrini* antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line. *Int J Parasitol* 2005;35(6):591-6.
4. Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, Tada-Oikawa S, Ma N, Pinlaor P, Sithithaworn P, Srija B, Murata M, Oikawa S, Kawanishi S. iNOS-dependent DNA damage via NF- κ B expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *Int J Cancer* 2006;119(5):1067-72.

Results

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)-like genes, was decreased, while the expression of iNOS and COX-2 increased, suggesting that oxidative and nitrate stress occurred.

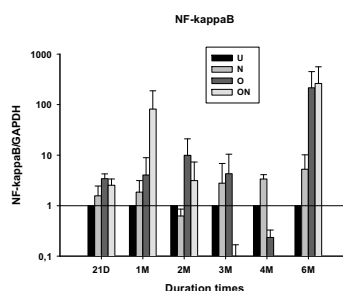


Fig2. Expression of NF- κ B detected by SYBR Green real-time PCR. The expression of NF- κ B synergistic increases in OV plus NDMA groups on 1M and the highest ratio in tumor group (n=3). The amount of mRNA was normalized to the internal control, GAPDH. U = normal, N = NDMA, O = OV, ON = OV plus NDMA.

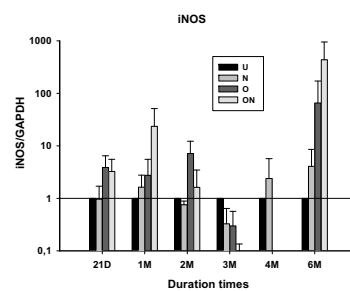


Fig3. Expression of iNOS detected by SYBR Green real-time PCR. The expression of iNOS synergistic increases in OV plus NDMA groups and the highest in tumor group (n=3). The amount of mRNA was normalized to the internal control, GAPDH. U = normal, N = NDMA, O = OV, ON = OV plus NDMA.

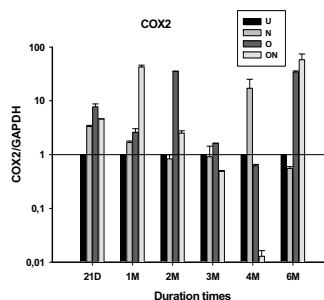


Fig4. Expression of COX2 detected by SYBR Green real-time PCR. The expression of COX2 synergistic increases in OV plus NDMA groups and the highest in tumor group (n=3). The amount of mRNA was normalized to the internal control, GAPDH. U = normal, N = NDMA, O = OV, ON = OV plus NDMA.

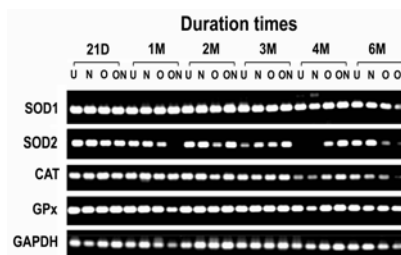


Fig5. Relative gel image expression of SOD1, SOD2, CAT and GPx detected by RT-PCR. The expression of SOD1, SOD2, CAT and GPx synergistic decrease in OV plus NDMA groups (n=3) compared with the internal control, GAPDH. U = normal, N = NDMA, O = OV, ON = OV plus NDMA.

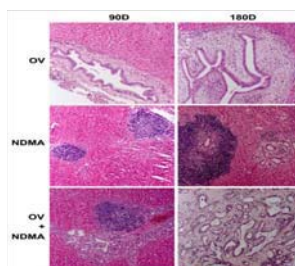


Fig.8 Histological feature of hamster liver. OV and NDMA synergistic induces CCA development on day 180.

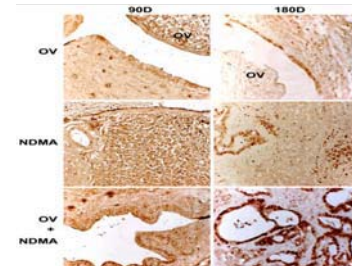


Fig.9 Localization of PCNA in hamster liver. OV and NDMA synergistic increases the expression of PCNA protein on epithelial bile ducts and inflammatory cells.

Conclusion

These results showed that the expression of iNOS, NF- κ B and COX-2 was 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.

Acknowledgements

Supported by Thailand research fund (TRF), Grant No. MGR-4880128, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, and Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Thailand.