การแสดงออกของอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตรส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) และไซโคออกซิจิเนสสอง (cyclooxygenase-2,COX-2) ผ่านเอ็นเอฟแคฟปาบี (NF-κB) ในโรคพยาธิใบไม้ตับ: การศึกษาจากสัตว์ทดลองไปสู่คน

บทคัดย่อ—การติดพยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV) เหนี่ยวนำไนเตรตีฟและออกซิเดทีฟดีเอ็นเอดาเมดผ่านกระบวนการอักเสบเรื้อรังนำไปสู่การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในคน เพื่อพิสูจน์กลไกของพยาธิ OV เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนอักเสบ เราจึงศึกษาการแสดงออกของอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตรส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) เอ็นเอฟแคฟปาบี (NF-κB) ไซโคออกซิจิเนสสอง (cyclooxygenase-2,COX-2) โทลไลรีเซฟเตอร์ แอนดี้ออกซิแดซเอนไซม์ และอินเฟมมาตอรี่ไซโตไคน์ใน (1) เซลล์มะเร็งแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV, ใน (2) ตับหนูแฮมสเตอร์ที่ให้พยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) และใน (3) เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่ติดพยาธิ 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 เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนอักเสบผ่านทาง TLR2 เพื่อให้มีการแสดงออกของ NF-κB ไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS และ COX-2

2) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ป้อนด้วยพยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA พยาธิ OV เสริมฤทธิ์กับสารก่อมะเร็ง NDMA เหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ผลการตรวจทางพยาธิฮีสโตพบว่าการติดพยาธิ OV อย่างเดียวเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดี ในขณะที่หนูกลุ่มที่ให้สารก่อมะเร็ง NDMA และ OV เสริมฤทธิ์ทำให้เกิดท่อน้ำดีขนาดเล็กและมะเร็งท่อน้ำดีที่ 6 เดือน ผลการตรวจโดยวิธี RT-PCR และ real-Time RT-PCR พบว่า OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA เสริมฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของจีน iNOS, NF-κB และ COX-2 สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกจีน 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 ในเยื่อบุผิวท่อน้ำดีและในเซลล์อักเสบสัมพันธ์กับการแสดงออกของจีนเหล่านี้ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าการแสดงออกของ iNOS, NF-κB และ COX-2 เกี่ยวข้องกับผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารก่อมะเร็ง NDMA และการติดพยาธิ OV ดังนั้นจีนเหล่านี้และผลผลิตของจีนอาจเป็น

ประโยชน์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเสี่ยงการเป็นมะเร็ง และอาจเป็นจีนเป้าหมายในการใช้สาร ป้องกันการเกิดมะเร็งต่อไป

3) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิ OV ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ผลการตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR พบว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำการแสดงออกของจีน IL-1, TLR-2, NF-κB, COX-2, SOD2 และ CAT ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ การแสดงออกของจีน IL-1, NF-κB, 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 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิ OV และกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV พบว่าแบบแผนของการแสดงออกของจีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ ยกเว้นการแสดงออกของจีน TLR-2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าอัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT เพิ่มเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าแอนติเจนของพยาธิ OV เหนี่ยวนำภาวะออกซิเดทีฟสเตรสผ่านการตอบสนองต่อกระบวนอักเสบ ซึ่งอาจนำไปใช้สารป้องกันการเกิดมะเร็งในการติดพยาธิ OV ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) via NF-κB 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-κB), 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-κB, 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-κB-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-κB 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-κB 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-κB, COX-2, and SOD2, CAT mRNA in WBC of healthy subject. Expression of IL-1, NF-κB, 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.