Research Article

ผลของนิโคติน ไรแฟมพิซิน และเบนโซ[เอ]ไพรีน ต่อการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

ธัญลักษณ์ บุญมาทน[1], กนกวรรณ จารุกำจร[2], วรัญญา จตุพรประเสริฐ[3]*

[1] กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

[2] ปร.ด. รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

[3] ปร.ด. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

*** ติดต่อผู้นิพนธ์:** วรัญญา จตุพรประเสริฐ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

โทรศัพท์: 043-754121 โทรสาร: 043-754121 อีเมล์: waranya.c@msu.ac.th

บทคัดย่อ

ผลของนิโคติน ไรแฟมพิซิน และเบนโซ[เอ]ไพรีน ต่อการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

ธัญลักษณ์ บุญมาทน[1], กนกวรรณ จารุกำจร[2], วรัญญา จตุพรประเสริฐ[3]*

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2561; 14(2) : 94-104

รับบทความ : 24 มกราคม 2561 **ตอบรับ :** 17 เมษายน 2561

CYP1 และ CYP2 เป็นสมาชิกของกลุ่มเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (Cytochrome P450, CYP) ที่มีการแสดงออกหลักในตับและมีบทบาทในการเมแทบอลิซึมสารในชีวิตประจำวันหลายชนิด นิโคตินเป็นสารในบุหรี่ที่ถูกเมแทบอลิซึมโดย CYP2A6 และ CYP2A13 เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[*a*]pyrene, BaP) เป็นสารก่อมะเร็งในอาหารปิ้งย่าง รวมถึงควันจากเครื่องยนต์โดยถูกเมแทบอลิซึมผ่าน CYP1A2 และสามารถกระตุ้นสมรรถนะของ CYP450 หลายไอโซฟอร์มรวมทั้ง CYP1A2 ยาต้านวัณโรคไรแฟมพิซินสามารถกระตุ้นสมรรถนะของ CYP450 หลายไอโซฟอร์มและก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาทางคลินิก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของนิโคติน ไรแฟมพิซิน และ BaP ต่อการแสดงออกของ CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13 และ CYP2E1 ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ HepG2 **วิธีการทดลอง:** เซลล์ HepG2 ได้รับสารทดสอบ ได้แก่ นิโคติน (1, 10 และ 100 µM) ไรแฟมพิซิน (10 µM), BaP (10 µM) และกลุ่มควบคุมได เมธิลซัลฟอกไซด์ (0.1% DMSO) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสกัด total RNA จากนั้นทำการตรวจวัดการแสดงออกที่ระดับ mRNA ของ CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13 และ CYP2E1 ด้วยเทคนิค RT-qPCR เปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง GAPDH **ผลการทดลอง:** CYP1A2 ถูกกระตุ้นได้ด้วยนิโคตินความเข้มข้นต่ำ (1 µM) เช่นเดียวกับ BaP ในขณะที่นิโคตินและ BaP สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CYP2A6 และ CYP2A13 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ส่วน CYP2E1 ถูกกระตุ้นได้ด้วยนิโคตินความเข้มข้นสูง (100 µM) เช่นเดียวกับ BaP ส่วนไรแฟมพิซินสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CYP2A13 และ CYP2E1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือมีเพียงนิโคตินความเข้มข้นต่ำเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นตัวรับแอริลไฮโดรคาร์บอน (arylhydrocarbon receptor, AhR) **สรุป:** นิโคตินเพิ่มการแสดงออกของ CYP2A6, CYP2A13, CYP1A2 และ CYP2E1 mRNA ได้เทียบเท่ากับ BaP และวิถีการควบคุมการแสดงออกของ CYP โดยนิโคตินอาจมีความเกี่ยวข้องกับ AhR

คำสำคัญ: นิโคติน, ไซโตโครม พี 450, ตัวรับแอริลไฮโดรคาร์บอน, CYP2A, HepG2

Effects of Nicotine, Rifampicin and Benzo[a]pyrene on the Expression of Cytochrome P450 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells

Thanyalak Boonmaton[1], Kanokwan Jarukamjorn[2], Waranya Chatuphonprasert[3]*

[1] Research Group for Pharmaceutical Activities of Natural Products using Pharmaceutical Biotechnology (PANPB), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] Ph.D. (Pharmaceutical Sciences) Associate Professor, Research Group for Pharmaceutical Activities of Natural Products using Pharmaceutical Biotechnology (PANPB), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[3] Ph.D. (Research and Development in Pharmaceuticals) Assistant Professor, Faculty of Medicine, Mahasarakam University, Mahasarakham 44000

*** Corresponding author :** Waranya Chatuphonprasert, Faculty of Medicine, Mahasarakam University, Mahasarakham 44000

Tel: +66 43-754121 Fax: +66 43-754121 E-mail: waranya.c@msu.ac.th

Abstract

Effects of Nicotine, Rifampicin and Benzo[a]pyrene on the Expression of Cytochrome P450 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells

Thanyalak Boonmaton[1], Kanokwan Jarukamjorn[2], Waranya Chatuphonprasert[3]*

IJPS, 2018; 14(2) : 94-104

Received : 24 January 2018 **Accepted :** 17 April 2018

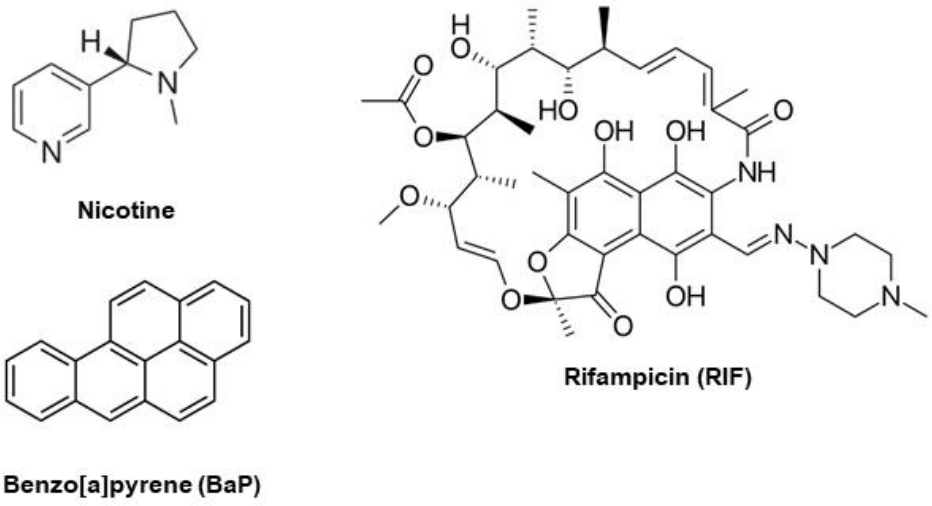
CYP1 and CYP2, members of cytochrome P450 enzymes (CYP), are mainly expressed in liver and responsible for several chemicals in daily life. Nicotine, a compound in cigarettes, is metabolized by CYP2A6 and CYP2A13. Benzo[*a*]pyrene (BaP), a carcinogen is found in grilled food and smoke from engines, is metabolized by CYP1A2. BaP is also an inducer of several CYP isoforms including CYP1A2. Rifampicin, an anti-tuberculosis drug, has potency to induce several CYPs and causes clinical drug interactions. The objective of this study was to determine the effect of nicotine, rifampicin, and BaP on the expression of CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13, and CYP2E1 in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. **Methods:** HepG2 was treated with nicotine (1, 10, and 100 μM), rifampicin (10 μM), BaP (10 μM), and 0.1% DMSO (as the control) for 24 h before total RNA extraction. After that, the expression of CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13, CYP2E1, and AhR mRNA was determined using RT-qPCR, compared to a reference gene, GAPDH. **Results:** CYP1A2 was induced by low dose of nicotine (1 μM), same as BaP. Moreover, nicotine and BaP can induce the expression of CYP2A6 and CYP2A13 in dose-dependent pattern. CYP2E1 was induced by high dose of nicotine (100 μM), same as BaP. Rifampicin significantly induced the expression of CYP2A13 and CYP2E1. Interestingly, only nicotine at the low dose induced arylhydrocarbon receptor (AhR). **Conclusion:** Nicotine induced the expression of CYP2A6, CYP2A13, CYP1A2, and CYP2E1 mRNAs, comparable to BaP, and the regulatory pathway of CYPs by nicotine might related to AhR, at least in part.

Keywords: nicotine, cytochrome P450, arylhydrocarbon receptor, CYP2A, HepG2

บทนำ

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (cytochrome P450, CYP) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีการแสดงออกที่ตับเป็นหลัก ซึ่ง CYP สามารถแบ่งออกเป็นหลายไอโซฟอร์ม ได้แก่ CYP3A4 มีบทบาทหลักในกระบวนการเมแทบอลิซึมยามากถึงร้อยละ 50 ของยาแผนปัจจุบันที่มีการใช้ทางคลินิก แต่ CYP บางไอโซฟอร์ม เช่น CYP1A, CYP1B, CYP2A, CYP2B, และ CYP2E มีความสำคัญกับการเมแทบอลิซึมยาทางคลินิกไม่มากนักแต่มีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษและสารก่อมะเร็งหลายชนิดไปให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ นอกจากนี้การแสดงออกของ CYP สามารถแตกต่างกันด้วยหลายปัจจัย อาทิ อาหารที่รับประทาน สารพิษในสิ่งแวดล้อม การแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละอวัยวะ รวมทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมยาและการชำระยา (Gonzalez *et al*., 2017)

ปัจจุบันมนุษย์เผชิญกับสารก่อมะเร็งมากมายในชีวิตประจำวัน ตั้งแต่ควันจากท่อไอเสีย/เครื่องยนต์ รูปแบบการใช้ชีวิตสมัยใหม่ที่นิยมดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ ซึ่งทั้งนิโคติน (Nicotine, รูปที่ 1) ในบุหรี่ แอลกอฮอล์ และสารก่อมะเร็งทั้งในบุหรี่และมลภาวะล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับจากวิถีการเมแทบอลิซึมโดย CYP การศึกษาก่อนหน้าพบว่า CYP1A2 ถูกกระตุ้นได้โดยสารก่อมะเร็ง เช่น เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[*a*] pyrene, BaP รูปที่ 1) ผ่านตัวรับเอริลไฮโดรคาร์บอน (aryl hydrocarbon receptor, AhR) (Zhou *et al*., 2010) CYP2A6 เป็นไอโซฟอร์มที่มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมนิโคตินไปเป็นสารตัวกลางก่อมะเร็ง (intermediate carcinogen) ในตับ อีกทั้ง CYP2A6 ยังสามารถถูกกระตุ้นได้โดย BaP (Hu *et al*., 2015) ส่วน CYP2A13 เป็นไอโซฟอร์มของ CYP2A ที่มีการแสดงออกหลักที่เยื่อบุโพรงจมูก (Koskela *et al*., 1999) และมีบทบาทในการเมแทบอลิซึมนิโคตินและสารตัวกลางก่อมะเร็งเช่นเดียวกับ CYP2A6 ทั้งในตับและเยื่อบุโพรงจมูก (Rossini *et al*., 2008) CYP2E1 เป็นไอโซฟอร์มในตับที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) ของสารโมเลกุลเล็ก เช่น เอธานอล และ CYP2E1 ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดยเอธานอล (Heit *et al*., 2013) นอกจากนี้ยาต้านวัณโรคไรแฟมพิซิน (Rifampicin, RIF รูปที่ 1) เป็นยาหนึ่งที่มีรายงานความเป็นพิษต่อตับและอันตรกิริยาที่สูงมาก เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำระดับเอนไซม์ CYP หลายไอโซฟอร์ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเหนี่ยวนำ CYP3A4 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่รับผิดชอบต่อการเมแทบอลิซึมยาทางคลินิกส่วนใหญ่ (Ramappa and Aithal, 2013) และยังมีรายงานการกระตุ้นการแสดงออก CYP2A6 โดย RIF ด้วย (Itoh *et al*., 2006) อีกทั้ง RIF ยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของไอโซฟอร์มอื่นๆ เช่น CYP2B6 และ CYP2C9 (Chen *et al*., 2015) การศึกษานี้จึงเลือกใช้ RIF เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกร่วมด้วย



รูปที่ 1 โครงสร้างของนิโคติน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไรแฟมพิซิน

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของนิโคตินในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13 และ CYP2E1 รวมถึงตัวรับ AhR ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ (human hepatocellular carcinoma, HepG2) โดยเปรียบเทียบกับ BaP และ RIF เพื่อความเข้าใจในกลไกการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP ไอโซฟอร์มต่างๆ ในโมเดล HepG2 ซึ่งการแสดงออกของ CYP1A2 ใน HepG2 ยังมีความสอดคล้องกับเซลล์ตับปฐมภูมิของมนุษย์ (human primary hepatocytes) (Stefan and Augustinus, 2003) HepG2 จึงเป็นโมเดลที่ได้รับความนิยมในการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมในตับของมนุษย์ (Costantini *et al*., 2013)

สารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์ HepG2 (HB-8065™, ATCC, USA) คือ DMEM [+] 1g/L D-Glucose, [+] L-Glutamine, [+] 110 mg/mL Sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin/neomycin (PSN) จากบริษัท Gibco®, USA สารทดสอบ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), nicotine, rifampicin (RIF), benzo[a]pyrene (BaP) จากบริษัท Sigma Aldrich, USA สารเคมีสำหรับ RT-qPCR ได้แก่ reverse transcriptase enzyme, reverse transcription buffer, random primer, 10mM dNTP mixture, SYBR Green I และ Taq DNA polymerase เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทToyobo (Osaka, Japan), Invitrogen™ (USA), Cambrex Bio Sci (USA), และ Vivantis (Malaysia) ไพรเมอร์ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) และถูกสังเคราะห์โดย บริษัท Bio Basic Inc. (Canada) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับ qPCR

Gene	Product size (bp)	Annealing Temperature (^{o}C)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
GAPDH	72	61.1	CACCATCTTCCAGGAGCGAG	GACTCCACGACGTACTCAGC
CYP1A2	285	60.0	ACTTCGACCCTTACAATCAG	CACTGTTCTTGTCAAAGTCC
CYP2A6	284	56.3	TCAAAGGCTATGGCGTGGTA	CATCATGCGCAACAGTGACA
CYP2A13	185	61.0	CGCCACCCTAAGGGGTTTT	CATAGTCAAAGCGGTCCCCA
CYP2E1	202	61.1	GTTCTTTGCGGGGACAGAGA	GAGGGTGATGAACCGCTGAA
AhR	112	61.1	CAACAGCAACAGTCCTTGGC	GTTGCTGTGGCTCCACTACT

วิธีดำเนินการวิจัย

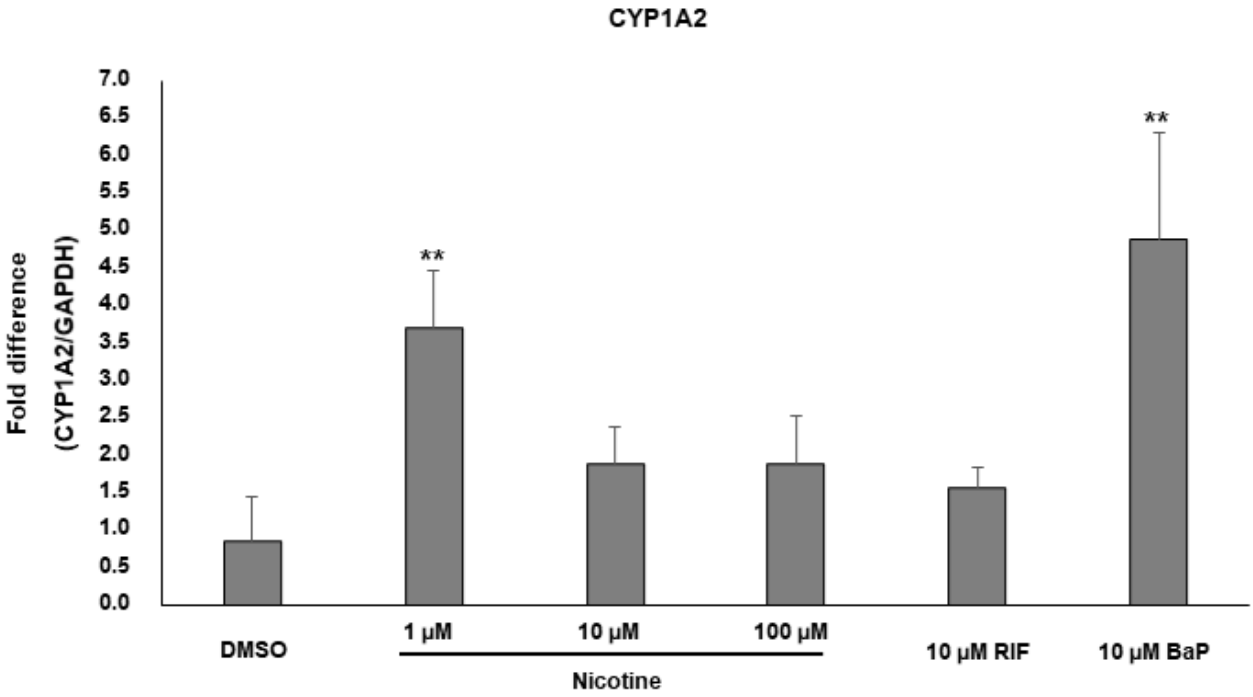
การเลี้ยงเซลล์ HepG2 - เซลล์ HepG2 (HB-8065™ ATCC, Manassas, USA) จำนวน 5x10^{6} cells/mL ถูกเลี้ยงใน 6-well plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+10% FBS+PSN ภายใต้อุณหภูมิ 37 ^{o}C ที่ความชื้น 95% หลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ HepG2 (n=4-5 wells ต่อกลุ่ม) ได้รับสาร 0.1% DMSO (กลุ่มควบคุม) หรือ 1, 10, 100 µM nicotine หรือ 10 µM BaP หรือ 10 µM RIF เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง การเลือกใช้ BaP และ RIF ในความเข้มข้นเดียวคือ 10 µM เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ทราบผลการทดลองก่อนหน้าว่าสามารถเหนี่ยวนำ CYPs หลายไอโซฟอร์ม โดยสารทั้งหมดละลายใน DMSO และมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์จาก DMSO

การเตรียม total RNA และ RT-qPCR - 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารทดสอบ total RNA จากเซลล์จะถูกเตรียมด้วยวิธี Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (Chomczynski

and Sacchi, 1987) จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาวัดความเข้มข้นและทดสอบความสมบูรณ์ (RNA integrity) ภายใต้ 1.25% agarose gel ก่อนเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ ReverTraAce® (Toyobo, Osaka, Japan) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท หลังจากนั้น cDNA จะถูกนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของแต่ละยีนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแต่ละยีน (ตารางที่ 1) สำหรับปฏิกิริยา qPCR ประกอบด้วย Taq-buffer (Vivantis), magnesium chloride (Vivantis), dNTP mixture (Vivantis), forward/reverse primer (Bio Basic Inc. Canada), SYBR Green I fluorescence dye (Cambrex Bio Sci) และ Taq DNA polymerase enzyme (Vivantis) และวิธีการตามที่แนะนำโดยบริษัท ปฏิกิริยา qPCR เกิดขึ้นภายใต้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 Touch™, Biorad (USA) ร่วมกับโปรแกรม Bio-Rad-CFX manager version 3.1 machine จากนั้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนอ้างอิง (reference gene) คือ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

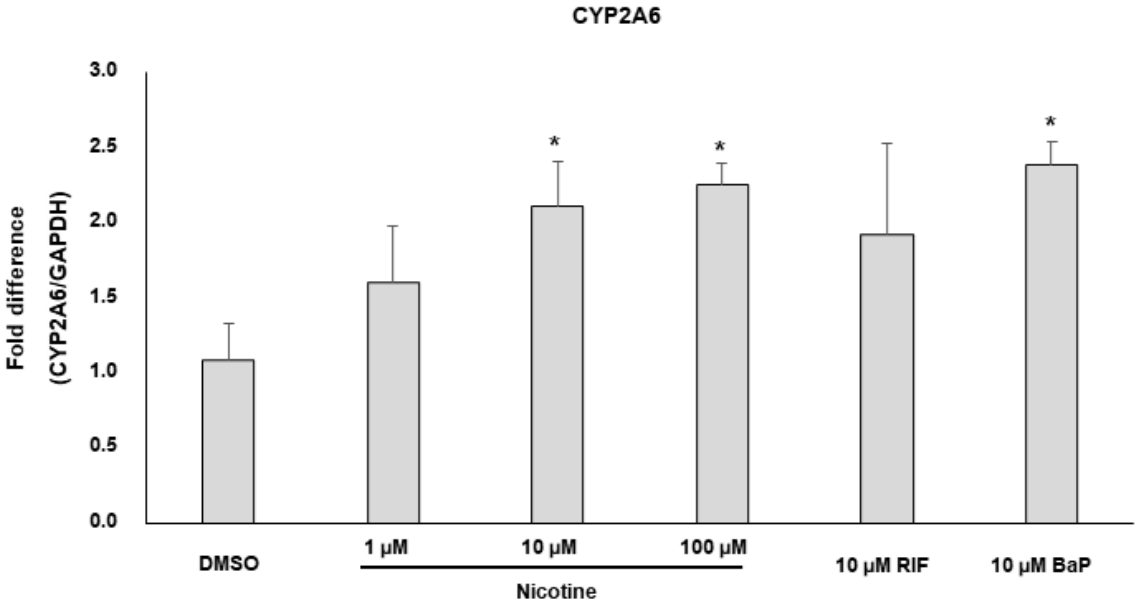
การทดสอบทางสถิติ - ความแตกต่างทางสถิติถูกทดสอบโดยใช้ comparative mean One-Way ANOVA ร่วมกับ Turkey's statistical *post hoc* test ด้วยโปรแกรม SPSS (version 11.0) ค่านัยสำคัญจะแสดงที่ *p<0.05 และ **p<0.001

ผลการวิจัย



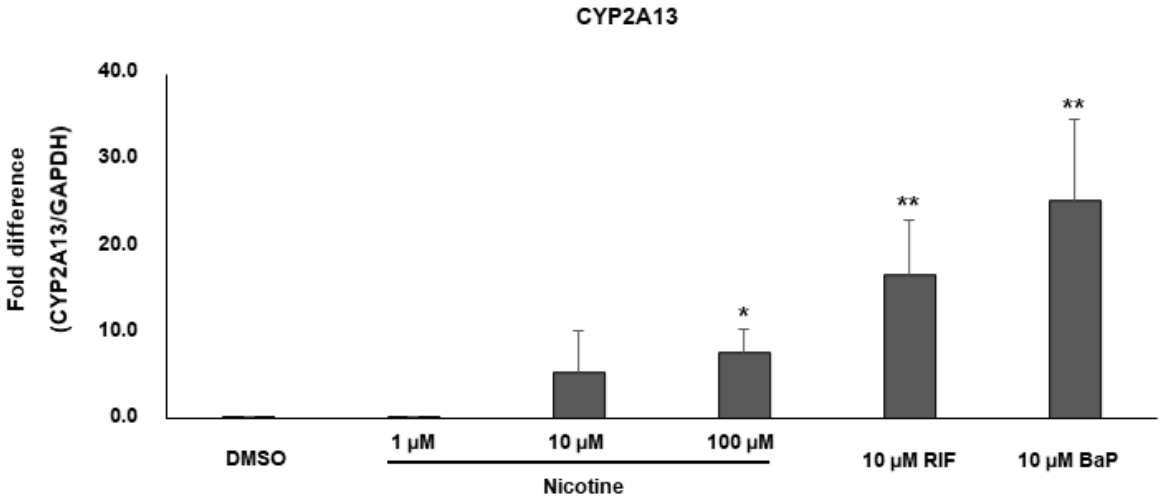
รูปที่ 2 การแสดงออกของ CYP1A2 ในเซลล์ HepG2 (n=4-5) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร DMSO, 0.1% DMSO; 1-10 µM Nicotine, RIF, rifampicin; BaP, benzo[a]pyrene. **p<0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม DMSO

จากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่า 1 µM nicotine และ 10 µM BaP สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน CYP1A2 ที่ระดับ mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) ในขณะที่ nicotine ความเข้มข้นที่สูงขึ้นและ RIF ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ CYP1A2 ในขณะที่การแสดงออกของ CYP2A6 (รูปที่ 3) nicotine ที่ความเข้มข้นสูง (10 µM และ 100 µM) รวมทั้ง BaP สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2A6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ RIF ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ CYP2A6



รูปที่ 3 การแสดงออกของ CYP2A6 ในเซลล์ HepG2 (n=4-5) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร DMSO, 0.1% DMSO; 1-10 µM Nicotine, RIF, rifampicin; BaP, benzo[a]pyrene. *p<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม DMSO

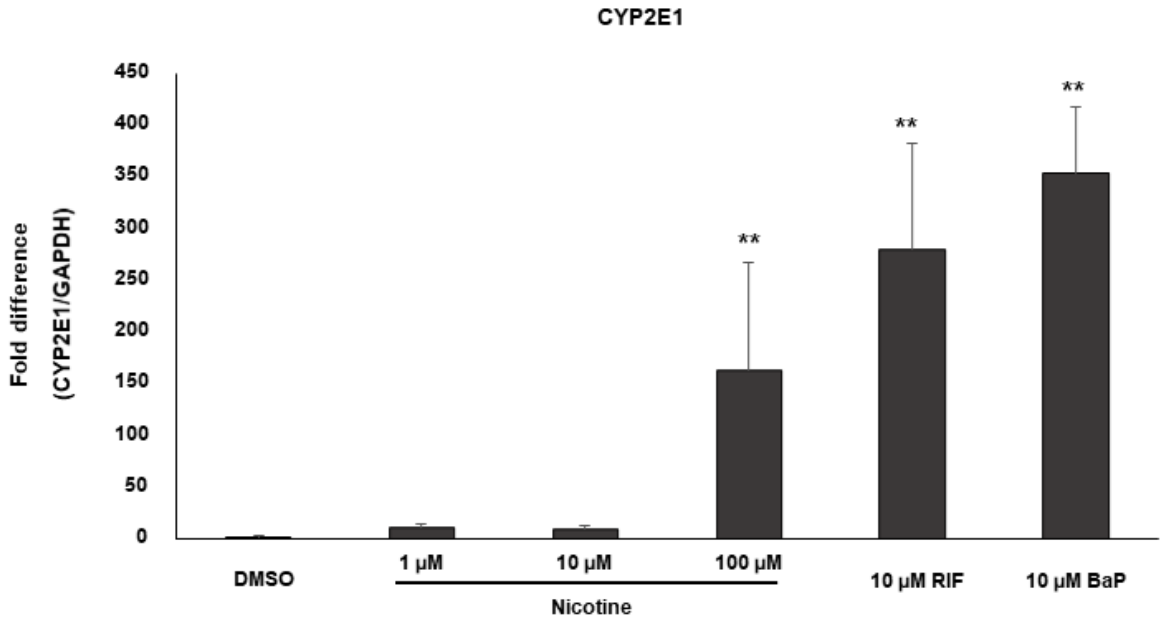
สำหรับการแสดงออกของ CYP2A13 (รูปที่ 4) พบว่า nicotine ที่ความเข้มข้นสูง (100 µM) และ BaP สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2A13 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกของ CYP2A6 ในขณะที่ RIF สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2A13 ได้มากกว่า nicotine ยิ่งไปกว่านี้ BaP มีศักยภาพเหนี่ยวนำ CYP2A13 ได้สูงสุดถึง 30 เท่า



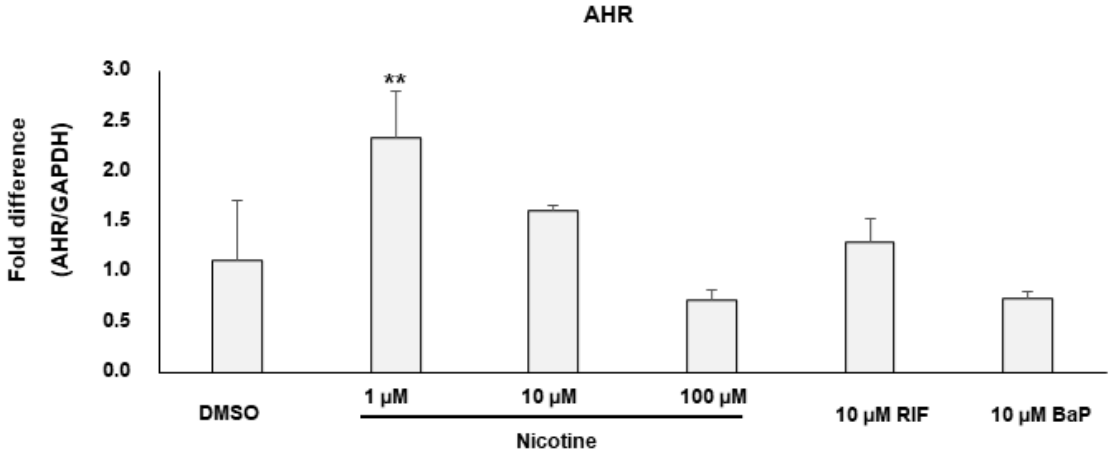
รูปที่ 4 การแสดงออกของ CYP2A13 ในเซลล์ HepG2 (n=4-5) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร DMSO, 0.1% DMSO; 1-10 µM Nicotine, RIF, rifampicin; BaP, benzo[a]pyrene. *p<0.05 และ **p<0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม DMSO

ส่วนผลการแสดงออกของ CYP2E1 (รูปที่ 5) สอดคล้องกับผลการแสดงออก CYP2A13 กล่าวคือ nicotine ที่ความเข้มข้นสูง (100 μM) RIF และ BaP สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2E1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ BaP เหนี่ยวนำการแสดงออกได้สูงสุด (ประมาณ 350 เท่า) ส่วน RIF และ nicotine เหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2E1 ให้สูงขึ้นได้ประมาณ 200-300 เท่า

นอกจากผลต่อการแสดงออกของ CYP ที่ได้กล่าวไปข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของตัวรับนิวเคลียร์ AhR (รูปที่ 6) พบว่ามีเพียง 1 μM nicotine เท่านั้นที่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ AhR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 5 การแสดงออกของ CYP2E1 ในเซลล์ HepG2 (n=4-5) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร DMSO, 0.1% DMSO; 1-10 μM Nicotine, RIF, rifampicin; BaP, benzo[a]pyrene. **p<0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม DMSO



รูปที่ 6 การแสดงออกของตัวรับ AhR ในเซลล์ HepG2 (n=4-5) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร DMSO, 0.1% DMSO; 1-10 μM Nicotine, RIF, rifampicin; BaP, benzo[a]pyrene. **p<0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม DMSO

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการทดลองพบว่า nicotine ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A2 ได้มากกว่า nicotine ที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Price และคณะ (2004) ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ CYP1A โดยการวัดสมรรถนะของเอนไซม์ 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) ในเนื้อเยื่อปอดของหนูขาวสูงขึ้นเมื่อได้รับ nicotine ที่ความเข้มข้น 50 μM แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ nicotine เป็น 200 μM กลับไม่สามารถเหนี่ยวนำ CYP1A ได้ (Price *et al*., 2004) ในขณะที่การศึกษาในไมโครโซมจากตับหนูขาว (hepatic microsome) ที่ได้รับ nicotine ขนาด 20-200 mg/kg ในอาหารเป็นระยะเวลา 30 วันพบว่า nicotine เหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 และ CYP1A2 ให้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและผลการเหนี่ยวนำของ CYP1A2 เพิ่มขึ้นตามขนาดของสาร (dose-dependent) ส่วน CYP1A1 ถูกเหนี่ยวนำด้วย nicotine ขนาด 200 mg/kg เท่านั้น (Iba *et al*., 1999) จากผลการศึกษาครั้งนี้ในเซลล์ HepG2 อาจอธิบายได้จากปรากฏการณ์ความผันแปรทางพันธุกรรม (polymorphisms) ในยีน AhR (Smart and Daly, 2000) และ CYP1A2 (Sachse *et al*., 1999) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำ CYP1A2 ที่แตกต่างกันในมนุษย์แต่ละคน โดยยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดในบางโมเดลที่ศึกษาการแสดงออกของ CYP1A2 (Wei *et al*., 2002) ดังนั้นการทดลองด้วยโมเดลสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน อาจจะให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน ส่วนการศึกษาในเนื้อเยื่อปอดเพาะเลี้ยง (lung explant culture) พบว่า BaP ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถเหนี่ยวนำ CYP1A1 และ CYP1A2 ได้สูงถึง 2-5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Wei *et al*., 2002) สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้

CYP2A6 เป็นไอโซฟอร์มที่มีบทบาทสำคัญในตับ อีกทั้ง CYP2A6 ยังสามารถถูกกระตุ้นได้โดย BaP (Hu *et al*., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ อีกทั้ง CYP2A6 ยังมีรายงานว่ามีความสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ในไมโครโซมจากตับมนุษย์ (Messina *et al*., 1997) อีกทั้ง CYP2A6 มีหน้าที่ในการเปลี่ยนยาต้านมะเร็ง tegafur (prodrug) ให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ (active form) คือ 5-fluorouracil (5-FU) (Miura *et al*., 2015) ดังนั้นการได้รับสาร nicotine ร่วมกับ tegafur หรือยาต้านมะเร็งอื่นที่อาศัย CYP2A6 ในการแปลงรูป อาจจะได้รับผลกระทบหรืออาการไม่พึงประสงค์จาก active form ที่สูงเกินไป นอกจากนี้หากต้องการศึกษาการแสดงออกของ CYP2A6 อาจจะเลือกใช้ nicotine เป็นตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการแสดงออกของ CYP2A6 ใน HepG2 ในอนาคต ส่วน CYP2A13 เป็นไอโซฟอร์มที่มีการแสดงออกหลักที่เยื่อบุโพรงจมูก (Koskela *et al*., 1999) และมีบทบาทในการเมแทบอลิซึม nicotine เช่นเดียวกับ CYP2A6 ในตับ (Bao *et al*., 2005; Rossini *et al*., 2008) นอกจากนี้ผลของการเหนี่ยวนำ CYP2A13 โดย nicotine ในปอดนั้นยังขึ้นกับความผันแปรทางพันธุกรรมของ CYP2A13 ที่ส่งผลต่อความเสี่ยงที่แตกต่างกันในการเกิดมะเร็งปอดในมนุษย์ (Wang *et al*., 2003) จากการศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุล (molecular docking) ของ nicotine และ CYP2A6 และ CYP2A13 พบว่า nicotine สามารถจับกับทั้งสองเอนไซม์นี้ได้จึงอาจเป็นเหตุผลที่อธิบายความสามารถในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองให้สูงขึ้นได้ใน HepG2 (Shimada *et al*., 2016) ส่วนการศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของ BaP พบว่า BaP สามารถจับกับ CYP2A13 ได้ (Shimada *et al*., 2013) ยากันชักหลายชนิด (รวมถึง phenobarbital) และ RIF สามารถเหนี่ยวนำ CYP2A6 ให้สูงขึ้นในตับมนุษย์ และในเซลล์ตับปฐมภูมิของมนุษย์ (human hepatocyte) RIF ก็สามารถเหนี่ยวนำ CYP2A6 ได้เช่นกัน (Pelkonen *et al*., 2000) และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า RIF มีแนวโน้มที่จะเหนี่ยวนำ CYP2A6 ให้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ CYP2A13 สามารถถูกเหนี่ยวนำให้สูงขึ้นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่กลไกการควบคุมการแสดงออกระหว่าง CYP2A6 และ CYP2A13 มีความแตกต่างกัน

การศึกษาก่อนหน้าพบว่า nicotine สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2E1 ในตับหนูขาว (Howard *et al*., 2001) และเมื่อได้รับยา RIF ร่วมกับ isoniazid สามารถเหนี่ยวนำให้ CYP2E1 ในตับหนูขาวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Yue *et al*., 2009) แต่การศึกษาผลของ BaP ต่อการเหนี่ยวนำ CYP2E1 ในเซลล์ Chinese hamster V79-derived cell พบว่า BaP ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง CYP2E1 (Liu *et al*., 2017) ความแตกต่างจากผลการทดลองในครั้งนี้อาจสามารถอธิบายได้ด้วยความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของมนุษย์และแฮมสเตอร์ ดังนั้นสารทั้งสามชนิด คือ nicotine, RIF และ BaP จึงมีศักยภาพเป็นตัวเหนี่ยวนำ CYP2E1 ในเซลล์ HepG2 ได้

สำหรับตัวรับ AhR ซึ่งเป็นตัวรับในนิวเคลียสชนิดหนึ่ง และเป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า AhR มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของ CYP1A ในหลายโมเดล (Guigal *et al*., 2001) สาร BaP จัดอยู่ในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดพิษหรือการก่อมะเร็งและเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A โดยผ่าน AhR (Fowles and Dybing, 2003) แต่ในทางตรงกันข้ามการศึกษาครั้งนี้พบว่า BaP สามารถเหนี่ยวนำ CYP1A2 ได้แต่กลับไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ AhR การศึกษาการกระตุ้นของฮอร์โมนไธรอยด์ต่อ CYP1A1 พบว่าเกิดขึ้นผ่านวิถีของ AhR ในเซลล์ตับปฐมภูมิมนุษย์ (human hepatocyte) แต่ไม่พบความเกี่ยวข้องกับ AhR ในเซลล์ HepG2 (Vrzal *et al*., 2017) ดังนั้นจึงสนับสนุนว่ากลไกการควบคุมการแสดงออกของ CYP1A2 ในเซลล์ HepG2 มีกลไก/วิถีการควบคุมอื่นที่นอกเหนือจาก AhR ส่วน nicotine ที่ความเข้มข้นต่ำ (1 μM) สามารถเหนี่ยวนำ CYP1A2 และ AhR ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบความสัมพันธ์หรือการศึกษาระหว่าง nicotine และ AhR จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเชิงลึกถึงผลของ nicotine ต่อกลไกการควบคุม CYP1A ผ่านตัวรับ AhR ต่อไป โดยอาจมีการทำการศึกษาเพื่อยืนยันในเซลล์ตับปฐมภูมิมนุษย์เพิ่มเติม

โดยสรุป nicotine สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้เช่นเดียวกับ BaP อีกทั้ง nicotine ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำ CYP1A2 โดยผ่าน AhR ในขณะที่ nicotine ความเข้มข้นสูงสามารถเหนี่ยวนำ CYP2E1 แต่ความสามารถของ nicotine ในการเหนี่ยวนำ CYP2E1 ด้อยกว่า RIF และ BaP ดังนั้นเซลล์ HepG2 จึงเป็นโมเดลที่มีประโยชน์ในการศึกษาการแสดงออกของ CYP2A โดย nicotine หรือสารพิษอื่นๆ ต่อไปในอนาคต รวมถึงความสำคัญของความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกที่แตกต่างกันด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นสำหรับทุนวิจัย รวมถึงเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัยบางส่วน

References

Bao Z, He XY, Ding X, Prabhu S, Hong JY. Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. Drug Metab Dispos 2005;33:258 LP-261.

Chen Q, Xie HT, Li Y, Wang G, Xu Z, Pu ZC, *et al*. Transcriptional Regulation of CYP3A4/2B6/2C9 Mediated via Nuclear Receptor PXR by Helicid and Its Metabolites. Evid Based Complement Alternat Med 2015;2015:797496. doi:10.1155/2015/797496.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156–9. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2.

Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. Gene 2013;518:335–45. doi:https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106.

Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. Tob Control 2003;12:424 LP-430.

Gonzalez FJ, Coughtrie M, Tukey RH. Drug Metabolism. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, editors. Goodman and Gilman's Pharmacol. Basis Ther. 13e, New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.

Guigal N, Seree E, Nguyen QB, Charvet B, Desobry A, Barra Y. Serum induces a transcriptional activation of CYP1A1 gene in HepG2 independently of the AhR pathway. Life Sci 2001;68:2141–50. doi:https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01022-0.

Heit C, Dong H, Chen Y, Thompson DC, Deitrich RA, Vasiliou VK. The Role of CYP2E1 in Alcohol Metabolism and Sensitivity in the Central Nervous System. In: Dey A, editor. Cytochrome P450 2E1 Its Role Dis. Drug Metab., Dordrecht: Springer Netherlands; 2013, p. 235–47. doi:10.1007/978-94-007-5881-0_8.

Howard LA, Micu AL, Sellers EM, Tyndale RF. Low Doses of Nicotine and Ethanol Induce CYP2E1 and Chlorzoxazone Metabolism in Rat Liver. J Pharmacol Exp Ther 2001;299:542 LP-550.

Hu H, Yu T, Arpiainen S, Lang MA, Hakkola J, Abu-Bakar A. Tumour suppressor protein p53 regulates the stress activated bilirubin oxidase cytochrome P450 2A6. Toxicol Appl Pharmacol 2015;289:30–9. doi:10.1016/j.taap.2015.08.021.

Iba MM, Fung J, Pak YW, Thomas PE, Fisher H, Sekowski A, *et al*. Dose-dependent up-regulation of rat pulmonary, renal, and hepatic cytochrome P-450 (CYP) 1A expression by nicotine feeding. Drug Metab Dispos 1999;27:977 LP-982.

Itoh M, Nakajima M, Higashi E, Yoshida R, Nagata K, Yamazoe Y, *et al*. Induction of Human CYP2A6 Is Mediated by the Pregnane X Receptor with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1α. J Pharmacol Exp Ther 2006;319:693 LP-702.

Koskela S, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Sorri M, Saranen A, *et al*. Expression of CYP2A genes in human liver and extrahepatic tissues. Biochem Pharmacol 1999;57:1407–13. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00015-5.

Liu Y, Hu K, Jia H, Jin G, Glatt H, Jiang H. Potent mutagenicity of some non-planar tri- and tetrachlorinated biphenyls in mammalian cells, human CYP2E1 being a major activating enzyme. Arch Toxicol 2017;91:2663–76. doi:10.1007/s00204-016-1904-7.

Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A Major Role for CYP2A6 in Nicotine C-Oxidation by Human Liver Microsomes. J Pharmacol Exp Ther 1997;282:1608 LP-1614.

Miura M, Ito K, Hayashi M, Nakajima M, Tanaka T, Ogura S. The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome p450-mediated prodrug activation. PLoS One 2015;10:e0131793. doi:10.1371/journal.pone.0131793.

Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. Toxicology 2000;144:139–47. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00200-0.

Price RJ, Renwick AB, Walters DG, Young PJ, Lake BG. Metabolism of nicotine and induction of CYP1A forms in precision-cut rat liver and lung slices. Toxicol Vitr 2004;18:179–85. doi:https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.012.

Ramappa V, Aithal GP. Hepatotoxicity Related to Anti-tuberculosis Drugs: Mechanisms and Management. J Clin Exp Hepatol 2013;3:37–49. doi:https://doi.org/10.1016/j.jceh.2012.12.001.

Rossini A, Simão T de A, Albano RM, Pinto LFR. CYP2A6 polymorphisms and risk for tobacco-related cancers. Pharmacogenomics 2008;9:1737–52. doi:10.2217/14622416.9.11.1737.

Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C⟶A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. Br J Clin Pharmacol 1999;47:445–9. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00898.x.

Shimada T, Kim D, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S, Nagy LD, *et al*. Binding of diverse environmental chemicals with human cytochromes P450 2A13, 2A6, and 1B1 and enzyme inhibition. Chem Res Toxicol 2013;26:517–28. doi:10.1021/tx300492j.

Shimada T, Takenaka S, Kakimoto K, Murayama N, Lim Y-R, Kim D, *et al*. Structure-Function Studies of Naphthalene, Phenanthrene, Biphenyl, and Their Derivatives in Interaction with and Oxidation by Cytochromes P450 2A13 and 2A6. Chem Res Toxicol 2016;29:1029–40. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00083.

Smart J, Daly AK. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. Pharmacogenet Genomics 2000;10.

Stefan W, Augustinus B. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. J Biochem Mol Toxicol 2003;17:207–13. doi:10.1002/jbt.10085.

Vrzal R, Vrzalova A, Grycova A, Dvorak Z. Activated thyroid hormone receptor modulates dioxin-inducible aryl hydrocarbon receptor-mediated CYP1A1 induction in human hepatocytes but not in human hepatocarcinoma HepG2 cells. Toxicol Lett 2017;275:77–82. doi:10.1016/j.toxlet.2017.05.001.

Wang H, Tan W, Hao B, Miao X, Zhou G, He F, *et al*. Substantial Reduction in Risk of Lung Adenocarcinoma Associated with Genetic Polymorphism in CYP2A13, the Most Active Cytochrome P450 for the Metabolic Activation of Tobacco-Specific Carcinogen NNK. Cancer Res 2003;63:8057 LP-8061.

Wei C, Caccavale RJ, Weyand EH, Chen S, Iba MM. Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. Cancer Lett 2002;178:25–36. doi:https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00809-6.

Yue J, Peng R, Chen J, Liu Y, Dong G. Effects of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. Pharmacol Res 2009;59:112–9. doi:https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.10.006.

Zhou S-F, Wang B, Yang L-P, Liu J-P. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. Drug Metab Rev 2010;42:268–354. doi:10.3109/03602530903286476.