

ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของตัวขนส่งยา OATP1B1 เอนไซม์เมแทบอลิซึมยา CYP3A4 และ CYP3A5 และนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ PXR และ AhR ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งรกของมนุษย์

ธรรม สุขสวัสดิ์¹, กนกวรรณ จารุกัจระ², วรรณญา จตุพรประเสริฐ^{3*}

¹ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

² ปร.ด. รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

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

* ติดต่อผู้พิมพ์: วรรณญา จตุพรประเสริฐ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

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

บทคัดย่อ

ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของตัวขนส่งยา OATP1B1 เอนไซม์เมแทบอลิซึมยา CYP3A4 และ CYP3A5 และนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ PXR และ AhR ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งรกของมนุษย์

ธรรม สุขสวัสดิ์¹, กนกวรรณ จารุกัจระ², วรรณญา จตุพรประเสริฐ^{3*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2562; 15(2) : 118-128

รับบทความ : 22 มิถุนายน 2561

แก้ไขบทความ: 13 มกราคม 2562

ตอบรับ: 16 มกราคม 2562

ไรแฟมพิซินยาต้านวัณโรคถูกรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยามาอย่างยาวนาน เนื่องจากไรแฟมพิซินเหนี่ยวนำเอนไซม์เมแทบอลิซึมยาได้หลายชนิด ทั้งนี้ตัวขนส่งยา OATP1B1 เอนไซม์เมแทบอลิซึมยา CYP3A4 และ CYP3A5 และนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ PXR และ AhR มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมยาทางคลินิกโดยเฉพาะในเซลล์ตับ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลของไรแฟมพิซินในรกของมนุษย์ยังมีรายงานน้อย ดังนั้นการศึกษาจึงมุ่งเน้นการศึกษาผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของตัวขนส่งยา OATP1B1 เอนไซม์เมแทบอลิซึมยา CYP3A4 และ CYP3A5 และนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ PXR และ AhR เพื่อเปรียบเทียบผลในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งรกของมนุษย์ วิธีการทดลอง: เซลล์ HepG2 และ BeWo (5×10^5 เซลล์ต่อหลอด) ได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติมด้วย 10% FBS และบ่มร่วมกับสารทดสอบ คือไรแฟมพิซิน (0.5, 5 และ 10 μM) และกลุ่มควบคุมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (0.1% DMSO) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสกัด total RNA จากนั้นทำการตรวจวัดการแสดงออกที่ระดับ mRNA ของ CYP3A4, CYP3A5, OATP1B1, PXR และ AhR ด้วยเทคนิค RT-qPCR ผลการทดลอง: ไรแฟมพิซินสามารถชักนำให้การแสดงออกของ CYP3A4 และ CYP3A5 เพิ่มขึ้น 4-6 เท่า ทั้งในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งรก ในขณะเดียวกันที่ OATP1B1 ถูกชักนำได้ด้วยไรแฟมพิซินได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งในเซลล์มะเร็งตับ (18-23 เท่า) และเซลล์มะเร็งรก (2-4 เท่า) อย่างไรก็ตามไรแฟมพิซินไม่ชักนำการแสดงออกของ PXR ในเซลล์มะเร็งตับ และยังคงการแสดงออกของ PXR ในเซลล์มะเร็งรกอีกด้วย ในทางกลับกันการแสดงออกของ AhR ถูกชักนำอย่างมีนัยสำคัญโดยไรแฟมพิซินในเซลล์มะเร็งตับแต่ไม่ส่งผลเหนี่ยวนำ AhR ในเซลล์มะเร็งรก สรุป: กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไรแฟมพิซินมีความแตกต่างกันระหว่างในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งรก ไรแฟมพิซินชักนำให้ OATP1B1, CYP3A4 และ CYP3A5 ในเซลล์ตับโดยผ่านทาง AhR อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน OATP1B1, CYP3A4 และ CYP3A5 ในเซลล์มะเร็งรกอาจถูกควบคุมโดยนิวเคลียร์รีเซปเตอร์อื่นๆ นอกเหนือจาก PXR และ AhR

คำสำคัญ: ไรแฟมพิซิน, เซลล์มะเร็งตับ, เซลล์มะเร็งรก, ไซโตโครมพี 450, ตัวขนส่งยา, นิวเคลียร์รีเซปเตอร์



Effects of rifampicin on the expressions of drug transporter OATP1B1, drug metabolizing enzymes CYP3A4 and CYP3A5, and nuclear receptors PXR and AhR in human HepG2 and BeWo cells

Thongtham Suksawat¹, Kanokwan Jarukamjorn², 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, Mahasarakham University, Mahasarakham 44000

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

Abstract

Effects of rifampicin on the expressions of drug transporter OATP1B1, drug metabolizing enzymes CYP3A4 and CYP3A5, and nuclear receptors PXR and AhR in human HepG2 and BeWo cells

Thongtham Suksawat¹, Kanokwan Jarukamjorn², Waranya Chatuphonprasert^{3*}

IJPS, 2019; 15(2) : 118-128

Received: 22 June 2018

Revised: 13 January 2019

Accepted: 16 January 2019

Rifampicin, an anti-tuberculosis drug, has been extensively reported for drug interaction due to its ability to induce several metabolizing enzymes. Drug transporter OATP1B1, drug metabolizing enzymes CYP3A4 and CYP3A5, and nuclear receptors PXR and AhR, are involved in metabolism of a clinical drug, especially in hepatocytes. However, the information of rifampicin on those genes in human placenta is still less. This study aimed to investigate the effects of rifampicin on the expressions of OATP1B1, CYP3A4 CYP3A5, PXR and AhR, in hepatocellular carcinoma (HepG2) and choriocarcinoma (BeWo) cells. **Materials and method:** HepG2 and BeWo cells (5×10^5 cells per well) were cultured in DMEM with 10% FBS and incubated with rifampicin at the final concentrations of 0.5, 5 and 10 μM for 24 hours. Total RNAs were extracted and the mRNA expression of each gene was determined by RT-qPCR. **Results:** Rifampicin induced the expression of CYP3A4 and CYP3A5 mRNA in both HepG2 and BeWo cells for 4-6 fold. Likewise, the levels of OATP1B1 mRNA were significantly elevated by rifampicin, compared to control group, in both HepG2 (18-23 fold) and BeWo (2-4 fold). However, rifampicin did not modify the expression of PXR in HepG2 while it extensively suppressed the PXR mRNA in BeWo. On the other hand, the expression of AhR was significantly induced by rifampicin in HepG2 but not in BeWo, only rifampicin at the lowest concentration test (0.5 μM) down-regulated the AhR mRNA expression (p -value < 0.05). **Conclusion:** The regulatory mechanism of rifampicin was different between HepG2 and BeWo cells. Rifampicin up-regulated the expression of OATP1B1, CYP3A4 and CYP3A5 in HepG2 cells, at least in part, via the AhR pathway. However, the expressions of OATP1B1, CYP3A4 and CYP3A5 in BeWo cells might be regulated by other receptors, beside PXR and AhR.

Keywords: rifampicin, hepatocellular carcinoma, choriocarcinoma, cytochrome P450, drug transporter, nuclear receptor

บทนำ

ยาและสารแปลกปลอม (xenobiotics) เมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะแพร่กระจายและถูกเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายใต้สมรรถนะของตัวขนส่งยา (drug transporter) เอนไซม์ในเมแทบอลิซึมยา (drug metabolizing enzyme) และนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ (nuclear receptor) หลังจากยาเข้าสู่ร่างกายและแพร่กระจายแล้ว ยาจะเกิดกระบวนการแพร่ผ่านเซลล์แบบไม่ใช้พลังงาน (passive diffusion) โดยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical) ของยานั้น นอกจากนี้กระบวนการแพร่แบบใช้พลังงาน (active diffusion) ของยาและสารแปลกปลอมหลายชนิดภายในร่างกายนั้นถูกควบคุมโดยตัวขนส่งสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Xu *et al.*, 2005) คือ organic anion transporting polypeptides (OATPs) ซึ่งเป็นตัวนำพาสารเข้าสู่ตับและจัดเป็นตัวขนส่งสารประเภท solute carrier (SLC) transporters ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารและยาผ่านเข้าเซลล์ (Megan *et al.*, 2011) การแสดงออกของ OATPs ถูกควบคุมผ่านยีนใน SLCO/Slco superfamily โดย OATPs ในมนุษย์นั้นจำแนกได้เป็น 6 families และ 11 ไอโซฟอร์ม (isoforms) ตามร้อยละความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนในโครงสร้าง (Hagenbuch and Gui, 2008) OATP1B1 สามารถบ่งบอกการกระจายของยาเข้าสู่ร่างกาย (Yohei *et al.*, 2003) โดยการแสดงออกของ OATPs มีความจำเพาะแตกต่างกันตามอวัยวะ อาทิ OATP1B1 มีความจำเพาะในตับของมนุษย์ (Abe *et al.*, 1999) และ OATP1B1 เป็น isoform ที่มีการแสดงออกในตับของมนุษย์มากกว่า OATPs อื่นๆ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อชั้น basolateral ของเซลล์ตับ (König *et al.*, 2000)

สำหรับเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมยาเกี่ยวข้องกับการแปลงรูปทางชีวภาพเพื่อการกำจัดออกของยาและการขจัดพิษของสารแปลกปลอมจากร่างกาย เอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYPs) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมยาและสารแปลกปลอมในร่างกาย โดย CYPs พบมากในตับ ทางเดินอาหาร ไต และปอด โดยการจำแนก CYPs จะอาศัยร้อยละความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเช่นกัน อาทิ CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 และ CYP7 (Xu *et al.*, 2005) โดย CYP3A4 และ CYP3A5 เป็นไอโซฟอร์มที่มีการแสดงออกมากในตับ ลำไส้ และมดลูก และมีบทบาทสำคัญต่อเมแทบอลิซึมยาและสารแปลกปลอมในตับและลำไส้มนุษย์ (McKinnon *et al.*, 1995)

รก (placenta) เป็นอวัยวะชั่วคราวที่มีหน้าที่แลกเปลี่ยนสารอาหาร แร่ธาตุ ยา สารเคมี รวมทั้งสารพิษต่างๆ จากแม่สู่

ทารกในครรภ์ และรก (Benirschke and Driscoll, 1967) เป็นอีกอวัยวะหนึ่งซึ่งมี metabolizing enzyme หลายชนิดทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยาและสารพิษ เอนไซม์ CYPs สามารถพบได้ในรกตั้งแต่ไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ และไปตลอดจนครบอายุครรภ์ (Hakkola *et al.*, 1998; Unadkat *et al.*, 2004) แต่การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ CYPs ในรกยังมีข้อมูลอยู่น้อยมาก การเข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์ CYPs ในรก จะช่วยให้สามารถศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษ การกำหนดข้อควรระวังของสารพิษ หรือสารก่อมะเร็งต่างๆ ในหญิงตั้งครรภ์ได้ เซลล์บีโว (BeWo cells) เป็นเซลล์จากรกซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้หลายรุ่น รวมทั้งมีส่วนประกอบ การแสดงออกของเอนไซม์ CYPs และตัวขนส่ง (transporter) ต่างๆ ใกล้เคียงกับรก จึงสามารถใช้เซลล์บีโวเป็นโมเดลในการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมและการขนส่งสารต่างๆ ผ่านเข้าออกรกได้ (Poulsen *et al.*, 2009; Unadkat *et al.*, 2004)

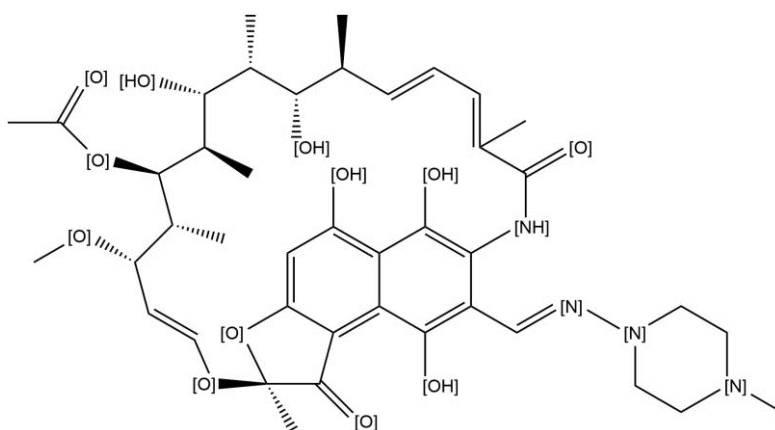
Ligand-regulated transcription factors หรือนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ ประกอบด้วยหลายตำแหน่งที่สำคัญในการเข้าจับของยา เช่น เอสโตรเจนรีเซปเตอร์ (estrogen receptor) กลูโคคอร์ติคอยด์รีเซปเตอร์ (glucocorticoid receptor) และวิตามินดีรีเซปเตอร์ (vitamin D receptor) สำหรับเพรกเนนเอ็กซ์รีเซปเตอร์ (pregnane X receptor, PXR) และแอริลไฮโดรคาร์บอนรีเซปเตอร์ (aryl hydrocarbon receptor, AhR) จัดเป็นนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ที่ควบคุมการเหนี่ยวนำ/ยับยั้งการถอดรหัส/การแปลรหัสของยีนและเป็นปัจจัยบ่งชี้ถึงความไวของนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ต่อสารแปลกปลอมของร่างกาย ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมยาและตัวขนส่งยา โดย AhR มีส่วนช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึม ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP1B1 นอกจากนี้ PXR และ AhR ยังเป็นนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ที่ควบคุมการทำงานของยีนในการเมแทบอลิซึม การขนส่ง การกำจัดออกของยาและสารแปลกปลอม ตลอดจนสเตียรอยด์ (steroids) และกรดน้ำดี (bile acids) ภายในร่างกาย (Ramadoss *et al.*, 2005) สำหรับยีนที่ถูกควบคุมโดย PXR ได้แก่ CYPs และ OATPs ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า PXR มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ OATPs ด้วย (Moore and Kliever, 2000)

ไรแฟมพิซิน (rifampicin, รูปที่ 1) เป็นหนึ่งในสูตรยาหลักในการรักษาวัณโรค (tuberculosis) ผู้ป่วยจำเป็นต้องใช้ยาเป็นระยะเวลานานมากกว่า 3-6 เดือน ซึ่งมีรายงานอันตรกิริยา

ระหว่างยาผ่าน CYPs อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CYP3A และตัวขนส่งยาต่างๆ (Niemi *et al.*, 2003) นอกจากนี้ ไรแฟมพิซินยังเป็นตัวกระตุ้น PXR ที่มีประสิทธิภาพ (Li and Chiang, 2006) อีกทั้งยังถูกระบุเป็นตัวเร่ง OATPs ด้วย (Justenhoven *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง AhR และการยับยั้งการแสดงออกของ CYP3A4 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไรแฟมพิซินในเซลล์ตับ (Rasmussen *et al.*, 2017) ดังนั้นไรแฟมพิซินจึงอาจมีบทบาทต่อการควบคุมยีน OATP1B1, CYP3A4, CYP3A5, PXR และ AhR ใน HepG2 และ BeWo ดังนั้นการศึกษานี้จึงวิเคราะห์ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของ OATP1B1 และ CYPs รวมถึง PXR และ AhR ทั้งในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งรก (BeWo) ของมนุษย์ ซึ่งนับเป็นแบบจำลองของอวัยวะตับและรกตามลำดับเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาผลกระทบต่อยีนดังกล่าวในมนุษย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี - อาหารเลี้ยง HepG2 (HB-8065™, ATCC, USA) และ BeWo 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 ReverTraAce®, reverse transcription buffer, random primer, 10mM dNTP mixture, SYBR Green I และ Taq DNA polymerase เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Toyobo (Osaka, Japan), Invitrogen™ (USA), Cambrex Bio Sci (USA), และ Vivantis (Malaysia) และไพรเมอร์สังเคราะห์โดยบริษัท Bio Basic Inc. (Canada) ดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของไรแฟมพิซิน

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับ qPCR

Genes	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Forward primer (5'→3')	Reward primer (5'→3')
GAPDH	72	61.1	CACCATCTTCCAGGAGCGAG	GACTCCACGACGTACTCAGC
CYP3A4	187	61.1	GCCTGGTGCTCCTCTATCTA	GGCTGTTGACCATCATAAAAG
CYP3A5	245	61.1	CCTGAACCTCTCAGGAGCATTT	AGATCAGAGGGCTGGTGAGTT
OATP1B1	135	60.2	GAGCAACAGTATGGTCAGCCT	GGCAATTCCAACGGTGTTCA
PXR	117	61.1	ATGATCATGTCCGACGAGGC	CCTGATCATCATCCGCTGCT
AhR	112	61.1	CAACAGCAACAGTCCTTGGC	GTTGCTGTGGCTCCACTACT

การเลี้ยงเซลล์ - HepG2 (HB-8065™ ATCC, Manassas, USA) และ BeWo (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Assoc. Prof. Dr. Isabella Ellinger, Medical University of Vienna, Austria) เพาะเลี้ยงด้วย DMEM+10% FBS+PSN ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C ที่ความชื้น 95% ให้มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทั้ง HepG2 และ BeWo (n=5 หลุมต่อกลุ่ม) บ่มด้วย 0.1% DMSO (กลุ่มควบคุม) หรือไรแฟมพิซิน (RIF) ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 10 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดย RIF ละลายใน DMSO ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่เกิน 0.1% (v/v) เพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ของ DMSO

การเตรียม total RNA และ RT-qPCR - Total RNA ถูกสกัดจากเซลล์หลังจากให้สารทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (Chomczynski and Sacchi, 1987) จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นและทดสอบความสมบูรณ์ของ RNA (RNA integrity) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.25% agarose gel electrophoresis) ก่อนเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ ReverTraAce® (Toyobo, Osaka, Japan) ตามวิธีการของบริษัท หลังจากนั้น cDNA จะถูกนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของแต่ละยีนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ (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

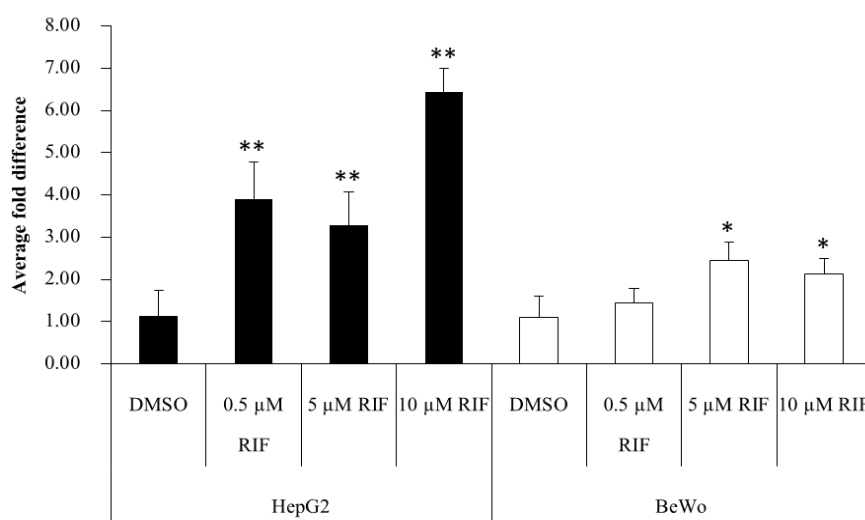
DNA polymerase enzyme (Vivantis) ตามวิธีการของบริษัท ภายใต้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 Touch™, Biorad (USA) ร่วมกับโปรแกรม Bio-Rad-CFX manager version 3.1 จากนั้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายจะถูกนำมาปรับให้เป็นปกติ (normalized) กับยีนอ้างอิง (reference gene) คือ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล - ความแตกต่างทางสถิติทดสอบด้วย comparative mean One-Way ANOVA ร่วมกับ Turkey's statistical post hoc test โดยโปรแกรม SPSS (version 11.0) คำนัยสำคัญทางสถิติแสดงที่ * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกของยีน CYP3A4

การแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ใน HepG2 เพิ่มขึ้น (3-6 เท่า) อย่างมีนัยสำคัญโดยไรแฟมพิซินทุกความเข้มข้น (0.5, 5 และ 10 μM , $p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.1 %DMSO) ดังแสดงในรูปที่ 2 และไรแฟมพิซินที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนใน BeWo พบว่าไรแฟมพิซินที่ความเข้มข้นสูงสองความเข้มข้น (5 และ 10 μM) สามารถเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ได้สูงขึ้น 2-2.5 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2 ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ใน HepG2 และ BeWo

DMSO, 0.1% dimethyl sulfoxide; Rif, rifampicin 0.5 μM , 5 μM , และ 10 μM . * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$ VS DMSO.

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกของยีน CYP3A5

ไรแฟมพิซินที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 10 μM เพิ่มการแสดงออกของ CYP3A5 mRNA ใน HepG2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (4-6 เท่า, $p < 0.05$) ในขณะที่ใน BeWo มีเพียงไรแฟมพิซินที่ความเข้มข้น 10 μM ที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A5 mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญ (2.7 เท่า, $p < 0.05$) (รูปที่ 3)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกของยีน OATP1B1

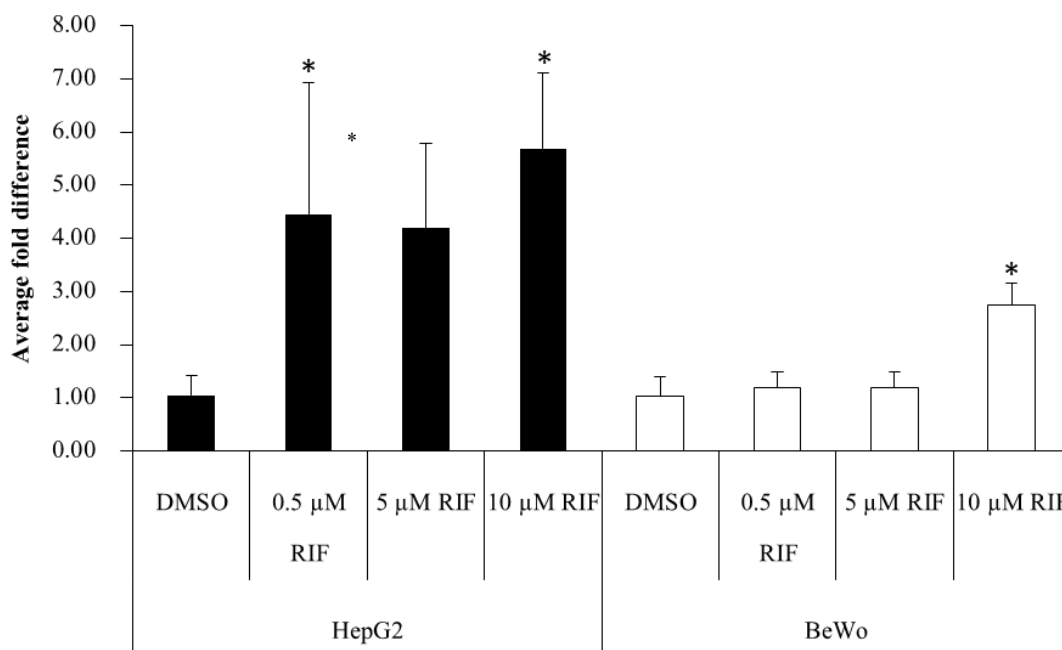
ไรแฟมพิซินความเข้มข้น 5 และ 10 μM สามารถเพิ่มการแสดงออกของ OATP1B1 mRNA ใน HepG2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (18-23 เท่า, $p < 0.001$) (รูปที่ 4) ในทำนองเดียวกันไรแฟมพิซินทั้งสองความเข้มข้นนี้สามารถเพิ่มการแสดงออกของ OATP1B1 mRNA ใน BeWo ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (2-3.7 เท่า, $p < 0.05$ และ $p < 0.001$, ตามลำดับ)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกของยีน PXR

จากรูปที่ 5 แสดงถึงแนวโน้มการแสดงออกของ PXR mRNA ใน HepG2 แต่ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามกลับพบแนวโน้มการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของ PXR mRNA ใน BeWo โดยไรแฟมพิซินความเข้มข้น 5 และ 10 μM ($p < 0.05$ และ $p < 0.001$, ตามลำดับ)

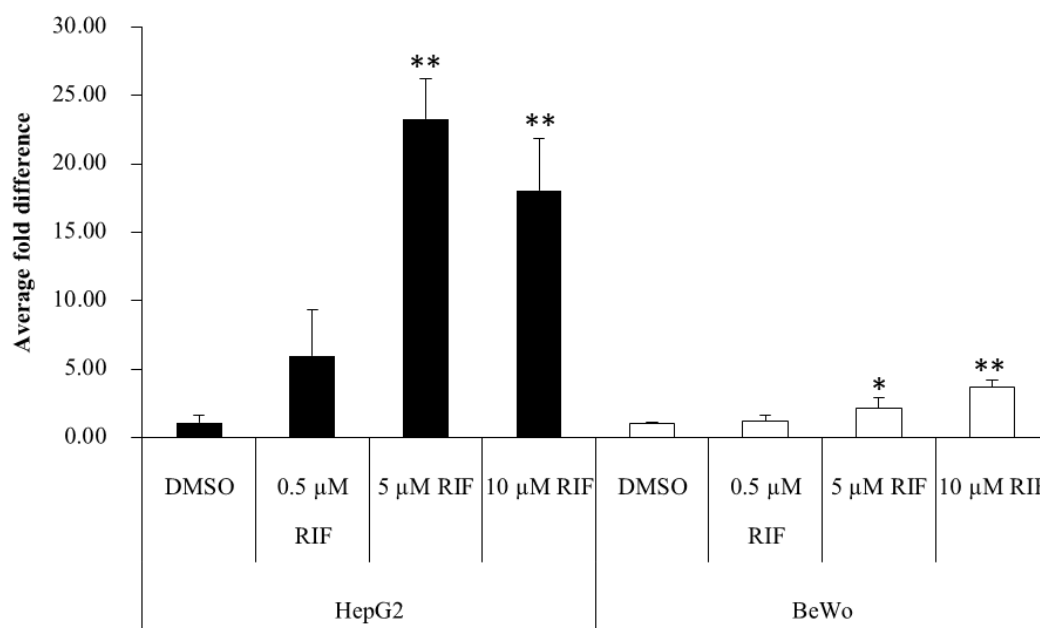
การวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกของยีน AhR

ไรแฟมพิซินความเข้มข้น 0.5 และ 10 μM สามารถเพิ่มการแสดงออกของ AhR mRNA เพิ่มขึ้น 2 เท่าใน HepG2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) (รูปที่ 6) ในทางตรงกันข้ามไรแฟมพิซินที่ความเข้มข้น 0.5 μM เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ AhR mRNA ใน BeWo



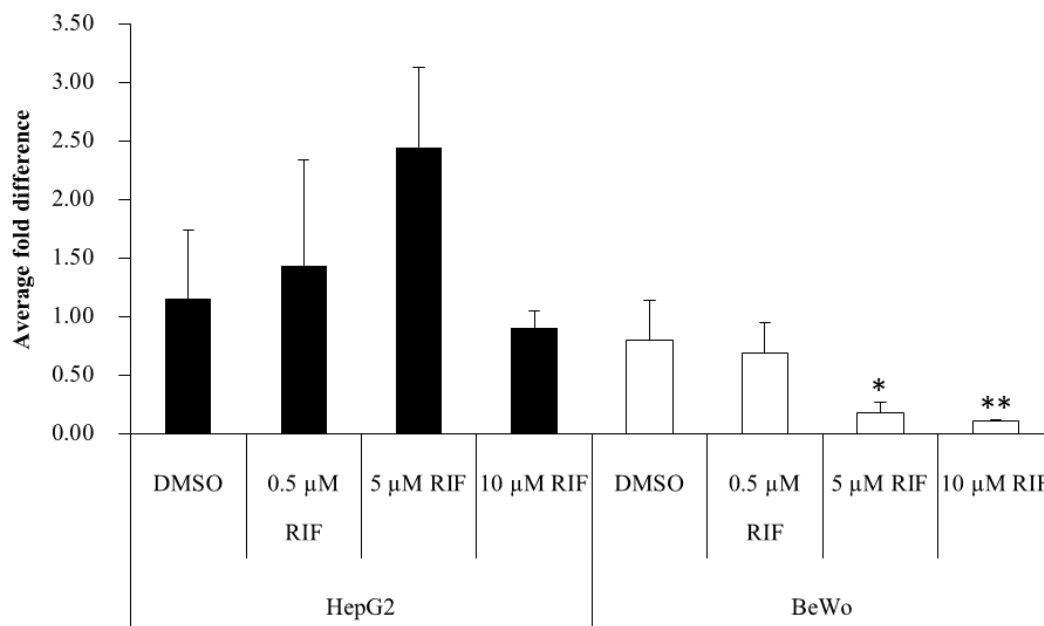
รูปที่ 3 ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของ CYP3A5 mRNA ใน HepG2 และ BeWo

DMSO, 0.1% dimethyl sulfoxide; Rif, rifampicin 0.5 μM , 5 μM , และ 10 μM . * $p < 0.05$ VS DMSO.



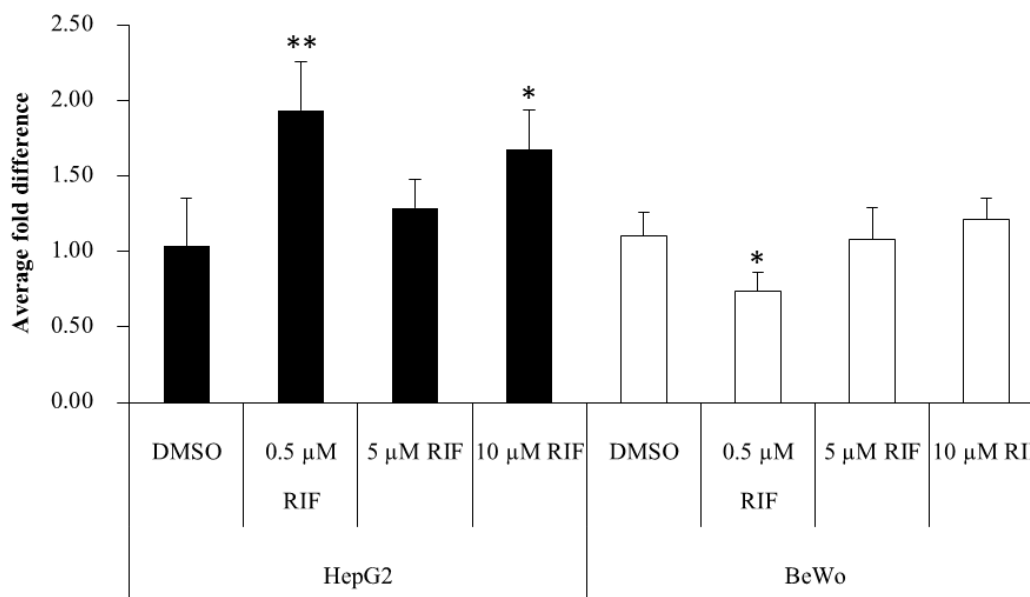
รูปที่ 4 ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของ OATP1B1 mRNA ใน HepG2 และ BeWo

DMSO, 0.1% dimethyl sulfoxide; Rif, rifampicin 0.5 μM, 5 μM, และ 10 μM. * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$ VS DMSO.



รูปที่ 5 ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของ PXR mRNA ใน HepG2 และ BeWo

DMSO, 0.1% dimethyl sulfoxide; Rif, rifampicin 0.5 μM, 5 μM, และ 10 μM. * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$ VS DMSO.



รูปที่ 6 ผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของ AhR mRNA ใน HepG2 และ BeWo

DMSO, 0.1% dimethyl sulfoxide; Rif, rifampicin 0.5 μM, 5 μM, และ 10 μM. * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$ VS DMSO.

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ไรแฟมพิซินเป็นสารที่นิยมใช้เป็นต้นแบบตัวเหนี่ยวนำ (typical inducer) การแสดงออกของ CYPs และตัวขนส่งยาโดยการกระตุ้นวิถีของ PXR (Lehmann *et al.*, 1998; Lutz *et al.*, 2018; Tirona *et al.*, 2003) แต่กลับพบว่ารายงานการศึกษาผลของไรแฟมพิซินต่อนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ต่างๆ นั้นยังน้อยและค่อนข้างจำกัดโดยเฉพาะในกรหรือเซลล์จากรก

กระบวนการถอดรหัสของยีน CYP3A4 ถูกควบคุมโดยสารแปลกปลอมและยาหลายชนิด อาทิ ไรแฟมพิซินและฟิโนบาร์บิทัลเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 ในตับและลำไส้ ซึ่งนำไปสู่การเมแทบอลิซึมยาผ่านวิถีของ CYP3A4 เพิ่มขึ้น (Pichard-Garcia *et al.*, 2000) โดยกลไกการเหนี่ยวนำ CYP3A4 ถูกอธิบายไว้ในหลายการศึกษาของ Blumberg และคณะว่า นิวเคลียร์รีเซปเตอร์กำพร้า (orphan nuclear receptor) และ PXR ทำปฏิกิริยาต่อ ER-6 เอลิเมนต์ (prPXRE, bases -172 ถึง -149) ในส่วนพรอกซิมอลโปรโมเตอร์ของยีน CYP3A4 โดยมียาหลายชนิด เช่น สเตียรอยด์ และไรแฟมพิซิน เป็นตัวเหนี่ยวนำการแสดงออกของ PXR ได้ (Bertilsson *et al.*, 1998; Blumberg *et al.*, 1998; Blumberg and Evans, 1998; Lutz *et al.*, 2018) การแสดงออกของ CYP3A4 ที่สูงขึ้นด้วยการเหนี่ยวนำของยา เช่น โคลไตรมาโซล ฟิโนบาร์บิทัล และ

ไรแฟมพิซิน ถูกค้นพบและรายงานว่าเกิดขึ้นโดยผ่านวิถีการควบคุมของ PXR (Luo *et al.*, 2002) ซึ่งวิถีการควบคุมการแสดงออกของ CYP3A4 โดย PXR ในมนุษย์นั้นเกิดขึ้นโดยผ่านการจับเป็นเฮเทอโรไดเมอร์ระหว่างคอมเพลกซ์ของลิแกนด์ (ยา) และ PXR ร่วมกับเรตินอยด์เอ็กซ์รีเซปเตอร์ (retinoid X receptor) บนส่วนรับการตอบสนองของ PXR (PXR response elements) ของยีน CYP3A4 แล้วส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการถอดรหัสของยีน CYP3A4 ที่เพิ่มสูงขึ้น (Wang and LeCluyse, 2003) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังไม่พบกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 โดยไรแฟมพิซินที่เกี่ยวข้องกับ PXR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน HepG2 และในกรณีของ BeWo นั้น การแสดงออกของ PXR กลับลดลง ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงอาจนำไปสู่การศึกษาผลของไรแฟมพิซินในเชิงลึกต่อไป โดยเพิ่มปัจจัยการทดสอบ อาทิ ระยะเวลาในการบ่มเซลล์กับสารทดสอบ และระยะการเจริญของเซลล์

CYP3A5 มีการแสดงออกมากที่สุดในตับและลำไส้เล็ก รายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า CYP3A5 ในเซลล์ตับถูกเหนี่ยวนำได้โดยไรแฟมพิซินและฟิโนบาร์บิทัล ในขณะที่กลไกที่อธิบายวิถีการเหนี่ยวนำ CYP3A5 นั้นยังมีความขัดแย้ง (Rae

et al., 2001) การศึกษาของ Burk และคณะ รายงานว่าไรแฟมพิซินเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A5 ในเซลล์ตับให้สูงขึ้น โดยการกระตุ้นระดับ CYP3A5 mRNA ร่วมกับ PXR ซึ่งกลไกการเหนี่ยวนำ CYP3A5 มีความเกี่ยวข้องกับ PXR ผ่านการเข้าจับที่ตำแหน่ง -688 ถึง +49 บนโปรโมเตอร์ของยีน CYP3A5 โดยที่การกระตุ้นดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับโมทีฟ (motif) ของ ER6 ด้วย (Burk *et al.*, 2004) การศึกษาก่อนหน้าในเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ LS180 พบว่าไรแฟมพิซินสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A mRNA ได้ในรูปแบบที่ขึ้นกับความเข้มข้น (2-10 μM) ส่วนการศึกษาในตับหนูไม่ชักพบว่าผลของไรแฟมพิซินต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A โปรตีนไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของไรแฟมพิซินที่ได้รับ หนูไม่ชักที่ได้รับไรแฟมพิซินขนาดต่ำมีการแสดงออกของ CYP3A โปรตีนสูงกว่าหนูไม่ชักที่ได้รับไรแฟมพิซินในขนาดสูง เนื่องจากการแสดงออกของ CYP3A อาจมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น เช่น ตัวขนส่งยา P-glycoprotein (Schuetz *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า PXR มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นของ CYP3A5 โดยการชักนำด้วยลิแกนด์ PXR ของไรแฟมพิซินทำให้ส่วนโปรโมเตอร์ของ CYP3A5 ถูกชักนำให้มีการแสดงออกที่เพิ่มเป็นสองเท่า (Lehmann *et al.*, 1998) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไรแฟมพิซินสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A5 mRNA ทั้งใน HepG2 และ BeWo อย่างไรก็ตามไรแฟมพิซินไม่สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ PXR ใน HepG2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งไรแฟมพิซินยังสามารถยับยั้ง PXR mRNA ใน BeWo ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าการแสดงออกของ AhR mRNA ใน HepG2 ที่ถูกชักนำโดยไรแฟมพิซินอาจบ่งชี้ถึงบทบาทของ AhR ในวิถีการควบคุมการแสดงออกของยีน CYP3A4 และ CYP3A5 ใน HepG2

OATP1B1 เป็นตัวขนส่งยาที่พบมากในตับมีบทบาทในการนำสารภายในร่างกายและยาต่างๆ เข้าสู่เซลล์ตับ โดยทั่วไป OATP1B1 มีผลกระทบต่อการกระจายของยาในร่างกายมนุษย์ แต่กลไกการควบคุมการถอดรหัสของยีน OATP1B1 ยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้ OATP1B1 ยังเป็นตัวกลางในการขนส่งยาหลายชนิดรวมทั้งยาที่สามารถกระตุ้น PXR ได้ เช่น ไรแฟมพิซินและเดกซาเมทาโซน ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน OATP1B1 ให้เพิ่มขึ้นสองเท่าในเซลล์ตับแซ่แข็ง (Albrecht *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2013) เนื่องจากไรแฟมพิซินเป็นซับสเตรต (substrate) ของ OATP1B1 จึงมีรายงานว่า

ไรแฟมพิซินสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน OATP1B1 ได้ (Smythe *et al.*, 2012) และการศึกษาที่ผ่านมาพบวาระหว่างนิวเคลียร์รีเซปเตอร์หลายชนิด OATP1B1 จะถูกควบคุมผ่านตัวรับลิแกนด์ของฟาร์นีซอยด์เอ็กซ์เรเซปเตอร์ (farnesoid X receptor) และลิเวอร์เอ็กซ์เรเซปเตอร์แอลฟา (liver X receptor- α) เป็นหลัก (Meyer zu Schwabedissen *et al.*, 2010) และจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า OATP1B1 เป็นปัจจัยสำคัญต่อการกระตุ้นเร่ง PXR โดยไรแฟมพิซินด้วย (Tirona *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้ไรแฟมพิซินไม่แสดงผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของ PXR ใน HepG2 อย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการควบคุมการแสดงออกของ OATP1B1 ใน HepG2 และ BeWo มีวิถีการควบคุมผ่านนิวเคลียร์รีเซปเตอร์ หรือมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง หรือกลไกอื่น ส่วนผลของไรแฟมพิซินต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ไม่เป็นไปตามความเข้มข้น อาจเกิดจากความแปรปรวนของเซลล์ที่ทำการศึกษา ความแปรปรวนระหว่างการเก็บตัวอย่าง RNA และการแสดงออกของบางยีนอาจขึ้นกับบางความเข้มข้น อีกทั้งความแตกต่างของ HepG2 และ BeWo อาจมีบางปัจจัยที่แตกต่างกันจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันหรือศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าไรแฟมพิซินเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4, CYP3A5 และ OATP1B1 mRNA ทั้งใน HepG2 และ BeWo และไรแฟมพิซินเพิ่มการแสดงออกของ AhR ใน HepG2 ในทางตรงกันข้ามไรแฟมพิซิน กลับส่งผลลดการแสดงออกของ PXR และ AhR ใน BeWo ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าวิถีการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ใน HepG2 และ BeWo มีความแตกต่างกัน และเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและการขนส่งยาในโมเดลรกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นสำหรับทุนวิจัย รวมถึงเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัยบางส่วน



References

- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, *et al.* Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 1999;274:17159–63.
- Albrecht C, Soumian S, Tetlow N, Patel P, Sullivan MHF, Lakasing L, *et al.* Placental ABCA1 expression is reduced in primary antiphospholipid syndrome compared to pre-eclampsia and controls. *Placenta* 2007;28:701–8.
- Benirschke K, Driscoll SG. The Pathology of the Human Placenta BT- Placenta. In: Strauss F, Benirschke K, Driscoll SG, editors., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1967, p. 97–571.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Åsman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, *et al.* Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A4 induction. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:12208–13.
- Blumberg B, Evans RM. Orphan nuclear receptors-new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 1998;12:3149–55.
- Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H, Bolado J, van Meter CM, Ong ES, *et al.* SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor. *Genes Dev* 1998;12:3195–205.
- Burk O, Koch I, Raucy J, Hustert E, Eichelbaum M, Brockmöller J, *et al.* The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic sensors pregnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR). *J Biol Chem* 2004;279:38379–85.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 2008;38:778–801.
- Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1998;28:35–72.
- Justenhoven C, Schaeffeler E, Winter S, Baisch C, Hamann U, Harth V, *et al.* Polymorphisms of the nuclear receptor pregnane X receptor and organic anion transporter polypeptides 1A2, 1B1, 1B3, and 2B1 are not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:563–9.
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 2000;275:23161–8.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 1998;102:1016–23.
- Li T, Chiang JYL. Rifampicin induction of cyp3a4 requires pregnane x receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4 α and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metab Dispos* 2006;34:756–64.
- Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, *et al.* CYP3A4 Induction by drugs: Correlation between a Pregnane X Receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2002;30:795–804.
- Lutz JD, Kirby BJ, Wang L, Song Q, Ling J, Massetto B, *et al.* Cytochrome P450 3A induction predicts p-glycoprotein induction; part 1: establishing induction relationships using ascending dose rifampin. *Clin Pharmacol Ther* 2018. doi:10.1002/cpt.1073.



- McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM, Roberts-Thomson SJ, Gonzalez FJ, McManus ME. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut* 1995;36:259-67.
- Megan R, Amanda O, Bruno H. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 2011;165:1260–87.
- Meyer zu Schwabedissen HE, Kerstin B, Amarjit C, K. KH, G. SE, B. KR. Liver X receptor α and farnesoid X receptor are major transcriptional regulators of OATP1B1. *Hepatology* 2010;52:1797–807.
- Moore JT, Klierer SA. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology* 2000;153:1–10.
- Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:819–50.
- Pichard-Garcia L, Hyland R, Baulieu J, Fabre JM, Milton A, Maurel P. Human hepatocytes in primary culture predict lack of cytochrome P-450 3A4 induction by eletriptan in vivo. *Drug Metab Dispos* 2000;28:51-7.
- Poulsen MS, Rytting E, Mose T, Knudsen LE. Modeling placental transport: correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicol Vitro* 2009;23:1380–6.
- Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA. Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:849-57.
- Ramados P, Marcus C, Perdew GH. Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1:9–21.
- Rasmussen MK, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S. Activation of the aryl hydrocarbon receptor decreases rifampicin-induced CYP3A4 expression in primary human hepatocytes and HepaRG. *Toxicol Lett* 2017;277:1–8.
- Schuetz EG, Schinkel AH, Relling M V, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:4001-5.
- Smythe W, Khandelwal A, Merle C, Rustumjee R, Gninafon M, Bocar Lo M, *et al.* A Semimechanistic pharmacokinetic-enzyme turnover model for rifampin autoinduction in adult tuberculosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2091–8.
- Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:223-8.
- Unadkat JD, Dahlin A, Vijay S. Placental Drug Transporters. *Curr Drug Metab* 2004;5:125–31.
- Wang H, LeCluyse EL. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:1331–57.
- Williamson B, Soars AC, Owen A, White P, Riley RJ, Soars MG. Dissecting the relative contribution of OATP1B1-mediated uptake of xenobiotics into human hepatocytes using siRNA. *Xenobiotica* 2013;43:920–31.
- Xu C, Li CYT, Kong ANT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005;28:249.
- Yohei N, Ichiro I, Hiroshi S, Miyuki K, Kiyoshi K, Takeshi H, *et al.* Polymorphisms of OATP $\square$ C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:554–65.
- Zhao L, Bin S, He HL, Yang JM, Pu YC, Gao CH, *et al.* Sodium butyrate increases P-gp expression in lung cancer by upregulation of STAT3 and mRNA stabilization of ABCB1. *Anticancer Drugs* 2018;29:227-33.