ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Arylamine *N*-acetyltransferase 1 จากเซลล์ท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง

Factors Affecting the Activity of Arylamine *N*-Acetyltransferase from Biliary Epithelial Cell Lines

เบญจพร บุราณรัตน์ (Benjaporn Buranrat)[1]
เอื้อมเดือน ประวาฬ (Auemduan Prawan)[2]
วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ (Veerapol Kukongviriyapan)[3]*

บทคัดย่อ

เอนไซม์ arylamine *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) เป็นเอนไซม์ในระยะที่ 2 ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมีและสารพิษ โดยเฉพาะสารก่อมะเร็งกลุ่ม aromatic และ heterocyclic amines ที่พบในอาหาร การศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของ *NAT1* กับมะเร็งหลายชนิด นอกจากนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างการอักเสบที่ทางเดินท่อน้ำดีกับกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาครั้งนี้จึงทำการประเมินผลของการอักเสบต่อการทำงานของ NAT1 โดยใช้ pro-inflammatory cytokine (interferon-γ, interleukin-1β และ tumor necrotic factor-α) ผลการศึกษาพบว่าของเอนไซม์ NAT1 จากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงชนิด 4 ชนิด ที่นำมาศึกษามีคุณสมบัติทางจลนศาสตร์คล้ายคลึงกันคือค่า Km มีใกล้เคียงกัน แม้ว่าKMBC มีค่า V_{max} สูงสุด รองลงมาคือ KKU-M214, KKU-100 และ KKU-OCA17 ตามลำดับ ผลของ pro-inflammatory cytokine ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการสร้าง nitric oxide ตรวจพบใน culture media มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง KKU-100 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภาวะอักเสบก่อขึ้นกับเซลล์ทำให้การทำงานของการเอนไซม์ NAT1 ลดลง โดยอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและการสร้าง nitric oxide

Abstract

Arylamine *N*-acetyltransferase1 is a phase 2 drug metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs, foreign and toxic chemicals, especially carcinogenic compounds of aromatic and heterocyclic amines found in food. Previous reports revealed an association between the polymorphism of the *NAT1* gene and cancer risk. In addition, there is also an established association between inflammation of the biliary duct and cholangiocarcinogenesis. Our study aimed to determine the effect of inflammation on the activity of NAT1

[1]*นักศึกษาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*อาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**corresponding author, e-mail: veerapol@kku.ac.th*

using the pro-inflammatory cytokines (interferon-γ, interleukin-1β and tumor necrotic factor-α). Results show that NAT1 enzymes from the 4 biliary epithelial cell lines exhibit the same kinetics properties, i.e. similar Km value, whereas, V_{max} is the highest for enzyme from KMBC and lower in the following order, KKU-M214, KKU-100 and KKU-OCA17. Treatment with pro-inflammatory cytokine combination to cell cultures for 48 hr resulted in decrease of NAT1 activity in comparison with control cells, ($p<0.05$). Moreover, the treatment cells were found to release nitric oxide into the culture media. It was concluded that inflammation elicited on biliary cells results in suppression of NAT1 activity and may be related to oxidative stress and nitric oxide formation.

คำสำคัญ: เอริลามีน เอน-อะเซททิลทรานสเฟอร์เรส ไซโตไคน์ก่ออักเสบ ไนตริกออกไซด์

Keywords: Arylamine *N*-acetyltransferase 1 (NAT1), proinflammatory cytokines, nitric oxide (NO)

บทนำ

เอนไซม์ arylamine *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) เป็นเอนไซม์เปลี่ยนแปลงยาระยะที่ 2 โดยทำปฏิกิริยา *N*-acetylation ต่อสารเคมี และยา สารเคมีที่ถูกเปลี่ยนแปลงมีรวมทั้งสารก่อมะเร็งโดยเฉพาะสารกลุ่ม aromatic และ heterocyclic amines ที่เกิดจากการสลายของกรดอะมิโน ได้จากปรุงอาหารด้วยความร้อนสูง (food pyrolysates) (Hein, 2002) การเปลี่ยนแปลงอาจทำให้สารเหล่านี้หมดฤทธิ์และสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ง่าย แต่ในทางตรงข้าม NAT1 สามารถเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งให้มีฤทธิ์ก่อมะเร็งแรงขึ้น (Badawi et al., 1995) ในกรณีหลังนี้มักเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา *O*-acetylation ของสาร heterocyclic amine (Hein, 2002) ดังนั้นจึงถือได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ NAT1 เป็นกลไกในการป้องกันร่างกายอย่างหนึ่ง จีน *NAT1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรมที่เอนไซม์ทำงานได้เร็ว ปานกลาง และช้า หรือ rapid, intermediate และ slow acetylation (Weber and Hein, 1985) ทำให้มีรายงานถึงความสัมพันธ์ของพันธุกรรมของ *NAT1* กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Bell et al., 1995; Hein, 2002; Kadlubar and Badawi, 1995) ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน *NAT1* แบบ slow acetylator จะมีความเสี่ยงต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสูงขึ้น นอกจากนี้ *NAT1* ยังเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันมะเร็งได้ โดยการศึกษาพบว่ามะเร็งเต้านมจะมีการขาดหายไปของจีน *NAT* ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 (Matas et al., 1997) การศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของ *NAT1* และ *NAT2* (Prawan et al., 2005) อย่างไรก็ตามนอกจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการทำงานของ NAT1 แล้วปัจจัยสิ่งแวดล้อมอาจมีผลต่อการทำงานของ NAT1 ด้วย ได้แก่ สาร oxidants เช่น hydrogen peroxide และ *S*-nitrosothiols จะสามารถยับยั้งการทำงานของ recombinant NAT1 (Atmane et al., 2003; Dairou et al., 2004) หรือการให้ peroxynitrite หรือ photooxidative stress จากรังสี UVB ต่อเซลล์จะสามารถลดการทำงานของ NAT1 ได้ (Dairou et al., 2003; Dairou et al., 2005) สารออกซิแดนซ์ในร่างกายอาจเกิดขึ้นในสภาวะเซลล์บาดเจ็บ เช่น การอักเสบ ดังนั้นภาวะอักเสบที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (Pinlaor et al., 2004) จึงอาจมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NAT1

การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของภาวะอักเสบต่อการทำงานของเอนไซม์ NAT1 โดยทำการศึกษาผลดังกล่าวต่อการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีความแตกต่างกันในแง่พยาธิวิทยา และยังทำการศึกษากลไกของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ว่ามีความสัมพันธ์กับ nitric oxide ที่สร้างขึ้นในภาวะอักเสบหรือไม่

วัสดุและการดำเนินการวิจัย

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีประกอบด้วย KKU-100, KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC ซึ่ง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มาจากเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ (Sripa et al., 2005) เซลล์ทำการเพาะเลี้ยงใน Ham's F12 medium เพิ่มด้วย Fetal bovine serum 10%, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin, 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin และ 10 มิลลิโมลาร์ HEPES โดยเลี้ยงในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ความชื้น 100% ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ในอากาศ เซลล์เพาะเลี้ยงจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงและทำการ trypsinize แยกเซลล์เพาะเลี้ยงใหม่ทุก 3-4 วัน

การอักเสบทำโดยการเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิดด้วย Proinflammatory cytokine combination ประกอบด้วย interleukin 1β (IL-1β) 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, interferone γ (IFN-γ)400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ tumor necrotic factor α (TNF-α) 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ NAT1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6-well plate และทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ หลังจากนั้นทำการแยกเอาส่วนของโปรตีนจากไซโตพลาสซึม โดยทำการแตกเซลล์ด้วย cell lysis buffer เป็นเวลาประมาณ 15 นาทีและทำการ vortex เพื่อช่วยให้เซลล์ แตกดียิ่งขึ้น และนำเซลล์ไปปั่นที่ 10,000 g 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำโปรตีนจากไซโตพลาสซึม ที่แยกได้ไปทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองและวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ NAT1 โดยวิเคราะห์ปริมาณเมแทโบไลท์ จากปฏิกิริยา acetylation โดยวิธีที่ได้อธิบายไว้แล้ว (Kukongviriyapan et al., 2006) ใช้ p-amino benzoic acid (PABA) เป็นซับสเตรท และมี acetyl CoA เป็นตัวช่วยซับสเตรทและมี acetyl CoA regenerating system เป็นส่วนผสม ทำปฏิกิริยา acetylation ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 15% perchloric acid จึงนำไปปั่นแยกที่ 12,000 rpm 4 องศา เซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำ supernatant ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ N-acetyl-p-aminbenzoic acid ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography ใช้เครื่องตรวจ fluorescent detector ที่ความยาวคลื่น excitation 270 นาโนเมตร และ emission ที่ 340 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณ เมแทโบไลท์ของ Nitric oxide (NO^-_2)

การวิเคราะห์ปริมาณ NO^-_2 ซึ่งเป็นเมแทโบไลท์ของ nitric oxide ใช้เป็นตัวแทนของ nitric oxide ที่เซลล์ท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงสร้างและปลดปล่อยออกมาใน culture media ในสภาวะที่มีการก่อให้เกิดการอักเสบขึ้น โดยนำตัวอย่าง culture medium ทำปฏิกิริยากับ Griess reagent (Granger, 1991) ได้ azo compound วัดอัตราการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดนำเสนอเป็นค่า mean + S.E. และทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Student t-test ความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้กำหนดค่า $p<0.05$

ผลการทดลอง

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 4 ชนิด

การศึกษาขั้นแรกทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ NAT1 จากเซลล์ทั้ง 4 ชนิดว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองจากเซลล์ทั้ง 4 มีคุณสมบัติเหมือนกันหรือไม่ รูปที่ 1 แสดง kinetics ของเอนไซม์ NAT1 จากเซลล์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์ จะได้ค่า kinetics constant แสดงใน ตารางที่ 1 ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสี่ชนิดได้แก่ KKU-100, KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC cells โดยจากผลการทดลองพบว่าค่า Michaelis-Menten constant (Km) มีค่า Km ที่ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าเอนไซม์ NAT1 จากเซลล์ทั้ง 4 ชนิดเป็นเอนไซม์ NAT1 ที่มีคุณสมบัติชนิดเดียวกัน ในขณะที่ค่าความเร็วสูงสุดของการทำปฏิกิริยา (V_{max}) พบว่าเซลล์ KMBC มีค่า V_{max} สูงที่สุด รองลงมาคือ KKU-M214 ส่วนเซลล์ KKU-100 และ KKU-OCA17 มีค่า V_{max} ที่ใกล้เคียงกัน

แสดงผลของ pro-inflammatory cytokine combinations ต่อการทำงานของเอนไซม์ NAT1

ผลของ pro-inflammatory cytokines combination ที่ให้กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนาน 48 ชั่วโมง เพื่อดูผลต่อการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2 ผลการศึกษาพบว่า pro-inflammatory cytokine combinations จะทำให้ลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา acetylation ของเอนไซม์ NAT1 รูปที่ 2 โดยเซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีอัตราการทำงานที่ลดลงไม่แตกต่างกัน จึงนับเป็นรายงานแรกที่แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างภาวะอักเสบ

ผลของ proimflammatory cytokine combinations ต่อการสร้าง reactive nitrogen species

ผลของ pro-inflammatory cytokine combinations ต่อการสร้าง nitric oxide (NO) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิดดังแสดงในรูปที่ 3 ผลการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิดตอบสนองต่อภาวะอักเสบที่ชักนำนาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีการสร้าง NO เพิ่มมากขึ้น ซึ่งนับเป็นรายงานแรกที่แสดงการ NO ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งกำเนิดที่ intrahepatic bile duct โดยเซลล์ KKU-100 สามารถสร้าง NO ได้สูงสุด คือ มีการเพิ่มขึ้นของระดับ NO ใน culture media เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย pro-inflammatory cytokines combination และเซลล์ที่สร้าง NO รองมา คือ KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาถึงผลของภาวะอักเสบที่เกิดขึ้นโดยการชักนำด้วย proinflammatory cytokine ซึ่งประกอบด้วย interferon-γ, interleukin-1β และ tumor necrotic factor-α ต่อการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 4 ชนิด พบว่า เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสามารถตอบสนองต่อการอักเสบโดยลดการทำงานของเอนไซม์ NAT1 เนื่องจากการชักนำให้เกิดอักเสบนั้นจะก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Hussain et al., 2003; Ohshima et al., 2003) มีการสร้างสาร oxidants ขึ้นและนำไปสู่การลดการแสดงออกหรือลดการทำงานของเอนไซม์ NAT1 การศึกษานี้สอดคล้องการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสาร oxidant H_2O_2, peroxynitrite และ NO สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในหลอดทดลองที่ใช้ recombinant enzyme (Atmane et al., 2003; Dairou et al., 2003; Dairou et al., 2004) การทดลองของเราได้แสดงให้เห็นว่าภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์สามารถลดการทำงานของ NAT1 ในเซลล์ได้ โดยการศึกษาที่ผ่านมาของ Jaiswal (Jaiswal et al., 2000) พบว่ามะเร็ง

ท่อน้ำดีชนิด KMBC ที่เป็น extrahepatic bile ducts สามารถเพิ่มการสร้าง NO ได้ จากการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นเพิ่มเติมว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด intrahepatic bile ducts ก็สามารถเพิ่มการสร้าง NO ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้เซลล์ในกลุ่ม intrahepatic bile ducts อาจถูกชักนำให้มีภาวะเครียดออกซิเดชันได้มากกว่า extrahepatic bile ducts จากการที่ KKU-100 มีการสร้าง NO มากกว่า KMBC การศึกษานี้มีความหมายว่าความสามารถในการป้องกันตัวเองของเซลล์ลดลงในสภาวะที่มีการอักเสบและการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงยา NAT1 ทำให้ความสามารถในการกำจัดสารพิษอันตรายลดลง แต่จากการศึกษานี้พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการสร้าง NO ที่ไม่เท่ากันโดย KKU-100 มีการสร้างปริมาณ NO ที่สูงที่สุด แต่ก็ไม่พบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างปริมาณ NO ที่สร้างเพิ่มขึ้นกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NAT1 แสดงว่านอกจาก NO ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ NAT1 แล้วอาจจะมีปัจจัยอื่นที่มาเกี่ยวข้องกับการลดลงของ NAT1 ในภาวะที่มีการอักเสบเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม NO อาจจะเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ NAT1 เนื่องจากเซลล์ท่อน้ำดีปรกติจะไม่มีการแสดงออกของ iNOS (Jaiswal et al., 2000) นอกจากนี้ภาวะอักเสบมีผลต่อการแสดงออกของจีน NAT1 โดยตรงหรือไม่นั้นยังไม่สามารถให้คำตอบได้ในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากภาวะอักเสบสามารถลดหรือเพิ่มการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าภาวะอักเสบที่เกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อบุมะเร็งท่อน้ำดีสามารถชักนำให้เกิดการปลดปล่อยสารอนุมูลอิสระ (NO) และก่อให้เกิดภาวะเครียด (nitrosative stress) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ซึ่งอาจมีผลในการลดลงของความสามารถในการป้องกันตนเองจากการบาดเจ็บด้วยสารเคมีและอนุมูลอิสระต่าง ๆ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการศึกษาวิจัยได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น นางสาวเบญจพร บุราณรัตน์ นักศึกษาปริญญาเอกได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 4 ชนิดได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

Atmane, N., Dairou, J., Paul, A., Dupret, J.M. and Rodrigues-Lima, F. 2003. Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). Reversible inactivation by hydrogen peroxide. **J Biol Chem** 278(37): 35086-92.

Badawi, A.F., Hirvonen, A., Bell, D.A., Lang, N.P. and Kadlubar, F.F. 1995. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. **Cancer Res** 55(22): 5230-7.

Bell, D.A., Badawi, A.F., Lang, N.P., Ilett, K.F., Kadlubar, F.F. and Hirvonen, A. 1995. Polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) polyadenylation signal: association of NAT1*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue. **Cancer Res** 55(22): 5226-9.

Dairou, J., Atmane, N., Dupret, J.M. and Rodrigues-Lima, F. 2003. Reversible inhibition of the human xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 by S-nitrosothiols. **Biochem Biophys Res Commun** 307(4): 1059-65.

Dairou, J., Atmane, N., Rodrigues-Lima, F. and Dupret, J.M. 2004. Peroxynitrite irreversibly inactivates the human xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) in human breast cancer cells: a cellular and mechanistic study. **J Biol Chem** 279(9): 7708-14.

Dairou, J., Malecaze, F., Dupret, J.M. and Rodrigues-Lima, F. 2005. The xenobiotic-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases in human lens epithelial cells: inactivation by cellular oxidants and UVB-induced oxidative stress. **Mol Pharmacol** 67(4): 1299-306.

Granger, D.L. 1991. Macrophage production of nitrogen oxides in host defence against microorganisms. **Res Immunol** 142(7): 570-2; discussion 599-600.

Hein, D.W. 2002 Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. **Mutat Res** 506-507: 65-77.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J. and Harris, C.C. 2003. Radical causes of cancer. **Nat Rev Cancer** 3(4): 276-85.

Jaiswal, M., LaRusso, N.F., Burgart, L.J. and Gores, G.J. 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. **Cancer Res** 60(1): 184-90.

Kadlubar, F.F. and Badawi, A.F. 1995. Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. **Toxicol Lett** 82-83: 627-32.

Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajanawong, V. and Bhudhisawasdi, V. 2006. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. **Xenobiotica** 36(1): 15-28.

Matas, N., Thygesen, P., Stacey, M., Risch, A. and Sim, E. 1997. Mapping AAC1, AAC2 and AACP, the genes for arylamine N-acetyltransferases, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22, a region frequently deleted in tumours. **Cytogenet Cell Genet** 77(3-4): 290-5.

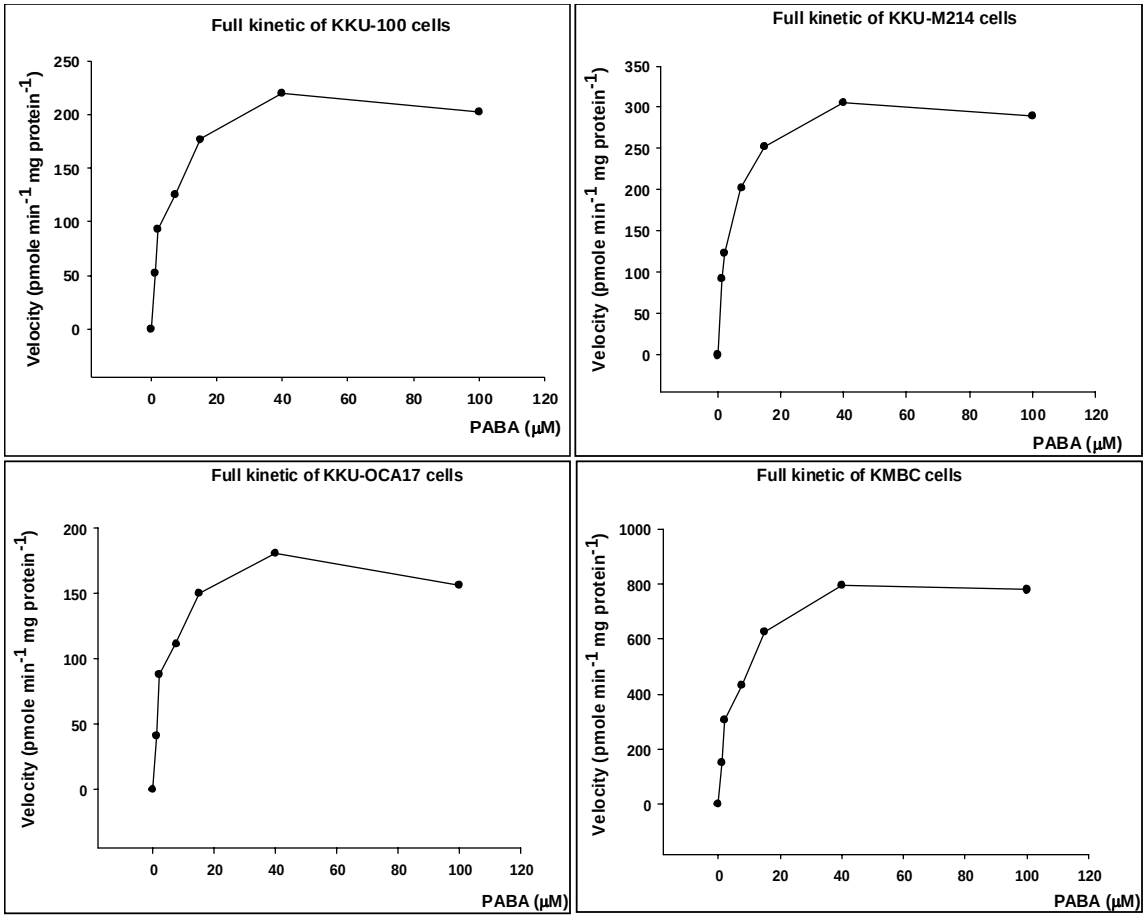
Ohshima, H., Tatemichi, M. and Sawa, T. 2003. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Arch Biochem Biophys** 417(1): 3-11.

Pinlaor, S., Ma, N., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Semba, R., Oikawa, S., Murata, M., Sripa, B., Sithithaworn, P. and Kawanishi, S. 2004. 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(8): 1535-42.

Prawan, A., Kukongviriyapan, V., Tassaneeyakul, W., Pairojkul, C. and Bhudhisawasdi, V. 2005. Association between genetic polymorphisms of CYP1A2, arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 and susceptibility to cholangiocarcinoma. **Eur J Cancer Prev** 14(3): 245-50.

Sripa, B., Leungwattanawanit, S., Nitta, T., Wongkham, C., Bhudhisawasdi, V., Puapairoj, A., Sripa, C. and Miwa, M. 2005. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). **World J Gastroenterol** 11(22): 3392-7.

Weber, W.W. and Hein, D.W. 1985. N-acetylation pharmacogenetics. **Pharmacol Rev** 37(1): 25-79.

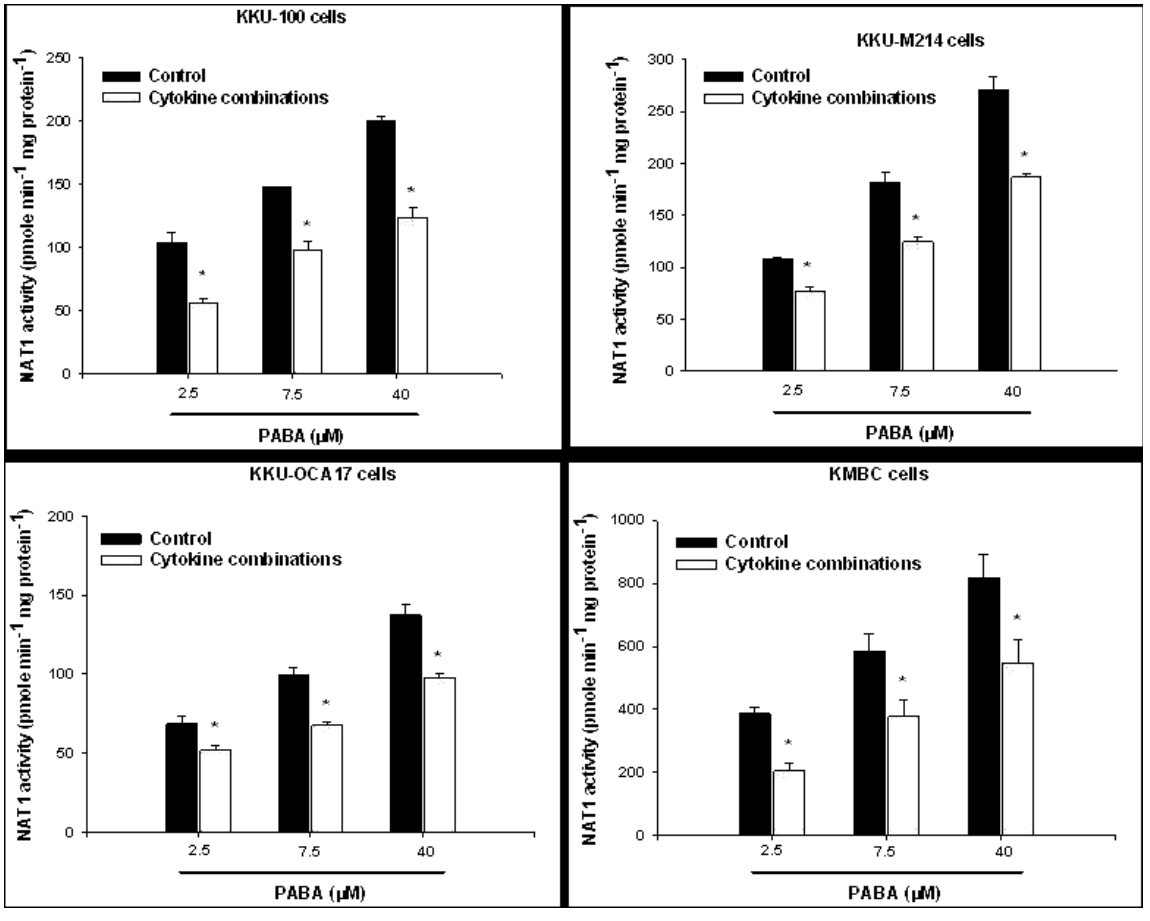


รูปที่ 1 แสดง kinetics ของการทำงานเอนไซม์ NAT1 โดยใช้ PABA เป็นซับสเตรต ปฏิกิริยาดำเนินในโปรตีนจากไซโตพลาสซึมที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร acetylCoA 450 ไมโครโมลาร์ และใช้ซับสเตรต ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5-100 ไมโครโมลาร์, ปฏิกิริยาดำเนินไปนาน 30 นาที ทำการวัดผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยา acetylation คือ N-acetyl-PABA โดยวิธี HPLC

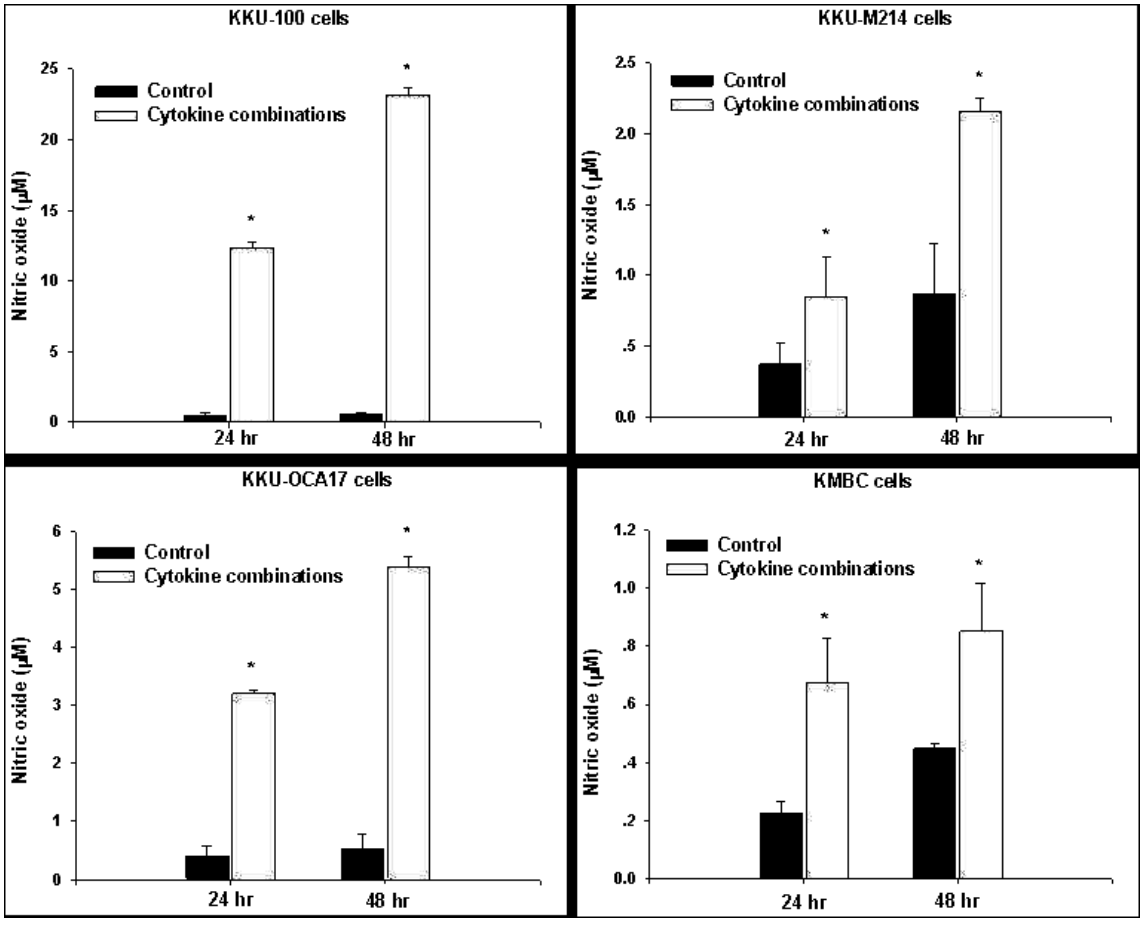
ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC

ชนิดเซลล์	V_{max} (พิโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน)		Km(ไมโครโมลาร์)	
KKU-100	213	9.6*	5.6	0.9
KKU-OCA17	186	9.9*	2.7	0.3
KKU-M214	373	7.4*	4.9	0.7
KMBC	840	27.8	5.8	0.4

*P<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ KMBC cells



รูปที่ 2 แสดงผลของ pro-inflammatory cytokines combination (interferon-γ 400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, interleukin-1β 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ tumor necrotic factor-1α 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ต่อการทำงานของเอนไซม์ NAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC cells ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการ treatment (*p<0.05)



รูปที่ 3 แสดงผลของ pro-inflammatory cytokines combination (interferon-γ 400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, interleukin-1β 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ tumor necrotic factor-1α 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ต่อการสร้าง NO ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-OCA17, KKU-M214 และ KMBC cells ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการ treatment (*$p<0.05$)