

**ROLE OF 2,4,6-TRIHYDROXYACETOPHENONE ON  
CHOLESTEROL 7 $\alpha$ -HYDROXYLASE (CYP7A1) EXPRESSION  
IN HUMAN HEPATOCARCINOMA (HEP G2) CELLS**

**JUREE CHAROENTEERABOON**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2005**

**ISBN 974-04-5795-9  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

บทบาทของสาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนต่อการแสดงออกของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (เฮปจี2) (ROLE OF 2,4,6-TRIHYDROXYACETOPHENONE ON CHOLESTEROL 7 $\alpha$ -HYDROXYLASE (CYP7A1) EXPRESSION IN HUMAN HEPATOCARCINOMA (HEP G2) CELLS)

จุริย์ เจริญธีรบูรณ์ 4437278 SCBC/D

ปร.ค. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พรพิมล รงคันพรัตน์, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์, Ph.D, วิฑูรย์ ธีระโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

สาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนซึ่งได้จากวานิลลินสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสในสัตว์ทดลองแต่ยังไม่เคยถูกศึกษาในมนุษย์มาก่อน การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของสาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนต่อการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสของมนุษย์และศึกษาบทบาทของสารนี้ต่อการแสดงออกของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสโดยใช้เซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ (เฮปจี 2) เป็นแบบจำลอง ผลจากการทดลองพบว่าสาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนเพิ่มระดับประสิทธิภาพของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยขึ้นอยู่กับเวลาและปริมาณของสารที่ใช้ โดยความเข้มข้นของสาร 1 ไมโครโมลาร์ที่เวลา 24 ชั่วโมงเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสได้สูงที่สุดถึง  $160 \pm 8\%$  และเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนได้ถึง  $166 \pm 21\%$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารนี้สามารถต้านฤทธิ์ของกรดน้ำดีคือออกซีโคลิก (25 ไมโครโมลาร์) ในการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสที่ระดับ mRNA และเมื่อศึกษาโดยใช้สารแอกติโนไมซินเพื่อยับยั้งกระบวนการถอดรหัส พบว่าสารนี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มความเสถียรของระดับ mRNA อาจสรุปได้ว่ากลไกของสาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสโดยการกระตุ้นที่ระดับการถอดรหัสของยีน นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนสามารถเพิ่มระดับของเอนไซม์ไซโตโครม 3 $\alpha$ 4 ขึ้นตามเวลาและปริมาณของสารที่ใช้ ดังนั้นสารนี้อาจมีผลต่อยาบางชนิดได้เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม 3 $\alpha$ 4 มีความสำคัญในกระบวนการเผาผลาญยาและอันตรกิริยาระหว่างกันของยา ผลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถบ่งบอกได้ว่าสาร 2,4,6-ไตรไฮดรอกซีอะซีโตรฟีโนนมีศักยภาพที่จะถูกพัฒนาเป็นยาลดไขมันในมนุษย์ได้โดยอาศัยกลไกการกระตุ้นการแสดงออกที่ระดับการถอดรหัสของเอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรส นอกจากนี้การศึกษายังได้ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์เอนไซม์คอเลสเตอรอล-7-อัลฟาไฮดรอกซีเรสให้มีความไวสูงขึ้นเพื่อให้สามารถตรวจวัดระดับเอนไซม์ที่ต่ำในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (เฮปจี2) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับขบวนการเผาผลาญของไขมันอย่างกว้างขวาง วิธีการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ที่ปรับปรุงขึ้นนี้จะเอื้อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์นี้ที่กลายเป็นเป้าหมายอันหนึ่งในการพัฒนาขาลคอเลสเตอรอลในปัจจุบัน

ROLE OF 2,4,6-TRIHYDROXYACETOPHENONE ON CHOLESTEROL  $7\alpha$ -HYDROXYLASE (CYP7A1) EXPRESSION IN HUMAN HEPATOCARCINOMA (HEP G2) CELLS

JUREE CHAROENTEERABOON 4437278 SCBC/D

Ph. D (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: PORNPIMOL RONGNOPARAT, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., PAWINEE PIYACHATURAWAT, Ph.D., WITON TIRASOPHON, Ph.D.

ABSTRACT

2, 4, 6-Trihydroxyacetophenone (THA), obtained from *Curcuma comosa*, has a cholesterol-lowering activity in animals due to enhanced cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) activity, yet it has not been studied in man. This study examined the effect of THA on human CYP7A1 activity and explored the role of THA on human CYP7A1 mRNA expression using human hepatocarcinoma HepG2 cells in order to understand the mechanism of THA on the human CYP7A1-mediated pathway. An improved protocol with high sensitivity for the assay of CYP7A1 activity was developed using oleandomycin, an inhibitor of CYP3A4 that would otherwise further catabolize  $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triol in the next sequential steps downstream of CYP7A1. The improved protocol allowed the study of CYP7A1 activity at low levels in HepG2 cells, which are widely used as *in vitro* human model for the study of CYP7A1 and cholesterol metabolism. THA stimulated CYP7A1 activity in a concentration- and time-dependent manner. After exposure for 24 h, 1  $\mu$ M THA induced CYP7A1 enzyme activity  $160 \pm 8\%$  (mean  $\pm$  S.E.M.) and mRNA level  $166 \pm 21\%$  (mean  $\pm$  S.E.M.) of control. Moreover THA antagonized the inhibitory effect of chenodeoxycholic acid (25  $\mu$ M) on CYP7A1 expression and did not increase CYP7A1 mRNA stability in the presence of actinomycin D. These results indicated that THA raised CYP7A1 activity in human HepG2 cells by stimulating the transcription process. THA also elevated the level of CYP3A4 in a concentration- and time-dependent manner. However, the maximum stimulation of CYP3A4 occurred at 5  $\mu$ M THA, a higher concentration than that seen for CYP7A1, indicating a different mechanism may be involved. Thus, it should be noted that THA may also affect on drugs metabolized by CYP3A4. Nevertheless, THA and its analogs, have the potential to be developed as hypolipidemic agents in man, constituting a novel group of cholesterol-lowering agents that act by up-regulation of CYP7A1 expression. This study also showed that HepG2 cells could be used as an *in vitro* model to screen for activators of human CYP7A1 and to study cholesterol metabolism that affects CYP7A1.

KEY WORDS: CHOLESTEROL  $7\alpha$ -HYDROXYLASE/ CYP3A4/ CYP7A1/ HEP G2 CELLS/ 2,4,6-TRIHYDROXYACETOPHENONE

109 P. ISBN 974-04-5795-9