การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน CYP3A4 ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์คล้ายเซลล์ตับ เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่มียา Rifampicin

นางสาวเบญจพร ปรีชานุกูล
นางสาวศุภสิริ เลิศวิชา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2557

THE COMPARISON OF CYP3A4 GENE EXPRESSION IN HepaRG AND HEPATOCYTE-LIKE CELL AFTER INCUBATE WITH RIFAMPICIN

MISS BENJAPORN PREECHANUKUL
MISS SUPASIRI LERTWICHA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY
2014

โครงการพิเศษ

เรื่อง การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน CYP3A4 **ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์คล้ายเซลล์ตับ เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่มียา** Rifampicin

.....

(นางสาวเบญจพร ปรีชานุกูล)

.....

(นางสาวศุภสิริ เลิศวิชา)

.....

(อ.ดร.คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(อ.ดร.มนตรี ยะสาวงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน CYP3A4 ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์คล้ายเซลล์ตับ เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่มียา Rifampicin

เบญจพร ปรีชานุกูล, ศุภสิริ เลิศวิชา
อาจารย์ที่ปรึกษา: คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร, มนตรี ยะสาวงษ์
ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ : HepaRG, Hepatocyte like cell, PCR, CYP3A4

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนไซโตโครมพี 450 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือเซลล์คล้ายเซลล์ตับที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อชั้นกลาง (hepatocyte-like cell, HLC) และเซลล์มะเร็งตับ (HepaRG) ในสภาวะก่อนและหลังการบ่มเซลล์กับยา rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 20 μM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง การศึกษารูปร่างของเซลล์ (morphology) เพื่อยืนยันถึงความเข้มข้นของยาและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปรียบเทียบระดับ mRNA ของไซโตโครมพี 450 โดยวิธีการสกัดแยก mRNA นำมาสังเคราะห์เป็น cDNA และเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งจะได้ค่าของจำนวนรอบของการทำ PCR น้อยที่สุดแต่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด (threshold cycle, Ct) จากนั้นคำนวณหาระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (fold change) ด้วยวิธีการ $2^{-\Delta\Delta_{Ct}}$ โดยใช้ glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นยีนควบคุมเปรียบเทียบ ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนไซโตโครมพี 450 ทั้ง 4 isotypes ได้แก่ CYP3A4, CYP2D6, CYP2E1 และ CYP2C9 พบว่าการแสดงออกของยีน CYP3A4, CYP2D6, CYP2E1 และ CYP2C9 ในเซลล์ HLC เพิ่มขึ้น 2.90, 0.48, 0.33 และ 0.18 เท่าตามลำดับ ส่วน HepaRG เพิ่มขึ้น 2.90, 0.51, 0.24 และ 0.09 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระดับของ mRNA ในเซลล์หลังจากบ่มร่วมกับยา rifampicin กับกลุ่มที่ไม่ได้บ่มยาและการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ HLC มีความใกล้เคียงกับเซลล์ HepaRG ซึ่งเป็นเซลล์ที่นิยมใช้ศึกษาเอนไซม์ CYP450 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์คล้ายเซลล์ตับที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด (HLC) สามารถใช้เป็นแบบจำลองที่ดีในการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของยา นอกจากนั้นเซลล์ HLC ยังมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ปกติจึงสามารถนำไปศึกษากลไกการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับตับแทนการใช้เซลล์มะเร็งตับได้

Abstract

The Comparison of CYP3A4 Gene Expression in HepaRG and Hepatocyte-like cell after Incubate with Rifampicin

Benjaporn Preechanukul, Supasiri Lertwicha

Project advisor :Khanit Sa-ngiamsuntorn, Montri Yasawong

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : HepaRG, Hepatocyte like cell, PCR, CYP3A4

The comparison of Cytochrome P450 genes expression in hepatocyte-like cell derived from mesenchymal stem cell and hepatocellular carcinoma cell line (HepaRG) after incubate with 0 or 20 μM rifampicin for 48 hours. The morphology of the cells was observed to confirm the optimal dose and culture condition. Total mRNA from hepatocyte cells was extracted and used as a template for cDNA synthesis. CYP450s expressions were detected by amplifying cDNA with specific primers using real-time PCR technique. Expression levels were calculated by threshold cycle (Ct) which represents minimum number of PCR cycle that giving the maximum PCR efficiency. The fold change of CYP450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2E1 and CYP2C9) was calculate from $\Delta\Delta$Ct method and normalized with that of endogenous GAPDH and the corresponding gene expression in HLCs and HepaRG cells. $\Delta\Delta$Ct was transformed into fold change using formula: fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The expressions of CYP3A4, CYP2D6, CYP2E1 and CYP2C9 in HLCs were significantly increased to 2.90, 0.48, 0.33 and 0.18 folds respectively. In HepaRG, the expressions were increased to 2.90, 0.51, 0.24 and 0.09 folds respectively after the induction with rifampicin. The upregulation of CYP450 level in HLCs were similar to that HepaRG. These results suggest that hepatocyte-like cell derived from human mesenchymal stem cell provide a valuable model for human drug metabolism studies. Moreover, HLCs also have normal karyotype that can serve as a remarkable tools for liver disease development which suitable than hepatocellular carcinoma cell line.