

ผลของสารสกัดจากมะรุมกับการแสดงออกของ
เอนไซม์ cytochromeP450 ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์
คล้ายเซลล์ตับ

นางสาวรวิพร เฉลิมวงศาเวช

นายศุภสิทธิ์ ภูผล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2558

THE EFFECT OF *MORINGA OLEIFERA* ON THE
EXPRESSION OF CYTOCHROME P450 IN HepaRG
AND HEPATOCYTE-LIKE CELL

MISS RAVIPORN CHALERMVONGSAVEJ

MISTER SUPASIT PHUPOL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY

FACULTY OF PHARMACY

MAHIDOL UNIVERSITY

2015

โครงการพิเศษ

เรื่อง ผลของสารสกัดจากมะรุมกับการแสดงออกของเอนไซม์ cytochromeP450
ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์คล้ายเซลล์ตับ

.....

(นางสาววิพร เฉลิมวงศาเวช)

.....

(นายศุภสิทธิ์ ภู่อผล)

.....

(อ.ดร.คณิตส์ เสงี่ยมสุนทร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(อ.ดร.มนตรี ยะสว่างษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ผลของสารสกัดจากมะรุมกับการแสดงออกของเอนไซม์ cytochrome P450 ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์คล้ายเซลล์ตับ

วิพร เฉลิมวงศาเวช, ศุภลัทธ์ ภูผล

อาจารย์ที่ปรึกษา : คณิสต์ เสงี่ยมสุนทร, มนต์รี ยะสาวงษ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : มะรุม, HepaRG, Hepatocyte like cell, PCR, Cytochrome P450

การตรวจวัดการแสดงออกของยีนไซโตโครมพี 450 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือเซลล์คล้ายเซลล์ตับ (hepatocyte-like cell, HLC) และเซลล์มะเร็งตับ (HepaRG) หลังบ่มด้วยสารสกัดน้ำจากใบมะรุมในรูปแบบชาชง ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.6 mg/ml เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มจากศึกษารูปร่างของเซลล์ (morphology) เพื่อยืนยันถึงความเข้มข้นของมะรุมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสภาวะที่เหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด จากนั้นเปรียบเทียบระดับ mRNA ของไซโตโครมพี 450 โดยวิธีการสกัดแยก mRNA นำมาสังเคราะห์เป็น cDNA และเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค real-time PCR จะได้ค่าของจำนวนรอบของการทำ PCR (threshold cycle, ct) จากนั้นคำนวณหาระดับการเปลี่ยนแปลงของยีน (fold change) ด้วยวิธีการ $2^{-\Delta\Delta ct}$ โดยใช้ glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นยีนเปรียบเทียบและตรวจวัดปริมาณโปรตีนของไซโตโครมพี 450 ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ CYP3A4 และ CYP2D6 เมื่อบ่มมะรุมชงที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml พบว่าระดับการแสดงออกของยีนไซโตโครมพี 450 ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ CYP3A4 CYP2D6 และ CYP2C9 ในเซลล์ HLC เพิ่มขึ้น 0.016, 1.73 และ 0.49 เท่า ส่วนเซลล์ HepaRG เพิ่มขึ้น 2.57, 2.66 และ 4.30 เท่า และเมื่อบ่มมะรุมชงความเข้มข้น 0.6 mg/ml การแสดงออกของยีนในเซลล์ HLC เพิ่มขึ้น 0.077, 12.57 และ 19.39 เท่า ในเซลล์ HepaRG เพิ่มขึ้น 2.60, 0.43 และ 9.43 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ยีน CYP2C19 ได้ผลที่ไม่ชัดเจนทั้งในเซลล์ HLC และ HepaRG จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำชาชงใบมะรุมมีผลชัดเจนในการกระตุ้นการแสดงออกของไซโตโครมพี 450 ในหลาย isotype ซึ่งอาจทำให้เกิดอันตรกิริยาต่อยาแผนปัจจุบันที่มีการเมตาบอลิซึมผ่านไซโตโครมพี 450 ได้

Abstract

The effect of *Moringa Oleifera* on the expression of cytochrome P450 in HepaRG and hepatocyte-like cell

Raviporn Chalermvongsavej, Supasit Phupol

Project advisor: Khanit Sa-ngiamsuntorn, Montri Yasawong

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: *Moringa Oleifera*, HepaRG, Hepatocyte-like cell, PCR, Cytochrome P450

The evaluation of Cytochrome P450 genes expression in hepatocyte-like cell (HLC) and HepaRG after incubate with *Moringa Oleifera* infusion from leaves powder at concentration of 0.3 and 0.6 mg/ml for 48 hours. The cell morphology was observed to confirm the non-cytotoxicity of the infusion and the optimal culture condition. Total mRNA from HLC and HepaRG was extracted and used as a template for cDNA synthesis, then amplifying cDNA with specific primers using real-time PCR technique. The genes expression were calculated by threshold cycle (Ct), minimal number of PCR cycles that giving maximum PCR efficiency. The fold change of Cytochrome P450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) of corresponding gene in HLC and HepaRG was calculated from $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a reference gene. The level of Cytochrome P450 proteins was detected using immunofluorescence technique. After incubated *Moringa Oleifera* infusion at concentration of 0.3 mg/ml the expression level of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 in HLC were increased to 0.016, 1.73 and 0.49 folds and in HepaRG was increased to 2.57, 2.66 and 4.30 folds respectively. At concentration of 0.6 mg/ml the expression level of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 in HLC were increased to 0.077, 12.57 and 19.39 folds and in HepaRG were increased to 2.60, 0.43 and 9.43 folds respectively. However, the expression of CYP2C19 in both HLC and HepaRG was unclear. These result suggest that the *Moringa Oleifera* infusion from leaves powder induced the expression of cytochrome P450 in several isotypes bring forward to drug interaction with drug that use Cytochrome P450 as their metabolizer.