การตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงและประเมินค่าการเพิ่มจำนวนของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์

นางสาวฐานิดา สุธีรยงประเสริฐ
นางสาวศุภิสรา อิทธสมบัติ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2558

THE DETECTION OF IN VITRO HEPATITIS C VIRUS INFECTION IN CULTURE HEPATOCYTES AND EVALUATION OF VIRAL PROPAGATION BY PCR TECHNIQUE

MISS THANIDA SUTEERAYONGPRASERT
MISS SUPISARA ITTASOMBAT

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 การตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงและประเมินค่าการเพิ่มจำนวนของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์

ลายเซ็น

....

(นางสาวฐานิดา สุธีรยงประเสริฐ)

ลายเซ็น

....

(นางสาวศุภิสรา อิทธสมบัติ)

ลายเซ็น

....

(อาจารย์คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลายเซ็น

....

(อาจารย์มนตรี ยะสาวงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ลายเซ็น

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงและประเมินค่าการเพิ่มจำนวนของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์

ฐานิดา สุธีรยงประเสริฐ, ศุภิสรา อิทธสมบัติ

อาจารย์ที่ปรึกษา: คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร*, มนตรี ยะสาวงษ์*, กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี**

*ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : HepaRG, Hepatocyte like cell, PCR, HBV, hepatitis C virus

ไวรัสตับอักเสบชนิดซีเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคตับเรื้อรังและสามารถพัฒนาเป็นโรคมะเร็งตับ การพัฒนาแบบจำลองในการศึกษาวงชีวิตของไวรัสในเซลล์ตับถูกพัฒนาขึ้นโดยวิธีการใช้เซลล์ตับ (Huh-7) และสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดซี (JFH-1) เพื่อสร้างไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ผลิตไวรัสตับอักเสบชนิดซีเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์มะเร็งซึ่งมีความแตกต่างจากเซลล์ตับปกติ เพื่อพัฒนาเซลล์ตับปกติเป็นแบบจำลองในการเพิ่มจำนวนไวรัสตับอักเสบชนิดซี เริ่มจากการส่งผ่านสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าสู่เซลล์คล้ายเซลล์ตับ (HLCs) และเซลล์มะเร็งตับ (HepaRG) เปรียบเทียบปริมาณของไวรัสที่ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด นำไวรัสที่ได้ไปทดสอบการติดเชื้อในเซลล์ที่ปลอดเชื้อและหาปริมาณไวรัสที่ผลิตจากเซลล์ที่ติดเชื้อ ผลศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไวรัสตับอักเสบชนิดซี ในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ hepatocyte-like cell (HLC) และ HepaRG โดยเปรียบเทียบปริมาณไวรัสด้วยวิธี absolute quantitative real-time PCR และนำจำนวนรอบของการทำพีซีอาร์เปรียบเทียบกับกราฟ HCV RNA มาตรฐานพบว่าปริมาณไวรัสตับอักเสบชนิดซีที่ผลิตได้จากเซลล์ HLC และ HepaRG เท่ากับ 15×10^{6} IU/mL และ 3×10^{6} IU/ mL ผลการติดเชื้อในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าปริมาณไวรัสตับอักเสบชนิดซีที่ผลิตได้จากเซลล์ HLC และ HepaRG เท่ากับ 18×10^{8} IU/mL และ 9×10^{8} IU/mL โดยเซลล์ HLC ที่ผ่านการ transfect HCV RNA และ infect ด้วยอนุภาค HCV สามารถผลิตไวรัสได้มากกว่าเซลล์ HepaRG 84.09% และ 66.79% ตามลำดับ การทดสอบ HCV RNA ชนิดสายลบด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิสจากพีซีอาร์ยืนยันได้ว่าเซลล์ HLC สามารถใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิตไวรัสตับอักเสบชนิดซีเพื่อใช้เป็นเซลล์ทดสอบยาต้านไวรัสในลำดับถัดไป

Abstract

The detection of in vitro hepatitis C virus infection in culture hepatocytes and evaluation of viral propagation by PCR technique

Thanida Suteerayongprasert, Supisara Ittasombat

Project advisor: Khanit Sa-ngiamsuntorn*, Montri Yasawong*, Krit Thirapanmethee**

*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : HepaRG, Hepatocyte like cell, PCR, HBV, hepatitis C virus

Hepatitis C virus is a major human pathogen causing chronic liver diseases and developing to hepatocellular carcinoma. The efficient cell culture model for HCV life cycle was developed using Huh-7 cell line and full-length HCV RNA (JFH-1) to propagate HCV in cell culture. However, the host cell for HCV production is depend on hepatocellular carcinoma cell lines that were different from normal human hepatocyte. To develop normal human hepatocyte as a host cell for HCV production, HCV RNA (JFH-1) was transfected into HLC and HepaRG cells and the viral load was compared in the term of HCV propagation from transfection. HCV particles from culture medium were used to infect naïve HLC and HepaRG. The HCV viral load in hepatocyte-like cell (HLC) and HepaRG were evaluated using absolute quantitative real-time PCR technique by comparing the PCR threshold cycles with standard curve from HCV RNA. The result demonstrated that HCV viral load from transfected HLC and HepaRG were 15×10^{6} IU/mL and 3×10^{6} IU/mL. The viral load from infected HLC and HepaRG were were 18×10^{8} IU/mL and 9×10^{8} IU/mL. Transfected-HLC and infected-HLC produced HCV particles 84.09% and 66.79% higher than HepaRG. The detection of positive stranded HCV RNA in infected cell and HCV viral load confirmed that HLC could serve as a host cell for HCV production and screening anti-HCV drugs in the future.