การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับโดยการใช้พาราเซตามอลเป็นสารทดสอบ

นางสาวพรรษรัตน์ เบญจมกุล
นางสาวพลอยไพลิน พงษ์ปภาดา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2559

The Detection of Hepatotoxicity Using Acetaminophen as A Testing Compound.

MISS PASARAT BENJAMAKUL

MISS PLOYPHAILYN PHONGPAPHADA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY

FACULTY OF PHARMACY

MAHIDOL UNIVERSITY

2016

โครงการพิเศษ

เรื่อง การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับโดยการใช้พาราเซตามอล เป็นสารทดสอบ

ลายเซ็น

.....

(นางสาว พรรษรัตน์ เบญจมกุล)

ลายเซ็น

.....

(นางสาว พลอยไพลิน พงษ์ปภาดา)

ลายเซ็น

.....

(อาจารย์ คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ
การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับโดยการใช้พาราเซตามอลเป็นสารทดสอบ

พรรษรัตน์ เบญจมกุล, พลอยไพลิน พงษ์ปภาดา
อาจารย์ที่ปรึกษา: คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร, มนตรี ยะสาวงษ์
ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ: paracetamol induced hepatotoxicity, HepaRG, Hepatocyte-Like cell, NAPQI, NAC

แบบจำลองในการตรวจสอบสารเมตาบอไลท์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ตับที่เปลี่ยนแปลงมาจากสารเคมีหรือยามีข้อจำกัด เนื่องจากเซลล์ตับที่ใช้ทดสอบขาดการทำงานของเอนไซม์ phase I และ phase II จึงไม่พบพิษในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงดั้งเดิม เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบผลของเมตาบอไลท์ที่เป็นพิษ จึงนำพาราเซตามอลและ N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) มาบ่มกับเซลล์คล้ายเซลล์ตับ (hepatocyte-like cell: HLC) และเซลล์มะเร็งตับ HepaRG เพื่อตรวจวัดช่วงความเข้มข้นของสารที่มีเป็นพิษต่อเซลล์และวัดการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ใน phase I เช่น CYP1A2 CYP3A4 และ CYP2E1 และ phase II เช่น ยีนต้านอนุมูลอิสระ catalase Nrf2 GCLC GCLM และ GPX ด้วยวิธี real-time PCR นอกจากนั้นยังศึกษาผลของ N-Acetylcysteine (NAC) ในการยับยั้งความเป็นพิษของพาราเซตามอล ผลการทดลองพบว่าค่า IC_{50} ของ พาราเซตามอลในเซลล์ HLC และ HepaRG เท่ากับ 15 และ 7.5 mM ตามลำดับ ส่วน N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) ไม่พบความเป็นพิษในทั้งสองเซลล์ เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับเอทานอลก่อนได้รับพาราเซตามอลไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นพิษชัดเจน ส่วนการแดงออกของยีน catalase ในเซลล์ HLC เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า GCLC 2.1 เท่า GCLM 2 เท่า และ Nrf2 1.5 เท่า ส่วนในเซลล์ HepaRG ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและการได้รับ N-acetylcysteine (NAC) ไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ทั้งสองชนิด นอกจากนั้นพบว่าพาราเซตามอลเพิ่มการแสดงออกของ CYP1A2, CYP3A4 และ CYP2E1 1-100 เท่าใน HLC แต่ไม่มีความสัมพันธ์ใน HepaRG เมื่อบ่มเซลล์ HLC กับพาราเซตามอลและ N-Acetylcysteine (NAC) พบกลุ่มยีนต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นหลังจาก 8 ชั่วโมง ผลการทดลองสรุปว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อพาราเซตามอลและ N-acetylcysteine (NAC) ที่แตกต่างกันทั้งด้านความเป็นพิษและการเพิ่มการทำงานของใน phase I และ phase II เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเป็นตัวแทนในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับได้ หากศึกษาสภาวะที่เหมาะสมก่อนการทดสอบ

Abstract

The Detection of Hepatotoxicity using Acetaminophen as A Testing Compound.

Pasarat Benjamakul, Ployphailyn Phongpaphada

Project Advisor: Khanit Sa-ngiamsuntorn, Montri Yasawong

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: Paracetamol induced hepatotoxicity, HepaRG, Hepatocyte-Like cell, NAPQI, NAC

The models for the detection of the hepatotoxic metabolite quite have the limitation. Due to the lack of liver enzymes in phase I and phase II in classical hepatocyte cell lines, the toxicity could not be seen. To develop hepatotoxic metabolite, paracetamol and N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) were used as the testing compounds. Hepatocyte-like cell (Hepatocyte-Like cell: HLC) and HepaRG were incubated with paracetamol or NAPQI for detecting the toxic concentration using fluorescence microplate reader. Herein, the gene expression in phase I (e.g. CYP1A2, CYP3A4 and CYP2E1) and phase II enzymes (e.g. catalase, Nrf2, GCLC, GCLM and GPX) detected by real-time PCR. Moreover, we also investigate the ability of N-acetylcysteine (NAC) in term of decreasing paracetamol toxicity. The results revealed that IC_{50} of paracetamol in HLC and HepaRG cell line were 15 and 7.5 mM respectively. NAPQI did not show the toxicity in both cells clearly. Incubated with ethanol prior to treat with paracetamol did not alter the toxic concentration in both cells whereas the level of catalase, GCLC, GCLM and Nrf2 increased to 2.5, 2.1, 2 and 1.5 folds respectively only in HLC. The result showed that NAC have no effect in antioxidant gene expression in both cells. Moreover, treated cells with paracetamol increased the expression of CYP1A2, CYP3A4 and CYP2E1 about 1-100 folds in HLC though HepaRG cell lines did not have a correlation. The antioxidant enzymes have elevated from the baseline after incubated HLC with paracetamol and N-acetylcysteine (NAC) for more than 8 hours. In conclusion, HLC and HepaRG have the distinguish response to paracetamol and NAC in toxicity, phase I and phase II activity. Both cells can be applied as a novel model for hepatotoxicity test in proper condition.