ความสามารถในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง และพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

นายพชร บุณยะตุลานนท์

นายอธิราช วงศ์บุญมาก

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2560

THE INFECTIVITY OF HEPATITIS B VIRUS TO CULTURE HEPATOCYTES AND DEVELOPMENT OF VIRAL LOAD DETECTION METHOD USING REAL-TIME PCR

MR. PODCHARA BOONYATULANONT

MR. ATHIRAT WONGBUNMAK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY

FACULTY OF PHARMACY

MAHIDOL UNIVERSITY

2017

โครงการพิเศษ

เรื่อง ความสามารถในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง และพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

.....

(นาย พชร บุณยะตุลานนท์)

.....

(นาย อธิราช วงศ์บุญมาก)

.....

(ผศ.ดร.คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(อาจารย์ ลิขสิทธิ์ วงศ์ศรศักดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ ความสามารถในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงและพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

พชร บุณยะตุลานนท์, อธิราช วงศ์บุญมาก
อาจารย์ที่ปรึกษา : คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร, ลิขสิทธิ์ วงศ์ศรศักดิ์
ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ : Hepatitis B virus , Hepatocyte like cell, HepaRG, real-time PCR

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของโลก หากไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ ดังนั้นการพัฒนาเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสได้จึงมีความสำคัญในการพัฒนายา เซลล์คล้ายเซลล์ตับ hepatocyte-like cell (HLC) เป็นเซลล์ตับที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดและมีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างไม่จำกัด การศึกษานี้เริ่มจากตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน NTCP ตรวจวัดจำนวนของเชื้อไวรัสที่ผลิตออกมาจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อด้วยวิธี absolute real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นได้ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.997 จำนวนของเชื้อไวรัสเมื่อได้รับยาต้านไวรัสที่ใช้ในปัจจุบันและตรวจสอบการแสดงออกของ Interferon-stimulated genes (ISGs) เปรียบเทียบกับเซลล์ HepaRG โดยผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน NTCP พบว่าหลังบ่มเซลล์ในอาหารที่มี 2% DMSO มีแสดงออกของ NTCP ในเซลล์ HepaRG และ HLC เพิ่มขึ้น 14.47 และ 18.89 เท่า ตามลำดับ การทดสอบการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสในเซลล์ HLC ที่ได้รับยา lamivudine มีจำนวนไวรัสลดลงมากสุด เหลือร้อยละ 15.50 ในวันที่ 9 เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับยา เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ISGs ในเซลล์ HLC ในเซลล์ติดเชื้อเปรียบเทียบกับเซลล์ไม่ติดเชื้อ พบว่ายีน IL28B มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.82 เท่า หลังติดเชื้อไวรัส และเมื่อได้รับยา IFN-α พบว่าการแสดงออกของยีน ISG15 เพิ่มขึ้น 3.56 เท่า จากผลการทดลองต่างๆ จะพบว่า เซลล์ HLC มีความสามารถในการติดเชื้อ HBV เหมือนกับ HepaRG แต่มีการแสดงออกของโปรตีน NTCP มากกว่า มีการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสได้ดีกว่า ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยง HLC และวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้เป็นแบบจำลองใหม่ทดแทนแบบจำลองที่มีอยู่ในปัจจุบัน

Abstract

The infectivity of hepatitis B virus to culture hepatocytes and development of viral load detection method using real-time PCR

Podchara boonyatulanont, Athirat wongbunmak

Project advisor: Khanit Sa-ngiamsuntorn, Likasit Wongsorasak

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: Hepatitis B virus, Hepatocyte like cell, HepaRG, real-time PCR

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major health care problem in the world. If the patient left untreated, it can lead to severe outcomes such as cirrhosis and liver cancer. This study aims to develop appropriate HBV cell culture model to screen the candidate compounds for new anti-viral drugs. We developed new HBV culture models using hepatocyte-like cell (HLC) that derived from human mesenchymal stem cell. We demonstrated that HLC could be used as a model for HBV infection compared with HepaRG cells by measuring the expression of NTCP and the expression of Interferon-stimulated genes (ISGs). Moreover, HBV viral load from infected cells and non-infected cells that treated with classical anti-viral drugs was investigated. The results demonstrated that after treated with 2 % DMSO the NTCP expression level in HepaRG cells and HLC were increased 14.47 and 18.89 times respectively when compared with immature cells. The HBV viral load of infected HLC treated lamivudine had the lowest number of viral load about 15.50% on day 9 post-infection compared with untreated cells. The mRNA expression of ISGs was increased in the infected HLC comparing to uninfected HLC. The data revealed that the mRNA of ISGs specifically IL28B is increase 1.82 times. The Infected cells treated with Interferon α, showed an increase in the expression of ISGs called ISG15 3.56 times. In conclusion, this study provided evidences that HLC is suitable for HBV culture models same as HepaRG cells. HLC could serve as a host cell for HBV production and it has higher expression of NTCP than HepaRG cells. The HLC and RT-PCR method can detect viral load in cell and could replace the current model for hepatitis B infection.