รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไลปกป้องของฟิแลนด์ทินต่อความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2 และเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมเฮพจี 2 และ ทีเฮช พี 1

Protective mechanism of phyllanthin on alcohol-induced hepatotoxicity in cultured HepG2 and co-cultured of HepG2 and monocytic THP-1 cells

คณะนักวิจัย

ดร.วนิดา สุขเกษศิริ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ SCI550419S

1. **ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)** กลไลปกป้องของฟิแลนด์ทินต่อความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2 และเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมเฮพจี 2 และ ทีเฮช พี 1

(อังกฤษ) Protective mechanism of phyllanthin on alcohol-induced hepatotoxicity in cultured HepG2 and co-cultured of HepG2 and monocytic THP-1 cells

2. คณะนักวิจัย

1. ดร.วนิดา สุขเกษศิริ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์

3. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้คงไม่สำเร็จลุล่วงหากไม่ได้รับความช่วยเหลือและความร่วมมือจากบุคคลและหน่วยงานต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ ดร.เหมวลา เชิดชูพันธ์เสรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สารฟิแลนด์ทิน ผศ.ดร.วิสิฐ ตั้งเคียงศิริสินภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปกร ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2

ขอขอบคุณ รศ. พ.ต.ท. หญิง ภญ. ดร.สมทรง ลาวัลย์ประเสริฐ ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ผศ.ดร. กิจจา สว่างเจริญ ที่ให้คำปรึกษาการทำวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา และภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2555

บทคัดย่อ

แอลกอฮอล์เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้พิษต่อตับ สารฟิแลนท์ทินเป็นสารที่มีฤทธิ์ปกป้องตับและมีรายงานว่าลดความเป็นพิษต่อตับจากการได้รับสารที่ก่อให้เกิดพิษต่อตับ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดูฤทธิ์และกลไกการออกฤทธ์ของสารฟิแลนท์ทินในเซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2 และเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมเฮพจี 2 และที เฮช พี 1 ที่ได้รับการทำให้เกิดพิษด้วยแอลกอฮอล์ ผลการทดลองพบว่าการได้รับแอลกอฮอล์เป็นเวลา 4 และ 72 ชั่วโมง มีผลลดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด การได้รับสารฟิแลนท์ทิน 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแอลกอฮอล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าสารฟิแลนท์ทินมีผลลดระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรีย รวมทั้งลดจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis และลดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2 และเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมเฮพจี 2 และที เฮช พี 1 ส่วนการได้รับแอลกอฮอล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารฟิแลนท์ทินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้รับแอลกอฮอล์มีผลเพิ่มระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรียภายในเซลล์ เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2 และเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมเฮพจี 2 และที เฮช พี 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อได้รับสารฟิแลนท์ทินที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และได้รับแอลกอฮอล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารฟิแลนท์ทินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เท่านั้นที่มีผลลดระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรียภายในเซลล์ ลดจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis และลดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ในเซลล์เพาะเลี้ยง เฮพ จี 2 เท่านั้น โดยไม่มีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมเฮพจี 2 และที เฮช พี 1 จากการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารฟิแลนท์ทินในการลดความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ต่อเซลล์ตับซึ่งสนับสนุนข้อมูลการแพทย์แผนโบราณที่นำมาใช้ในการรักษารักษาและป้องกันความเป็นพิษต่อตับ

ABSTRACT

Alcohol has been considered to be a major risk factor related to liver injury. Phyllanthin is a hepatoprotective agent that has been reported to reduce hepatotoxicity initiated by various compounds. Thus, our study aimed to evaluate the effects and possible mechanisms of phyllanthin on alcohol induced liver injury in HepG2 cells as well as with a co-culture of HepG2 cells with THP-1 differentiated macrophage cells. Treatment of cells with alcohol for 4 and 72 h resulted in a significant decrease in viability for both cell types, and we further proved that such toxicity was triggered by production of reactive oxygen species (ROS), changes to mitochondrial membrane potential (MMP) and apoptotic cell death. Alcohol (4 and 72 h) exposure significantly increased the intracellular ROS generation, decreased the MMP changes, increased the number of apoptotic and necrotic cells and also induced caspase-3/7 activity in a co-culture with THP-1 differentiated macrophage cells higher than HepG2 cells alone. Pretreatment of the HepG2 cells with phyllanthin for 24 hour prior to alcohol exposure for 4 h significantly decreased the intracellular production of ROS and also improved the change of the MMP as well as causing a decrease of the number of apoptotic cells and inhibited the caspase-3/7 activity. In the co-cultured cells, phyllanthin was also shown to attenuate the increase of ROS production, increased the MMP at the highest concentration of phyllanthin and also improved cell survival by inhibiting the caspase-3/7 activity. In contrast, pretreatment of the HepG2 cells with 10 μM phyllanthin for 24 hour prior to alcohol exposure for 72 h significantly decreased the intracellular production of ROS and also improved the change of the MMP as well as causing a decrease in the number of apoptotic cells and inhibited the caspase-3/7 activity but not affect to the co-cultured cells. Our results clearly indicated that treatment with phyllanthin should have a significant therapeutic effect on alcohol-related liver diseases.