

ผลของแคดเมียมคลอไรด์ที่มีต่อ เซลล์ตับอิสระของหนูขาวใหญ่



นางสาว พรพิมล จินารัตน เวช

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เกษศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชา เกษษวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-318-1

009022

I16604063

EFFECTS OF CADMIUM CHLORIDE ON ISOLATED  
RAT HEPATOCYTES

Miss Pornpimol Chinaratanavetch

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

ISBN 974-564-318-1



หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแคต เมียมคลอไรด์ที่มีต่อ เซลล์ตับอิสระของหนูขาวใหญ่
ชื่อนิสิต	นางสาว พรพิมล จินารัตน เวช
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน
ภาควิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2527

บทคัดย่อ



เซลล์ตับอิสระ เตรียมได้จากการแยก เซลล์จากตับของหนูขาวใหญ่ เพศผู้ สกุล Wistar (น้ำหนัก 200-250 กรัม) โดยวิธีของ Berry และ Friend (1969) ซึ่งปรับปรุงโดย Stacey และ Priestly (1978) เซลล์ตับอิสระที่เตรียมได้ตามปกติมีปริมาณ 2-4 กรัม มีค่า trypan blue exclusion index มากกว่า 90% ลักษณะรูปร่างของเซลล์ ความคงตัวของผนัง เซลล์และความสามารถของ เซลล์ในกระบวนการ เมตาบอลิซึม ได้ถูกตรวจสอบ เพื่อพิสูจน์ว่า เซลล์ที่เตรียมนั้น เป็น เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ เซลล์ตับอิสระของหนูขาวใหญ่ได้ถูกนำมาใช้เป็นแบบทดลอง เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อตับของแคต เมียมคลอไรด์โดยใช้แคต เมียมในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (1-100 ไมโครโมลาร์) เติมลงใน เซลล์ตับอิสระที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยาเลี้ยง เซลล์แล้ว incubate เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ความคงตัวของผนัง เซลล์ซึ่งวัดโดยการลดลงของ โปแตสเซียมภายในเซลล์ การสูญเสีย เอนไซม์ alanine aminotransferase และการลดลงของ trypan blue exclusion index เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นกับขนาดของแคต เมียมที่ใช้ นอกจากนี้แคต เมียมยังมีฤทธิ์ยับยั้ง gluconeogenesis ซึ่งใช้เป็น เครื่องวัดความสามารถของ เซลล์ในกระบวนการ เมตาบอลิซึม จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของ เซลล์ตับอิสระ ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยง เซลล์ที่มีแคต เมียม (5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากพิษของแคต เมียมที่มีต่อ เซลล์คือเกิด vacuoles และ fat droplets ขึ้นภายใน cytoplasm ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแคต เมียมคลอไรด์มีพิษโดยตรงต่อ เซลล์ตับอิสระของหนูขาวใหญ่ และ เซลล์ตับอิสระนี้อาจนำมาใช้ เป็นแบบทดสอบที่เหมาะสม เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อตับซึ่ง เกิดจากสารพิษตัวอื่น ๆ ได้ เป็นอย่างดี



that cadmium chloride may have the direct cytotoxic effects on isolated rat hepatocytes and isolated rat hepatocytes may prove to be a suitable model in the studies of hepatotoxicity induced by various hepatotoxins.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ACKNOWLEDGEMENTS



I would like to thank:

Assist. Prof. Dr. Pornpen Pramyothin, my advisor, for training me the hepatocyte isolation technique, her valuable guidance, advice and encouragement throughout this study.

Assoc. Prof. Dr. Vilailag Im-Udom, Head of the Department of Pharmacology, for her support in the teaching assistant fund during my study.

Assoc. Prof. Dr. Prasan Dhum-upakorn, Assoc. Prof. Prakorn Chudapongse, Assist. Prof. Wittaya Janthasoot, for their kindly advice during this study.

The Department of Medical Science, for helping me on flamphotometric work.

Miss Siripen Vethchagarn (The Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University), for her assistance in electron micrographic work.

Chulalongkorn University Graduate School for partial financial support, to conduct this study.

Finally, Miss Vitoon Keowtrirat, for typing this thesis.

CONTENTS



	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF TABLES.....	xiv
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
General Introduction on Isolated Hepatocytes.....	1
A. Isolation of Hepatocytes.....	2
1. Preperfusion.....	3
2. Collagenase Perfusion.....	3
3. Buffer composition, pH and Oxygenation	4
4. Perfusate Flow.....	4
5. Liberation of Cells.....	5
6. Purification of Parenchymal Cells.....	5
7. Incubation of Cell Suspension.....	6
B. Criterion for Viability of Isolated Hepatocytes	7
C. Properties of Isolated Hepatocytes.....	8
D. Uses of Isolated Hepatocytes.....	9
General Introduction on Cadmium.....	10
A. Cadmium in Man and Environment.....	11
B. Cadmium : Absorption, Distribution, and Excretion.....	12
1. Absorption.....	12



	Page
2. Distribution.....	13
a) Cadmium in Blood.....	15
b) Hepatic Cadmium.....	15
c) Renal Cadmium.....	16
d) Cadmium in Other Tissues.....	16
3. Excretion.....	17
C. Biological Half-life.....	19
D. Cadmium Intoxications.....	19
1. Renal Effects.....	20
2. Reproductive Effects.....	21
3. Cardiovascular Effects.....	22
4. CNS Effects.....	23
5. Hepatic Effects.....	24
Aims of the Thesis.....	25
Experimental Protocols.....	26
II. MATERIALS AND METHODS .....	30
Materials .....	30
A. Animals.....	30
B. Chemicals.....	30
C. Instruments.....	31
D. Gas Mixtures.....	32
E. Composition of Perfusion and Incubation Mediums	32
F. Liver Perfusion Apparatus.....	33
Methods .....	35
A. Isolation of Rat Hepatocytes.....	35
B. Incubation of Hepatocyte Suspension.....	41

	Page
C. Determination of the Wet Weight.....	41
D. Trypan Blue Exclusion Test.....	41
E. Determination of Plasma Enzyme Activity of Alanine Aminotransferase (ALT).....	43
F. Determination of Intracellular $K^+$ Concentration.....	45
G. Determination of Microsomal Aminopyrine Demethylase Activity.....	45
H. Determination of the Gluconeogenic Capability	48
I. Determination of Glucose.....	49
J. Morphological Examination.....	51
K. Expression of Results and Statistics.....	51
III. RESULTS.....	52
Results of Study 1.....	52
Results of Study 2.....	60
IV. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	67
Discussion of Study 1.....	67
Discussion of Study 2.....	69
Conclusion.....	71
REFERENCES.....	72
VITA.....	89

## ABBREVIATIONS

ALT	alanine aminotransferase
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	calcium ion
Cd	cadmium
°C	degree celsius
cm	centrimeter
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
g	gram
hr	hour
K <sup>+</sup>	pottassium ion
IU	international unit
µg	microgram
µM	micromolar
mg	milligram
ml	millilitre
mM	millimolar
mm <sup>3</sup>	cubic millimetre
min	minute
%	percent
TB	trypan blue
TCA	trichloroacetic acid

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Liver perfusion apparatus.....	34
2. Preparation and purification of isolated hepatocytes.....	39
3. Grid marking on a standard hemocytometer.....	42
4. Photomicrograph of suspension of freshly isolated rat hepatocytes in modified Kreb's- Hensleit physiological solution.....	53
5. Photomicrograph of freshly isolated rat hepatocytes	54
6. Transmission electron micrograph of isolated rat hepatocytes, presenting a well-preserved ultrastructure.....	55
7. Transmission electron micrograph of isolated rat hepatocytes with mitochondria (A) and rough endoplasmic reticulum (B).....	56
8. The Effect of cadmium chloride on cell membrane integrity of isolated rat hepatocytes. A. Trypan blue exclusion index.....	61
9. The Effect of cadmium chloride on cell membrane intergrity of isolated rat hepatocytes. B. The release of intracellular $K^+$ .....	62
10. The Effect of cadmium chloride on cell membrane integrity of isolated rat hepatocytes. C. The release of cytoplasmic enzyme (ALT).....	63

11. The effect of cadmium chloride on metabolic  
integrity of isolated rat hepatocytes..... 64
12. Transmission electron micrograph of cadmium-  
treated hepatocytes..... 66



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Cell membrane integrity of freshly isolated rat hepatocytes.....	58
2. Metabolic capability of freshly isolated rat hepatocytes.....	59



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย