

ผลของแคมเปญคลื่นไส้เชล์ทับอิสระของทุกข่าวใหญ่



นางสาว พรพิมล จินารัตน เวช

# ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชา เภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-318-1

009022

๑๙๖๐๕๙๑

EFFECTS OF CADMIUM CHLORIDE ON ISOLATED  
RAT HEPATOCYTES

Miss Pornpimol Chinaratanavetch

ศูนย์วิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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



Thesis title

Effects of Cadmium Chloride on Isolated Rat  
Hepatocytes

By

Miss Pornpimol Chinaratnavetch

Thesis Advisor

Assistant Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for Master's Degree of Science  
in Pharmacy.

.....S. Bunnag.....Dean of Graduate School  
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Commottee:

.....Vilailag Im-Udom.....Chairman  
(Associate Professor Vilailag Im-Udom, Dr. en Pharm.)

.....Prasan Dhumma-upakorn.....Member  
(Associate Professor Prasan Dhumma-Upakorn, Ph.D.)

.....Prakorn Chudapongse.....Member  
(Assosiate Professor Prakorn Chudapongse, Ph.D.)

.....Pornpen Pramyothin.....Member  
(Assistant Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแแคด เมียมคลอไรด์ที่มีต่อ เชลล์ตับอิสระของหมูขาวใหญ่
ชื่อนิสิต	นางสาว พรมิล จินารัตน เวช
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พร. เพ็ญ เปรมโยธิน
ภาควิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2527

บทตัดย่อ



เชลล์ตับอิสระ เตรียมได้จากการแยก เชลล์จากตับของหมูขาวใหญ่ เพศผู้ สุก Wistar (น้ำหนัก 200-250 กรัม) โดยวิธีของ Berry และ Friend (1969) ซึ่งปรับปรุงโดย Stacey และ Priestly (1978) เชลล์ตับอิสระที่เตรียมได้ตามปกติมีปริมาณ 2-4 กรัม มีค่า trypan blue exclusion index มากกว่า 90% สักษะรูปร่างของ เชลล์ ความคงตัวของผนัง เชลล์ และความสามารถของ เชลล์ ในกระบวนการ เมตาบoliism ได้ถูกตรวจสอบ เพื่อพิสูจน์ ว่า เชลล์ที่ เตรียมนั้น เป็น เชลล์ที่มีชีวิตอยู่ เชลล์ตับอิสระของหมูขาวใหญ่ได้ถูกนำมาใช้ เป็นแบบทดลอง เพื่อทดสอบความ เป็นพิษต่อตับของแแคด เมียมคลอไรด์ โดยใช้แแคด เมียมในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (1-100 ไมโครโมลาร์) เติมลงใน เชลล์ตับอิสระที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยา เลี้ยง เชลล์แล้ว incubate เป็นเวลา 30 นาที พนว่า ความคงตัวของผนัง เชลล์ซึ่งรักโดยการลดลงของ โปรแทล เซียมภายใน เชลล์ การสูญเสีย เอนซีม alanine aminotransferase และการลดลงของ trypan blue exclusion index เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นกับขนาดของแแคด เมียมที่ใช้ นอกจากนี้แแคด เมียมยังมีฤทธิ์ยับยั้ง gluconeogenesis ซึ่งใช้เป็นเครื่องรักความสามารถของ เชลล์ ในกระบวนการ เมตาบoliism จากการศึกษาสักขีรูปร่างของ เชลล์ตับอิสระ ที่เลี้ยงในน้ำยา เลี้ยง เชลล์ที่มีแแคด เมียม (5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อีเลคทรอน พบรการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากพิษของแแคด เมียม ที่มีต่อ เชลล์ หรือเกิด vacuoles และ fat droplets ขึ้นภายใน cytoplasm ผลที่ได้จาก การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า แแคด เมียมคลอไรด์มีพิษโดยตรงต่อ เชลล์ตับอิสระของหมูขาวใหญ่ และ เชลล์ตับอิสระนี้อาจนำมาใช้ เป็นแบบทดลองที่เหมาะสม เพื่อทดสอบความ เป็นพิษต่อตับซึ่ง เกิดจากสารพิษตัวอื่น ๆ ได้ เป็นอย่างดี

Thesis Title                  Effects of Cadmium Chloride on Isolated Rat  
                                  Hepatocytes.

Name                          Miss Pornpimol Chinaratanaavetch

Thesis Advisor               Assistant Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.

Department                   Pharmacology

Academic Year               1984

#### Abstract

Suspension of hepatocytes were isolated from the livers of male Wistar rats (200-250 g) using the method of Berry and Friend (1969) with some modification by Stacey and Priestly (1978). Cell yields of 2-4 g cell wet weight was routinely obtained with the trypan blue exclusion index of greater than 90%. Morphological features, plasma membrane integrity and metabolic capability which were used as the criterion for cell viability were verified. The utility of isolated rat hepatocytes as a model system to determine the hepatotoxicity of cadmium chloride was studied. Isolated rat hepatocytes were incubated with varying cadmium concentrations (1-100  $\mu$ M) for 30 minutes. The integrity of cell membrane, as measured by loss of intracellular potassium, leakage of alanine aminotransferase and decrease in trypan blue exclusion index, was significantly affected by cadmium in a dose-dependent manner. Cadmium also inhibited gluconeogenesis which was used as criteria for metabolic capability. For morphological studies, the cytotoxic changes under the transmission electron microscopic examination were the presence of cytoplasmic vacuoles and fat droplets (30 min-incubation with 5  $\mu$ M cadmium). The results of this study suggested

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 Dhumm-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
<b>CHAPTER</b>	
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 <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> .....	62
10. The Effect of cadmium chloride on cell membrane integrity of isolated rat hepatocytes. C. The release of cytoplasmic enzyme (ALT).....	63

	Page
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