รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลและกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

The effects and the mechanisms of okadaic acid on architectural synaptic changes of hippocampal neuron

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802311

สัญญาเลขที่ 133/2558

รายงานวิจัยฉบับบสมบูรณ์

โครงการ

ผลและกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

The effects and the mechanisms of okadaic acid on architectural synaptic changes of hippocampal neuron

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

20 ธันวาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 133/2558

(Acknowledgements)

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 133/2558)

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกมีผลต่อการแสดงออกของ synaptic protein ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัสแต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกก็ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัสต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ synaptic protein โดยทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.1 uM เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบค่าการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ทดสอบการแสดงออกของยีน Rho, Rho-associated protein kinase (ROCK), postsynaptic density-95 (PSD-95), และ activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 uM) มีผลลดอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังจากถูกบ่มเป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง และมีผลยับยั้งการแสดงออกของ synaptic genes ทั้ง 2 ชนิด คือ PSD-95 ที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง และ Arc ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองโดยให้กรดโอคาดาอิกร่วมกับตัวยับยั้งการทำงานของ Rho-associated kinases (Y27632) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Arc และ PSD-95 ได้ โดยที่ตัวยับยั้งดังกล่าวไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสอง อีกทั้งกรดโอคาดาอิกก็ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน Rho และ ROCK อีกด้วย ผลการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่ากรดโอคาดาอิกมีผลยับยั้งการแสดงออกของ synaptic genes ทั้ง Arc และ PSD-59 โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของ Rho-associated protein kinase แบบไม่มีผลต่อปริมาณยีนรวมภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส บ่งชี้ว่ากรดโอคาดาอิกกระตุ้น ROCK แบบ non-genomic pathway จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับกรดโอคาดาอิกเข้าสู่สมองเป็นเวลานานมีผลกระทบต่อการบวนการ synaptic plasticity และอาจจะมีผลต่อการสร้างความจำ โดยมีกลไกการทำงานแบบขึ้นกับ Rho/ROCK pathway

Abstract

Previous study showed that okadaic acid affected to the expression of synaptic protein on hippocampal neuronal culture. However, the signaling mechanism of OA on the synaptic protein expression is still unknown. Therefore, the present study aims to demonstrate the signaling mechanism of OA on the expression of synaptic gene by incubation of hippocampal neuron with 0.1 uM OA for 0-96 hours. Then, the cell viability was demonstrated by using MTT assay. To demonstrate the expression of genes including Rho, Rho-associated protein kinase (ROCK), postsynaptic density-95 (PSD-95), and activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) by real-time polymerase chain reaction. The result shows that low concentration of OA (0.1 uM) decreases percent cell viability of OA-treated hippocampal neuron for 72 and 96 hours. Moreover, OA significantly decrease arc and PSD-95 genes for 96 and 72 and 96, respectively. In singling mechanism study, OA treated cell were combined with specific inhibitor of Rho-associated kinases (Y27632). The result shows that OA fails to inhibit the expression of Arc and PSD-95 genes in present of Rock inhibitor, which inhibitor alone has no effect on 2 genes expressions. Total Arc and PSD-95 mRNA were not change in OA-treated cell. This study suggested that OA inhibit the expression of Arc and PSD-95 via the activation of Rho-associated kinases in non-genomic dependent pathway. This finding showed that prolong OA exposure to hippocampal neuron affect on synaptic plasticity and may be on the memory function via Rho/ROCK dependent pathway.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	2
1.4 แนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. เนื้อเรื่อง	
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
2.2 ผลการทดลอง	6
3. อภิปราย/วิจารณ์	
3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน	12
3.2 อภิปรายผลการทดลอง	12
4. สรุปและเสนอแนะ	13
5. ผลผลิต	13
บรรณานุกรม	14
ประวัติคณะผู้วิจัย	16

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 แสดงร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิก 6
รูปที่ 2 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน Arc หลังจากได้รับกรดโอคาดาอิก ในเซลล์เพาะเลี้ยง hippocampus 7
รูปที่ 3 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน PSD-95 หลังจากได้รับกรดโอคาดาอิก ในเซลล์เพาะเลี้ยง hippocampus 8
รูปที่ 4 กรดโอคาดาอิกยับยั้งการสังเคราะห์ยีน Arc ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ผ่านการกระตุ้น Rho/ROCK signaling pathway 10
รูปที่ 5 กรดโอคาดาอิกยับยั้งการสังเคราะห์ยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ผ่านการกระตุ้น Rho/ROCK signaling pathway 11

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Arc	activity-regulated cytoskeleton associated protein
CO2	Carbon dioxide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSP	diarrhetic shellfish poisoning
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ml	milliliter
MTT	**m**ethyl-**t**hiazolyl-**t**etrazolium
nm	nanometer
OA	okadaic acid
PBS	phosphate buffer saline
PSD-95	postsynaptic density-95
ROCK	Rho-associated protein kinase
uM	micromolar

1. บทนำ (introduction)

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน

ในปัจจุบันได้มีการตระหนักถึงภาวะท้องร่วงที่เกิดจากการบริโภคหอยทะเล โดยได้นำเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารปนเปื้อนและพบว่ามีกรดโอคาดาอิก (okadaic acid) เป็นองค์ประกอบสำคัญ งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกมีผลต่อการแสดงออกของ synaptic genes ที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ N2R ซึ่งเป็น isoform ของ NMDA receptor และ ยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งการลดลงของยีนทั้งสองมีผลต่อกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ กล่าวคือ หากมีการยับยั้งการการแสดงออกของ PSD-95 ส่งผลให้สัตว์ทดลองสูญเสียความจำ นอกจากนี้หากทำการยับยั้งการทำงานของ NMDA receptor ด้วยการบ่ม inhibitor ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ hippocampal slice culture พบว่า ไม่เกิดกระบวนการ long-term potentiation (LTP) หลังจากกระตุ้นด้วยคลื่นไฟฟ้าที่ความถี่สูง บ่งชี้ว่า N2R และ PSD-95 มีผลโดยตรงต่อกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน PSD-95 ก็ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กรดโอคาดาอิก (okadaic acid) คือสารพิษที่เป็นส่วนประกอบหลักของพิษท้องร่วงจากอาหารทะเล (diarrhetic shellfish poisoning : DSP) โดยเฉพาะหอยทะเล เช่น หอยกาบ หอยแมลงภู่ หอยแครง หอยนางรม หอยเชลล์ (Blanco et al., 2003) พิษในหอยทะเลเกิดขึ้นเมื่อหอยกินสาหร่ายเซลล์เดียวไดโนแฟลเจลเลตชนิดมีพิษ (toxicgenic dinoflagellate) หอยจะดูดซึมสารพิษและสะสมไว้ในตัว โดยเก็บไว้ได้นานถึง 1 เดือน สารพิษนี้จะไม่เป็นอันตรายต่อหอย แต่เมื่อคนรับประทานหอยที่มีสารพิษสะสมอยู่ในปริมาณมาก จะเกิดอาการพิษจากหอย ที่สำคัญได้แก่ อาการท้องร่วง (Blanco et al., 2003) เนื่องจากกรดโอคาดาอิก เป็นสารที่ละลายได้ในไขมัน ทำให้ผ่าน blood brain barrier เข้าสู่สมองได้ และงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่ากรดโอคาดาอิกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Rajasekar et al., 2013; Zhang and Simpkins, 2010; Tapia et al., 1999) เนื่องจากกรดโอคาดาอิกมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส ชนิด 1 และ 2A ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของกระบวนการ dephospholylation ของโปรตีน tau ดังนั้นกรดโอคาดาอิกจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ tau hyperphosphorylation ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่พบในโรคอัลไซเมอร์ (Zhang and Simpkins, 2010; Tapia et al., 1999) นอกจากนี้การได้รับกรดโอคาดาอิกจำนวนมากหรือเป็นเวลานานกระตุ้นการตายของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสแบบ apoptosis ชนิดขึ้นกับการทำงานของไมโตรคอนเดรีย โดยยับยั้งการทำงานของกลไกภายในเซลล์ชนิด mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways (MAPK signaling pathway) (Kim et al., 2000; Suuronen et al., 2000; Rundén et al., 1998) ยิ่งไปกว่านั้นกรดโอคาดาอิกมีฤทธิ์จำเพาะต่อ granule cell ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่ในการสร้างความจำ (Rundén et al., 1998) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองสูญเสียการเรียนรู้และความจำจากการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze (Kamat et al., 2011) ไม่เพียงแต่สัตว์ทดลองเท่านั้น แต่

ยังพบว่าคนที่รับประทานอาหารทะเลที่มีพิษ toxicgenic dinoflagellate ชนิด กรดโอคาดาอิดเจือปนจะมีภาวะของการสูญเสียความจำที่รุนแรงกว่าผู้ที่ไม่ได้รับพิษดังกล่าว (Rajasekar et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามยังกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิก ต่อกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสก็ยังไม่มีการศึกษา เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ถือเป็นกระบวนการสำคัญที่บ่งชี้ถึงสมดุลการทำงานของเซลล์ประสาท และเป็นตำแหน่งของกระบวนการสร้างความจำ หากโครงสร้างบริเวณดังกล่าวแข็งแรง ก็จะสามารถเกิดกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งถือเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาผลและกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของกรดโอคาดาอิกต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อกระบวนการสร้างไซแนปส์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส
2. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของ synaptic proteins ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส
3. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อขนาดและรูปร่างของไซแนปส์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส
4. ศึกษากลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของกรดโอคาดาอิกต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไซแนปส์ในเซลล์เพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส

1.3.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยทั้งหมดในโครงการนี้ครอบคลุมการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐาน

การได้รับพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลน่าจะมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์นำไปสู่การยับยั้งกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทอิปโปแคมปัส

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากกรดโอคาดาอิกสามารถผ่านเข้าสู่สมองได้และยังเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ แก่เซลล์ประสาทได้แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ของเซลล์

ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำกลไกการสร้างความจำ ซึ่งหากมีผลโดยตรงจะนำไปสู่การค้นพบถึงข้อควรระวังในการบริโภคหอยทะเล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ ทำให้เข้าใจผลและกลไกของพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลชนิดกรดโอคาดาอิกต่อการกลไกต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณไซแนปส์ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ ซึ่งผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้จะมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อหาวิธีการป้องกันพิษท้องร่วงจากอาหารทะเล นำไปสู่การป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่พบในโรคทางระบบประสาทอีกด้วย

2. เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ทำการทดลอง เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลอง ณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2.1.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary hippocampal neuron (Cat. Number A10841-01) ใน Neurobasal medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) ที่ประกอบด้วย 200 mM GLUTAMAX™-I, B27 Supplement ตามที่ระบุในเอกสารแนะนำ ใน poly-D-lysine-coated 6-well plate (Corning, Corning, NY, USA) ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และความเข้มข้น CO2 ที่ 5%

2.1.2 การวัดการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron (MTT assay)

การวัดเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron ด้วยวิธี MTT assay มีหลักการ คือ สารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) จะถูกเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นผลึกสีน้ำเงิน (formazan crystal) ในเซลล์ที่มีชีวิตโดยอาศัยการทำงานของเอมไซม์ในไมโตคอนเดรีย ในขณะที่เซลล์ตายจะไม่สามารถเปลี่ยนสีสารละลาย MTT ได้ วิธีการทดลอง เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron ใน 96-well plate (Corning) ให้มีความหนาแน่นประมาณ 10,000 เซลล์ ต่อ 1 well จากนั้นให้ กรดโอคาดาอิก (Sigma) ความเข้มข้น 10 uM ที่เวลาต่างกันตั้งแต่ 0-96 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด culture media ออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.01M phosphate buffer saline (PBS) ก่อนที่จะบ่มด้วยสารละลาย MTT เป็นเวลา 3 ชั่งโมง จากนั้นทำการละลาย (solubilization) formazan crystal ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm

2.1.3 Quantitative-real time PCR (qRT-PCR)

นำเซลล์เพาะเลี้ยง Primary hippocampus neurons ที่ได้จากการทดลองมาสกัด RNA โดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) แล้ววัดความเข้มข้นของ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการคำนวณเพื่อปรับปริมาณของ RNA ให้เท่ากันทุกกลุ่ม แล้วเปลี่ยนกลับไปเป็น cDNA ด้วยเครื่อง thermocycle โดยใช้ high capacity cDNA reverse transcription kit (Apply Biosystems, CA, USA) จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้แก่ Arc และ PSD-95 กับ ยีน housekeeping (GAPDH) ด้วยเครื่อง real-time PCR (Applied biosystems) โดยใช้ TaqMan® gene expression assay kit (Apply Biosystems) ซึ่งประกอบด้วย customized primer design และ DNA-probe ที่ถูกติดฉลากด้วย FAMTM dye และคำนวณปริมาณ

การแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี threshold cycle (Ct method) โดยใช้ SDS software v. 1. 4 (Apply Biosystems)

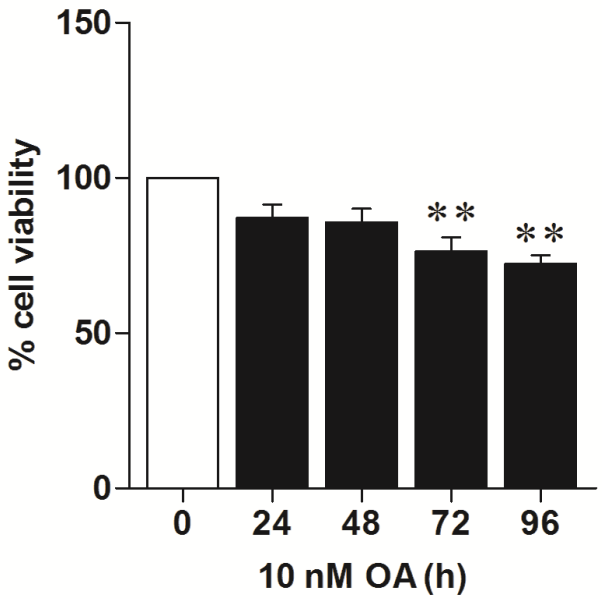
2.1.4 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means ± SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

2.2 ผลการทดลอง

2.2.1 **ผลของเวลาในการบ่มกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampal**

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลา 24 48 72 96 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0) และลดลงเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกต่อเนื่องเป็นเวลา 96 ชั่วโมง สรุปได้ว่า กรดโอคาดาอิกทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงตายแบบขึ้นกับเวลา



รูปที่ 1 แสดงร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิก

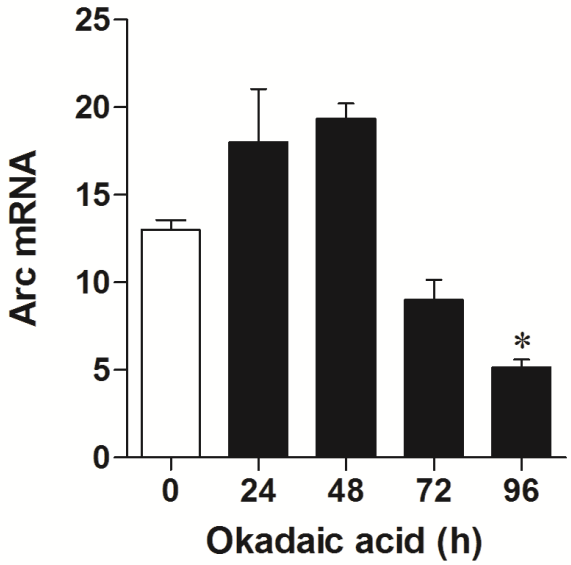
ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 10 uM เป็นเวลา 24 48 72 หรือ 96 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาค่าการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บ่มด้วยกรดโอคาดาอิด (0 ชั่วโมง)

** $P<0.05$ (n=3)

2.2.2 ผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน Arc

เนื่องจากโปรตีน Arc เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการคงสภาพของ synapse หลังจากเข้าสู่กระบวนการ synaptic plasticity และการขาดโปรตีนและ/หรือ ยีน Arc ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการ synaptic plasticity และทำให้สัตว์สูญเสียความจำอีกด้วย ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีน Arc จึงสามารถใช้บ่งชี้กระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ได้

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน Arc ด้วยวิธี qRT-PCR โดยบ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่เวลาต่างกัน คือ 24 48 72 หรือ 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด RNA เพื่อนำไปวัดการแสดงออกของยีน Arc โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน Arc ด้วยเทคนิค qRT-PCR ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 96 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน Arc ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ว่ากรดโอคาดาอิกอาจจะมีผลยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน Arc หลังจากการได้รับเป็นเวลานาน



รูปที่ 2 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน Arc หลังจากได้รับกรดโอคาดาอิก ในเซลล์เพาะเลี้ยง hippocampus

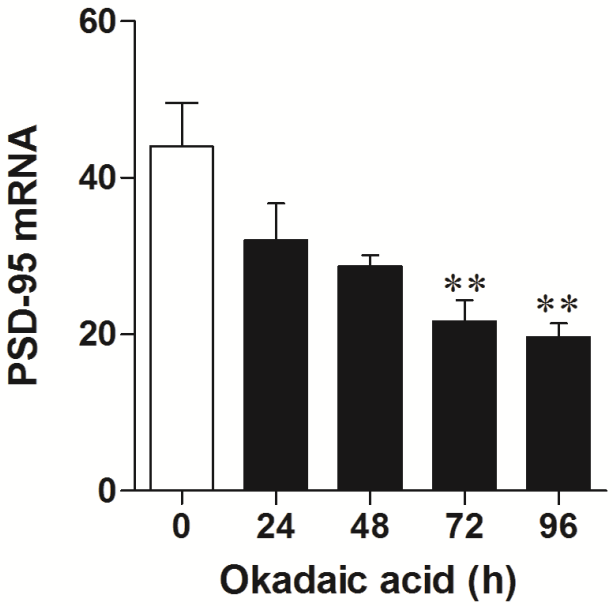
ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 10 uM เป็นเวลา 24 48 72 หรือ 96 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัด RNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Arc ภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ด้วยวิธี qRT-PCR

* $P<0.05$ n=3

2.2.3 ผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน PSD-95

มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า knockdown ยีน PSD-95 ทำให้สัตว์ทดลองสูญเสียการเรียนรู้และความจำ งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิก ต่อการแสดงออกของยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส โดยการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 10 uM เป็นเวลา 24 48 72 หรือ 96 ชั่วโมง ก่อนทำการสกัด RNA เพื่อไปศึกษาการแสดงออกของยีน PSD-95 ด้วยวิธี qRT-PCR

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง ลดการแสดงออกของยีน PSD-95 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับกรดโอคาดาอิก จากผลการทดลองเป็นไปได้ว่าการได้รับกรดโอคาดาอิกเป็นเวลานานมีผลยับยั้งการเรียนรู้และความจำจากการยับยั้งการสังเคราะห์ยีน PSD-95



รูปที่ 3 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน PSD-95 หลังจากได้รับกรดโอคาดาอิก ในเซลล์เพาะเลี้ยง hippocampus

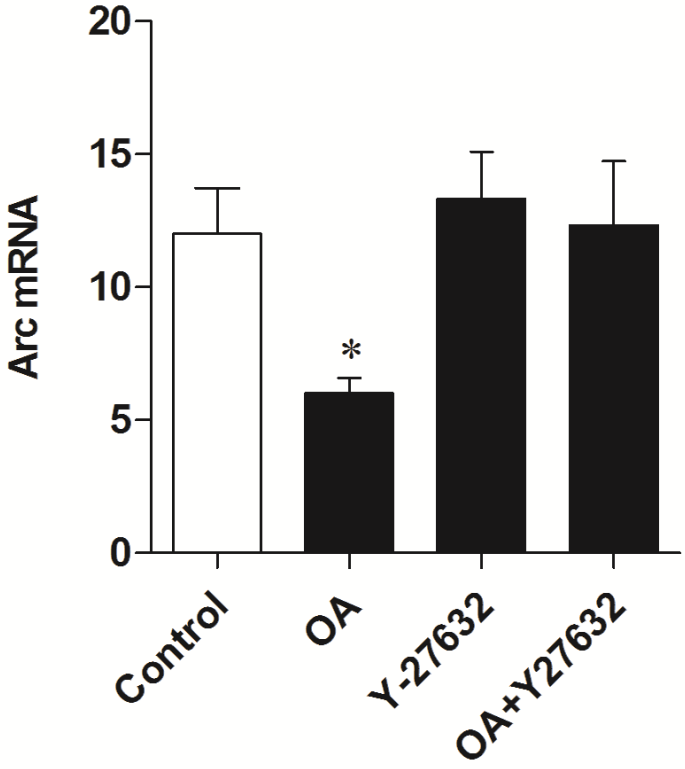
ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 10 uM เป็นเวลา 24 48 72 หรือ 96 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัด RNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน PSD-95 ภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ด้วยวิธี qRT-PCR

** $P<0.005$ n=3

2.3.4 กลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในการยับยั้งการสังเคราะห์ยีน Arc

มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า signaling pathway ที่มีบทบาทควบคุมกระบวนการ synaptic plasticity ที่สำคัญคือ Rho/ROCK signaling pathway โดย pathway นี้เริ่มต้นจากการกระตุ้นโปรตีน Rho จากนั้น active Rho จะไปกระตุ้นโปรตีน ROCK และกระตุ้น LIMK อย่างต่อเนื่องตามลำดับ ซึ่ง active LIMK จะเหนี่ยวนำให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีน cofilin ซึ่ง phospho-cofilin มีบทบาทในการคงเสถียรภาพของโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญ ภายใต้การเกิด synaptic plasticity ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ดังนั้น เป็นไปได้หรือไม่ว่า กรดโอคาดาอิกยับยั้งการสังเคราะห์ยีน Arc ผ่านการกระตุ้น Rho/Rock signaling pathway

การทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Arc ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus โดยการบ่มกรดโอคาดาอิกร่วมกับตัวยับยั้งการทำงานของ ROCK คือ Y27632 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีผลลดการแสดงออกของยีน Arc ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อให้กรดโอคาดาอิกร่วมกับ Y27632 กลับไม่มีผลลดการแสดงออกของยีน Arc เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกลดการแสดงออกของยีน Arc ผ่านการกระตุ้น ROCK



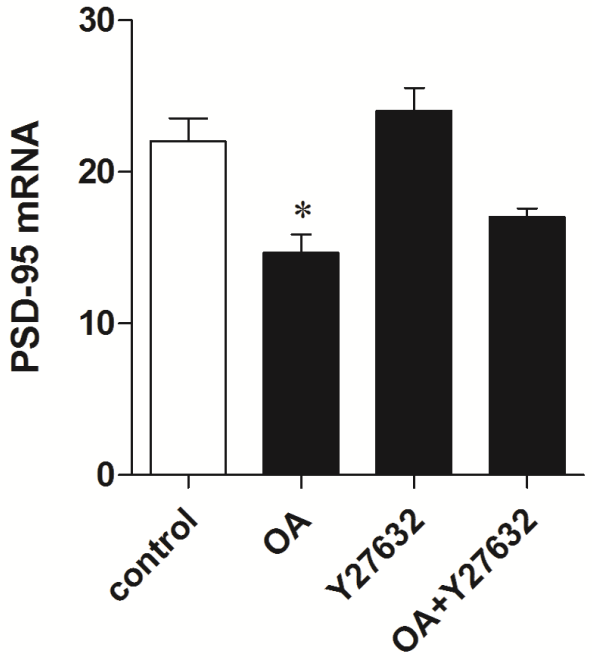
รูปที่ 4 กรดโอคาดาอิกยับยั้งการสังเคราะห์ยีน Arc ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ผ่านการกระตุ้น Rho/ROCK signaling pathway

หลังจากการ subculture เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาบ่มด้วยกรดโอคาดาอิก หรือ กรดโอคาดาอิกร่วมกับ 1 uM Y27632 หรือ 1 uM Y27632 อย่างเดียว เป็นเวลา 96 ก่อนนำไปสกัด RNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Arc ด้วยวิธี qRT-PCR

* $P<0.05$ n=3

2.3.5 กลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในการยับยั้งการสังเคราะห์ยีน PSD-95

การทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus โดยการบ่มกรดโอคาดาอิกร่วมกับตัวยับยั้งการทำงานของ ROCK คือ Y27632 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีผลลดการแสดงออกของยีน PSD-95 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อให้กรดโอคาดาอิกร่วมกับ Y27632 กลับไม่มีผลลดการแสดงออกของยีน Arc เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกลดการแสดงออกของยีน PSD-95 ผ่านการกระตุ้น ROCK



รูปที่ 5 กรดโอคาดาอิกยับยั้งการสังเคราะห์ยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampus ผ่านการกระตุ้น Rho/ROCK signaling pathway

หลังจากการ subculture เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาบ่มด้วยกรดโอคาดาอิก หรือ กรดโอคาดาอิกร่วมกับ 1 uM Y27632 หรือ 1 uM Y27632 อย่างเดียว เป็นเวลา 96 ก่อนนำไปสกัด RNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน PSD-95 ด้วยวิธี qRT-PCR

* $P<0.05$ n=3

3. อภิปราย/วิจารณ์

3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ

การทดลองครั้งนี้ได้มีการปรับวิธีการทดลองโดยการตัดการศึกษาขนาดของ dendritic spine ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอิเล็กตรอนออกเนื่องจากมีมีการชำรุดของอุปกรณ์ไม่สามารถใช้งานได้ ผู้วิจัยจึงได้นำงบประมาณส่วนดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเป็นหมายด้วยวิธี qRT-PCR แทน และได้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ อีดทั้งเป็นการทดลองที่ทำได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้สามารถดำเนินการปิดโครงการวิจัยได้ตามกำหนดเวลาของการขยายเวลา

3.2 อภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดลองครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการได้รับกรดโอคาดาอิดเป็นเวลานานจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ synapse โดยไปรบกวนการแสดงออกของยีน Arc และ ยีน PSD-95 ซึ่งน่าจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองด้วย กล่าวคือ หากเซลล์ประสาทไม่มีโปรตีนทั้งสองชนิดนี้แล้ว จะมีผลทำให้เซลล์ไม่เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญ ของการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010; Chamniansawat and Chongthammakun, 2012; Lamprecht and LeDoux, 2004; Steward and Worley, 2002) อีกทั้งยังมีงานวิจัยจำนวนมากได้รายงานว่าในสัตว์ทดลองที่ทำการ knockdown ยีน Arc และ PSD-95 จะสูญเสียการเรียนรู้และการสร้างความจำโดยเฉพาะ spatial memory ซึ่งเป็นความจำที่จำเพาะของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Guzowski et. al, 2000; Bustos et al., 2014) งานวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวว่า การได้รับกรดโอคาดาอิดมีผลทำให้สูญเสียความจำระยะยาว และอาจนำไปสู่โรคอัลไซด์เมอร์ได้ในที่สุด (Zhang and Simpkins, 2010; Rajasekar et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Arc และ PSD-95 ก็ยังไม่มีรายงาน ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิก และพบว่ากรดโอคาดาอิกกระตุ้น signaling pathway ชนิด Rho/ROCK pathway ซึ่งเป็น pathway หลักของการควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างบริเวณ synapse ด้วย โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า หากทำการยับยั้ง Rho/ROCK pathway ด้วยการให้ specific Rho-associated protein kinase inhibitor จะไปยับยั้งการการต่อสายของ actin และทำไม่สามารถเพิ่มจำนวน dendritc spine หลังจากการกระตุ้นด้วยคลื่นไปฟ้าความถี่สูง (Huang et al., 2014) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึสามารถสรุปผลได้ว่ากรดโอคาดาอิก มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน Arc และ PSD-95 โดยผ่านการกระตุ้น Rho/ROCK signaling pathway ซึ่งน่าจะนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของในการป้องกันฤทธิ์ของกรดโอคาดาอิกต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้จะแสดงให้เห็นแล้วว่ากรดโอคาดาอิกกระตุ้น Rho/Rock pathway แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อยอดถึง signaling pathway อื่นๆ ร่วมด้วยเพื่อเป็นการยืนยันความชัดเจนของผลการทดลองต่อไป

4. สรุปและเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเมื่อได้รับกรดโอคาดาอิกเป็นเวลานานมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน Arc และ PSD-95 ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส โดยผ่านการกระตุ้น Rho/ROCK signaling pathway และน่าจะเป็นกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกในการยับยั้งการสร้างความจำในสมอง ซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

5. ผลผลิต ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้กำลังอยู่ระหว่างการเรียบเรียงเพื่องการตีพิมพ์ลงในวารสารของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บรรณานุกรม

Blanco J, Reyero MI, Franco J. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel Mytilus galloprovincialis. Toxicon 2003; 42: 777-784.

Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. Neurosci Lett 2010; 470: 49–54.

Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med. 2012; 44: 403-411.

Hou H, Li B, Zhang Z, Xue C, Yu G, Wang J, Bao Y, Bu L, Sun J, Peng Z, Su S. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. Food Chem 2012; 135: 1432-1439.

Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. J Neurosci 2000; 20: 3993–4001.

Iscru E, Goddyn H, Ahmed T, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Balschun D. Improved spatial learning is associated with increased hippocampal but not prefrontal long-term potentiation in mGluR4 knockout mice. Genes Brain Behav 2013 (in press)

Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. Pharmacol Biochem Behav 2011; 100: 311-319.

Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science1982; 218: 433–443.

Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. Nat Rev Neurosci 2004; 5(1): 45–54.

Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. Brain Res 2007; 1132: 10–19.

Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? Neurobiol Learn Mem 2002; 78(3): 508–527.

Tapia R, Peña F, Arias C. Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. Neurochem Res 1999; 24: 1423-1430.

Zhang Z, Simpkins JW. An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. Brain Res 2010; 1359: 233-246.

Rundén E, Seglen PO, Haug FM, Ottersen OP, Wieloch T, Shamloo M, Laake JH. Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAP kinase-dependent mechanism. J Neurosci 1998; 18: 7296-7305.

Rajasekar N, Dwivedi S, Tota SK, Kamat PK, Hanif K, Nath C, Shukla R. Neuroprotective effect of curcumin on okadaic acid induced memory impairment in mice. Eur J Pharmacol 2013;715: 381-394.

Kim DH, Hong HN, Lee JH, Park HS. Okadaic acid induces cycloheximide and caspase sensitive apoptosis in immature neurons. Mol Cells 2000; 10: 83-89.

Suuronen T, Kolehmainen P, Salminen A. Protective effect of L-deprenyl against apoptosis induced by okadaic acid in cultured neuronal cells. Biochem Pharmacol 2000; 59:1589-1595.

Bustos FJ, Varela-Nallar L, Campos M, Henriquez B, Phillips M, Opazo C, Aguayo LG, Montecino M, Constantine-Paton M, Inestrosa NC, van Zundert B. PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors. PLoS One. 2014 Apr 4;9(4):e94037.

Huang L, Zhao LB, Yu ZY, He XJ, Ma LP, Li N, Guo LJ, Feng WY. Long-term inhibition of Rho-kinase restores the LTP impaired in chronic forebrain ischemia rats by regulating GABAA and GABAB receptors. Neuroscience. 2014 Sep 26;277:383-91.