รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลต่อกระบวนการสร้างความจำ

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

30 ตุลาคม 2557

รหัสโครงการ 2557A10862014

สัญญาเลขที่ 1/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลต่อกระบวนการสร้างความจำ

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 เลขที่สัญญา 1/2557

Acknowledgments

This work was financially supported by the Higher education Commission (Grant no.1/2557)

บทคัดย่อ

กรดโอคาดาอิด คือสารพิษที่สะสมอยู่ในสัตว์ทะเลชนิดมีเปลือก เป็นสาเหตุของพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลในคน มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซน์ฟอสฟาเทส ชนิด 1A และ 2A มีการรายงานว่าการให้กรดโอคาดาอิก เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hyperphosphorylation ของโปรตีน tau ส่งผลให้สตว์ทดลองสูญเสียความจำ ในภาวะปรกติฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาท เป็นไปได้หรือไม่ว่ากรดโอคาดาอิกทำให้ความจำและการเรียนรู้ลดลงอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสและเป็นสาเหตุของถาวะการสูญเสียความจำ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกโดยใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal นำมาบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกันเพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay ศึกษาการแสดงออกของ synaptic genes ด้วยวิธี real-time PCR และศึกษาปริมาณของเอสโตรเจนด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้นสูง (0.1 และ 1 uM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลดอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้นต่ำ (0.01 uM) อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีค่าร้อยละของการมีชีวิตประมาณ 70 และคงที่ไปถึง 120 ชั่วโมง นอกจากนี้การให้กรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 24 และ 96 ชั่วโมงลดการแสดงออกของยีน NR2 และ PSD-95 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ และเป็นการลดลงแบบขึ้นกับเวลา การให้กรดโอคาดาอิกส่งเป็นเวลา 120 ชั่วโมง มีแนวโน้มลดปริมาณของเอสโตนเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า กรดโอคาดาอิกมีลดการแสดงออกของ synaptic gene (NR2 และ PSD-95) ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความจำและการเรียนรู้

Abstract

Okadaic acid (OA), a naturally occuring marine toxin, causes diarrhetic shellfish poison (DSP) in human. OA is an inhibitor of protein phosphatase 1A and 2A. Previous study showed that OA induced tau hyperphosphorylaton, leading to loss of learning and memory. Normally, estrogen has an important role on an enhancement of memory formation. It is probable that OA-induced memory loss may associate with estrogen synthesis in hippocampal neurons. By using H19-7 hippocampal neuron, the effect of concentration and incubation time of OA on cell viability was studied by MTT assay. The synaptic genes expression was study by real-time PCR. The secretion of estrogen was measured by ELISA. The result showed that the incubation of OA at high concentration (0.1 and 1 uM) for 24 h significant decreased the viability of cell compared with the control. After 48 h treatment, 0.01 uM OA significantly decreased cell viability. The decrease of cell viability is approximately 70% at 48h and remainstable until 120 h. Moreover, OA treatment decreased the expression of NR2 and PSD-95 genes at 24 and 92 h, respectively. Finally, treatment of OA tented to decrease the estrogen secretion but was not statistically significant. The present study concluded that OA decreased synaptic gene expression, which may cause of memory loss.

สารบัญเรื่อง

หน้า

1. บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน 1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 1
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย 2
1.4 แนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2. เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย 4
2.1.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron 4
2.1.2 การวัดการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (MTT assay) 4
2.1.3 Quantitative-real time PCR (qRT-PCR) 4
2.1.4 อิไลซ่า (ELISA) 5
2.1.5 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล 5
2.2 ผลการทดลอง
2.2.1 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของ NR2 subunit ของ NMDA Receptor ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง 19-7 hippocampal 6
2.2.2 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal 7
2.2.3 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron 8
2.2.4 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์ BDNF ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron 9
2.2.5 ผลของเวลาในการบ่มกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal 10
2.2.6 ผลของความเข้มข้นของกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 Hippocampal 11

3. อภิปราย/วิจารณ์

3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน 12
3.2 อภิปรายผลการทดลอง 12

4. สรุปและเสนอแนะ 13

5. ผลผลิต 13

หน้า

บรรณานุกรรม 14

ภาคผนวก

บทความวิจัยเรื่องเต็มที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในงานประชุม (Proceeding) กายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 37 เรื่อง The effect of Okadaic acid on the synthesis of estrogen in hippocampal neuron 17

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กราฟแสดงสัดส่วนการแสดงออกของ NR2 subunit ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิก ที่เวลา 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง 6

รูปที่ 2 กราฟแสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีน PSD-95 ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิก เป็นเวลา 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง 7

รูปที่ 3 กราฟแสดงปริมาณเอสโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิก เป็นเวลา 0 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง 8

รูปที่ 4 แสดงปริมาณการหลั่งของ BDNF จากเซลล์ประสาทที่ทำการเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่างกัน คือ 0 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง 9

รูปที่ 5 แสดงร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่เวลาต่างกัน คือ 0 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง 10

รูปที่ 6 แสดงร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.001 0.01 0.1 หรือ 1 uM 11

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
E2	estrogen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
g	gram
h	hour
HRP	horseradish peroxidase
IL-6	Interleukin-6
ml	milliliter
ng	nanogram
nm	nanometer
OA	Okadaic acid
PSD-95	postsynaptic density-95
pg	picrogram
uM	micromolar

1. บทนำ (Introduction)

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน

กรดโอคาดาอิก (okadaic acid) คือสารที่ปนเปื้อนอยู่ในสัตว์ทะเลประเภทมีเปลือก ได้แก่ กุ้ง ปู และหอย ตัวของหอยทะเล ซึ่งเกิดจากการที่กุ้ง ปู และ หอย กินสาหร่ายเซลล์เดียวไดโนแฟลเจลเลตชนิดมีพิษ (toxicgenic dinoflagellate) เข้าไปและไปสะสมอยู่ภายในโดยสารพิษนี้จะไม่เป็นอันตรายต่อตัวเอง แต่เมื่อคนรับประทานอาหารทะเลที่มีสารพิษสะสมอยู่ในปริมาณมาก จะเกิดอาการพิษจากอาหารทะเลซึ่งอาการที่พบบ่อย ได้แก่ พิษที่ทำให้เกิดท้องร่วง (diarrhetic shellfish poisoning) นอกจากนี้กรดโอคาดาอิกยังมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส ชนิด ชนิด 1 และ 2A ซึ่งปรกติจะทำหน้าที่เอาหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีน tau ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองจึงส่งผลให้ เกิดภาวะการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปรกติของโปรตีน tau (tau hyperphosphorylation) ซึ่งเป็นพยาธิสภาพสำคัญที่พบในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซด์เมอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าความรุนแรงของภาวะสมองเสื่อมมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ tau hyperphosphorylation ที่สะสมภายในเซลล์ประสาทอีกด้วย งานวิจัยของ Li และคณะ (2014) รายงานว่าการให้กรดโอคาดาโดยวิธีการ microinjection ลงไปที่สมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองพบว่า หนูทดลองมีความจำและการเรียนรู้ลดลงหลังจากทำการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน tau ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (p-tau) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ tau hyperphosphorylation ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะความจำเสื่อมในโรคอัสไซด์เมอร์

เป็นที่ทราบกันว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ เป็นไปได้หรือไม่ว่ากรดโอคาดาอิกอาจจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอสโตรเจนของเซลล์ประสาทอิปโปแคมปัส

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันการบริโภคอาหารทะเลเป็นที่นิยม เนื่องจากอาหารทะเลประกอบไปด้วยแหล่งโปรตีนคุณภาพสูง โปรตีนจากปลาทะเลและอาหารทะเลช่วยเสริมสร้างอีลาสติน และคอลลาเจน ซึ่งช่วยให้ผิวยืดหยุ่นและช่วยผลัดเปลี่ยนเซลล์ เป็นอาหารชั้นดีสำหรับผิวและเส้นผม ผม (Hou et al., 2012) ยิ่งไปกว่านี้ อาหารทะเลยังประกอบไปด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย ที่รู้จักกันดี คือโอเมกา-3 ซึ่งพบมาก ในปลาทะเลน้ำลึก และไอโอดีนที่มีมากในหอยทะเล อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์ของการป่วยจากการบริโภคอาหารทะเลเพิ่มสูงขึ้น ที่สำคัญได้แก่ ภาวะอาหารเป็นพิษจากการบริโภคหอยทะเล เช่น หอยกาบ หอยแมลงภู่ หอยแครง หอยนางรม หอยเชลล์ พิษในหอยทะเลเกิดจากเมื่อหอยกินสาหร่ายเซลล์เดียวไดโนแฟลเจลเลตชนิดมีพิษเข้าไป (toxicgenic dinoflagellate) หลังจากนั้นหอยจะดูดซึมสารพิษและสะสมไว้ในตัว โดยเก็บไว้ได้นานถึง 1 เดือน สารพิษนี้จะไม่เป็นอันตรายต่อหอย แต่เมื่อคนรับประทานหอยที่มีสารพิษสะสมอยู่ในปริมาณมาก จะเกิดอาการพิษจากหอย อาการที่พบบ่อย ได้แก่ พิษที่ทำให้เกิดท้องร่วง (diarrhetic shellfish poisoning : DSP) ซึ่งเกิดจากสารพิษกรดโอคาดาอิก (okadaic acid) และ ไดโนไฟซิสทอกซิน (dinophysis toxin) (Blanco et al., 2003)กรดโอคาดาอิก เป็นสารที่ละลายได้ในไขมัน ทำให้ผ่าน blood brain barrier เข้าสู่สมองได้

กรดโอคาดาอิก มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า กรดโอคาดาอิกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส ชนิด 1 และ 2A (Tapia et al., 1999)ส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีนทาว (tau) มากอย่างผิดปรกติ (tau hyperphospholylation) ซึ่งในภาวะปรกติโปรตีน tau ทำหน้าที่คงเสถียรภาพให้กับไมโครทิวบูลในเซลล์ประสาท เมื่อถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจึงไม่สามารถจับกับไมโครทิวบูลได้ โปรตีน tau จึงหลุดออกแล้วมารวมกลุ่มกันอยู่ภายในเซลล์ประสาท เรียกว่า neurofibrillary tangle ซึ่งเป็นพยาธิสภาพอย่างหนึ่งที่พบในโรคอัลไซเมอร์ ส่งผลให้สัตว์ทดลองสูญเสียความจำจากการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze (Kamat et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามยังกลไกกรดโอคาดาอิกต่อกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสก็ยังไม่มีการศึกษา นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ากรดกรดโอคาดาอิกสามารถกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย (Kamat et al., 2011) ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันของระบบประสาทส่วนกลาง เมื่อเซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นจากสารพิษจะมีการตอบสนองโดยการลดปริมาณของ neurotrophic factor เพิ่มการหลั่ง inflammatory cytokines และ กระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระ มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า กรดโอคาดาอิกเพิ่มการหลั่ง interleukin-6 โดยการกระตุ้นกระบวนการ acetylation ของ transcription factor ชนิด NFkappaB (Suuronen et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามผลทางตรงของกรดโอคาดาอิกต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นเซลล์หลักของการสร้างความจำยังไม่มีรายงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งถือเป็นกลไกหลักต่อการคงรูปร่างและจำนวนของ synapse ให้อยู่ในภาวะสมดุลและสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลและกลไกของกรดโอคาดาอิกต่อกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

1.3 **วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย**

1.3.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของ glutamate receptor ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron
2. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของ PSD-95 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron
3. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron
4. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์ BDNF จากเซลล์เพาะเลี้ยง microglia

1.3.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยทั้งหมดในโครงการนี้ครอบคลุมการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อกลไกการสร้างความจำในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส และ เซลล์เพาะเลี้ยง microglia

1.4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐาน

การได้รับพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลน่าจะมีผลยับยั้งกระบวนการสร้างความจำทั้งทางตรง คือยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity และการสังเคราะห์เอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส และทางอ้อมคือการลดการหลั่งของ neurotrophic factor จากเซลล์ไมโครเกลียนำไปสู่สูญสียกระบวนการสร้างความจำในที่สุด

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากกรดโอคาดาอิกสามารถผ่านเข้าสู่สมองได้และยังเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ แก่เซลล์ประสาทได้แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลต่อกลไกการสร้างความจำ ซึ่งหากมีผลโดยตรงจะนำไปสู่การค้นพบถึงข้อควรระวังในการบริโภคหอยทะเล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ทำให้เข้าใจพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชราและนำไปสู่การค้นพบวิธีในการป้องกันรักษาต่อไป

โดยส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้จะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Proceedings of the Anatomy Association of Thailand ในชื่อเรื่อง The Effect of Okadaic Acid on the Synthesis of Estrogen in Hippocampal neurons

2. เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์H19-7 hippocampal neuron(ATCC® Number; CRL-2526™) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) ที่ประกอบด้วย 1.5 g/l sodium bicarbonate, 0.2 mg/ml G418,0.001 mg/ml puromycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) และ10% fetal bovine serum (Gibco) ในpoly-L-lysine-coated T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 25 cm^2 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 33°C และความเข้มข้นCO_2 ที่ 5% ภายใต้สภาวะแวดล้อมและอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron (cell proliferation) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย เซลล์เพาะเลี้ยงH19-7 hippocampal neuron จะถูกเลี้ยงด้วย estrogen-free culture medium ที่ประกอบด้วย 0.01%N2 supplement (Gibco) และ 10 ng/mlbasic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma) ใน 6-well plate (Corning) ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 39 °C และและความเข้มข้น CO_2 ที่ 5% ซึ่งในสภาวะนี้เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons จะถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) กลายเป็น mature hippocampal neuron

2.1.2 การวัดการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (MTT assay)

การวัดเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยวิธี MTT assay มีหลักการ คือ สารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) จะถูกเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นผลึกสีน้ำเงิน (formazan crystal) ในเซลล์ที่มีชีวิต โดยอาศัยการทำงานของเอมไซม์ในไมโตคอนเดรีย ในขณะที่เซลล์ตายจะไม่สามารถเปลี่ยนสีสารละลาย MTT ได้ วิธีการทดลอง เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron ใน 96-well plate (Corning) ให้มีความหนาแน่นประมาณ 10,000 เซลล์ ต่อ 1 well จากนั้นให้ กรดโอคาดาอิก (Sigma) ที่เวลาต่างกัน 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) จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเป้าหมายกับ 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 และคำนวณปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี threshold cycle (Ct method) โดยใช้ SDS software v. 1. 4 (Apply Biosystems)

2.1.4 อิไลซ่า (ELISA)

ทำการวัดความปริมาณ local estrogen ใน culture media โดยชุดวัดสำเร็จรูป estrogen ELISA kit (R&D systems) โดยเริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ลงใน 96-well plate ซึ่งมีการติดฉลากด้วย primary estrogen antibody หรือ primary BDNF antibody ไว้แล้ว จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย washing buffer ก่อนที่จะใส่สารที่ติดฉลากด้วย HRP ลงไปในแต่ละ well จากนั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนสีโดยการเติม chromogen substrate ลงไปใน well บ่มไว้เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปวัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของ estrogen ใน culture media โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (standard curve)

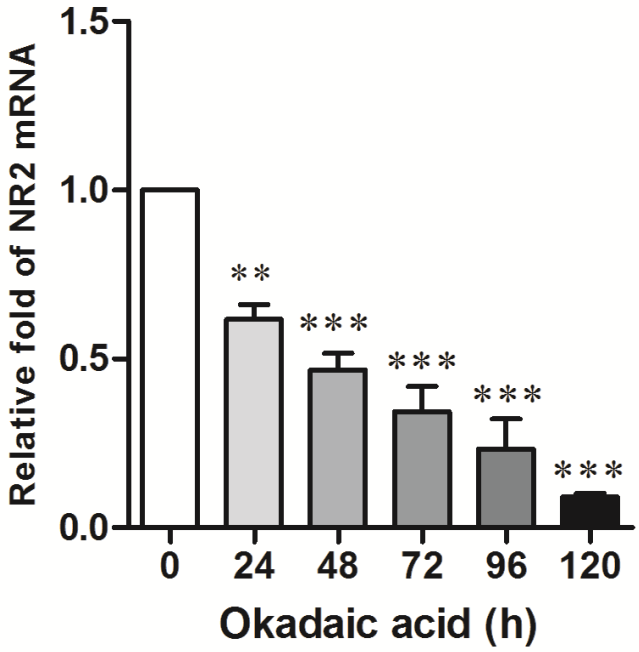
2.1.5 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล

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 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของ NR2 subunit ของ NMDA receptor ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง 19-7 hippocampal

ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน NR2 subunit ของ NMDA receptor ยีนในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยง ซึ่งหากมีการแสดงออกของยีน NR2 subunit เพิ่มขึ้นบ่งชี้ว่าเซลล์ประสาทมีการแปลี่ยนแปลงภายใต้กระบวนการ late-long-term potentiation ของกระบวนการสร้างความจำ โดยบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลาต่างกัน คือ 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นทำการสกัด RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีน NR2 subunit ด้วยวิธี real-time PCR ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า (รูปที่ 1) การแสดงออกของยีน ยีน NR2 subunit ลดลงอย่างมีนัยสัมคัญทางสถิติหลังจากที่ทำการบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และลดลงเป็นลำดับต่อเนื่องจนกระทั่งถึง 120 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่ม (0) ผลการทดลองนี้แสดงบ่งชี้ว่า กรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uMยับยั้งการแสดงออกของยีน NR2 subunit แบบขึ้นกับเวลา

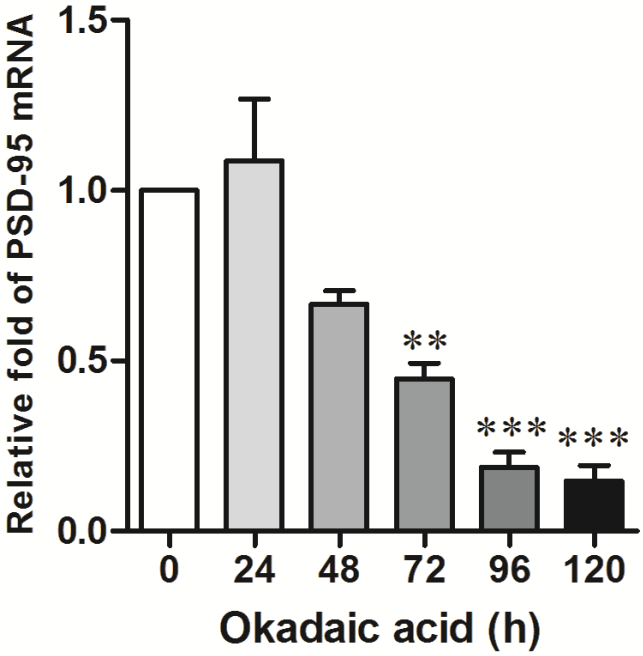


รูปที่ 1 กราฟแสดงสัดส่วนการแสดงออกของ NR2 subunit ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิก ที่เวลา 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

** P<0.005, *** P<0.001 (n=3)

2.2.2 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน PSD-95 ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยง ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน PSD-95 บ่งชี้ว่าเซลล์ประสาทมีการแปลี่ยนแปลงรูปร่างบริเวณ postsynapse ภายใต้กระบวนการ synaptic plasticity ของกระบวนการสร้างความจำ โดยทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลาต่างกัน คือ 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นทำการสกัด RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีน PSD-95 ด้วยวิธี real-time PCR ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการลดสัดส่วนของยีน PSD-95 หลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลา 72 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0) และลดลงต่ำสุดที่ 120 ชั่วโมง ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการให้กรดโอคาดาอิกเป็นเวลานาน (72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน) ยับยั้งการสังเคราะห์ยีน PSD-95 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำคัญของกระบวนการ synaptic plasticity หรืออาจกล่าวได้ว่าการให้กรดโอคาดาอิกมีผลไปยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ

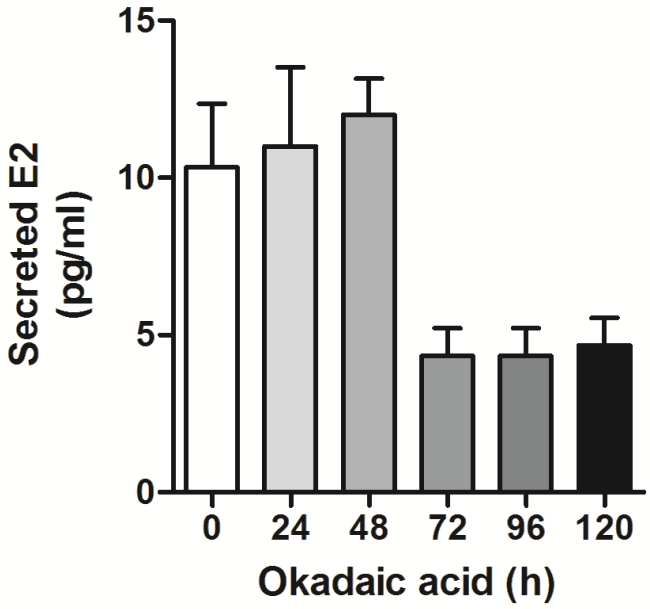


รูปที่ 2 กราฟแสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีน PSD-95 ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิก เป็นเวลา 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

** P<0.005, *** P<0.001 (n=3)

2.2.3. ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

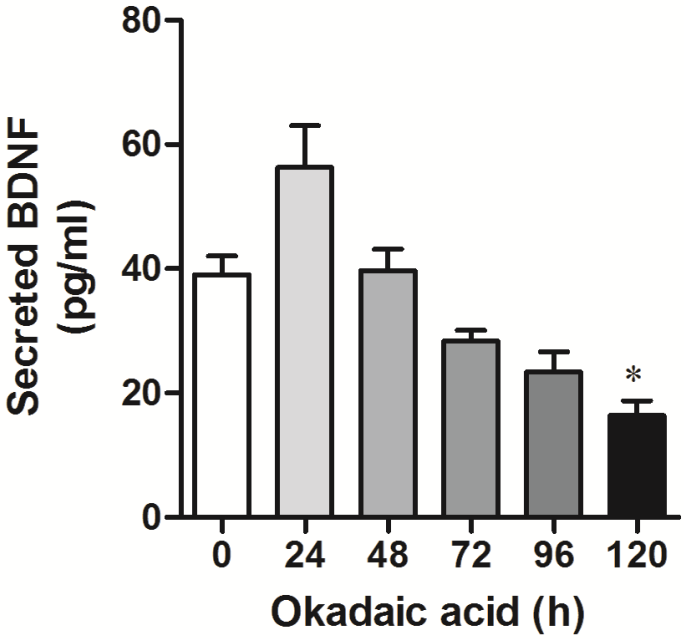
ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal โดยบ่มเซลล์ด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลา 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณของเอสโตรเจนด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่งโมง ปริมาณเอสโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม จากนั้นปริมาณเอสโตรเจนคล้ายจะลดลงหลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 72 96 และ 120 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0)



รูปที่ 3 กราฟแสดงปริมาณเอสโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากบ่มด้วยกรดโอคาดาอิก เป็นเวลา 0 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง (n=3)

2.2.4 ศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์ BDNF ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิกต่อการสังเคราะห์ BDNF จากเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal โดยบ่มเซลล์ด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลา 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณของ BDNF ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณ BDNF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 120 ชั่งโมง จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ากรดโอคาดาอิกยับยั้งการหลั่งของ BDNF แบบขึ้นกับเวลา

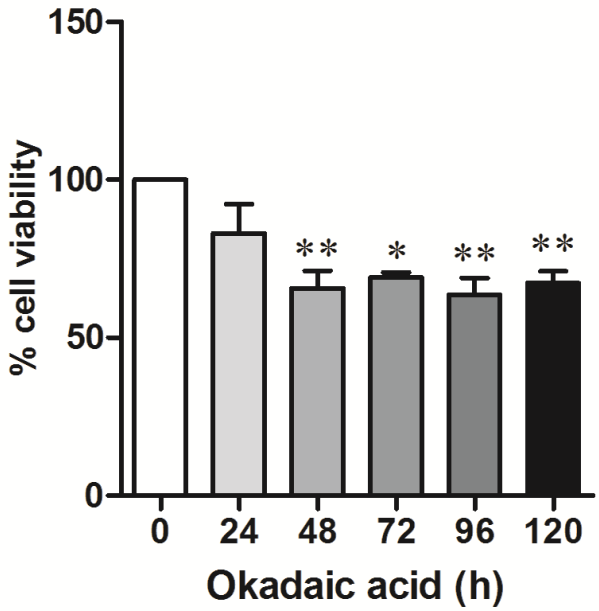


รูปที่ 4 แสดงปริมาณการหลั่งของ BDNF จากเซลล์ประสาทที่ทำการเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่างกัน คือ 0 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง

*P< 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม (0) (n=3)

2.2.5 ผลของเวลาในการบ่มกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.01 uM เป็นเวลา 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลดร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยง ร้อยละการรอดชีวตของเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ลดลด สรุปได้ว่า กรดโอคาดาอิกทำให้เซลล์ตายแบบไม่ขึ้นกับเวลา

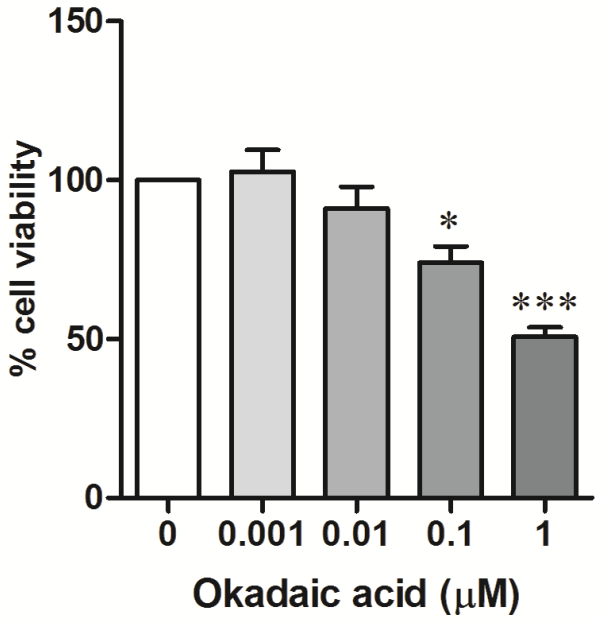


รูปที่ 5 แสดงร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่เวลาต่างกัน คือ 0 24 48 72 96 หรือ 120 ชั่วโมง

* P<0.05, **P< 0.005 (n=3)

2.2.6 ผลของความเข้มข้นของกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของกรดโอคาดาอิกต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.001 0.01 0.1 หรือ 1 uM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงหลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกรดโอคาดาอิกที่ความเข้มข้น 0.1 หรือ 1 uM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0) แต่ในกลุ่มที่ได้รับกรดโอคาดาอิดที่ความเข้มข้น 0.001 หรือ 0.01 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 uM มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง



รูปที่ 6 แสดงร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงที่บ่มด้วยกรดโอคาดาอิกที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.001 0.01 0.1 หรือ 1 uM

* P<0.05, ***P< 0.001 (n=3)

3. อภิปราย/วิจารณ์

3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ

เนื่องจากอุปกรณ์ในการทำ western blot ชำรุดบางอย่างและอยู่นะหว่างการซ่อมแซมจึงจำเป็นต้องตัดการทดลองส่วนการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย โดยนำงบประมาณส่วนดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาผลของความเป็นพิษของกรดโอคาดาอิกแทน

3.2 อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของกรดโอคาดาอิก การทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H19-7 hippocampal ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากฮิโปแคมปัสของหนูแรทและมีการนำมาใช้ศึกษาแทนเซลล์การใช้ primary hippocampal neuron จำนวนมาก ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นแล้วว่า H19-7 hippocampal neuron มีคุณสมบัติคล้ายกับ primary hippocampal neuron ทั้งความสามารถในการเกิดกระบวนการ synaptic plasticity และความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน

กระบวนการ synaptic plasticity ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสนั้นเกิดขึ้นโอยอาศัยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการแสดงออกของ synaptic protein ตลอดจน receptor ที่อยู่บริเวณ postsynaptic membrane ที่สำคัญ ได้แก่ glutamate receptor ทั้งชนิด AMPA และ NMDA การเพิ่มการแสดงออกของ AMPA receptor มักเกิดจาดการกระตุ้นกระบวนการ membrane insertion โดยไม่ต้องการการสังเคราะห์ยีนใหม่แต่อย่างใด ในขณะที่การเพิ่มการแสดงออกของ NMDA receptor นั้นต้องการการสังเคราะห์ยีนใหม่ซึ่งเป็นกระบวนการของระยะ late-LTP จากการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากรดโอคาดาอิกลดระดับการแสดงออกของยีน NR2 ซึ่งเป็น subunit ของ NMDA receptor ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการ synaptic plasticity นอกจากนี้ยังงานวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงผลของกรดโอคาดาอิกต่อการแสดงออกของยีน PSD-95 ซึ่งพบว่ากรดโอคาดาอิกยับยั้งการแสดงออกของยีน PSD-95 โดยจากการทดลองก่อนหน้านี้รายงานว่าการยับยั้งการแสดงออกของ PSD-95 ด้วยวิธี siRNA ส่งผลให้สัตว์ทดลองสูญเสียการเรียนรู้และการสร้างความจำ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่ากรดโอคาดาอิกมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน PSD-95 ซึ่งอาจจะมีส่วนทำให้เกิดการสูญเสียความจำและการเรียนรู้ได้ แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ยีน PSd-95 ก็ยังไม่ทราบแน่ชัด

เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสทำหน้าที่หลักในการคงสมดุลของกระบวนการ synaptic plasticity เป็นไปได้หรือไม่ว่ากรดโอคาดาอิกอาจจะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปดปแคมปัส จากผลการทดลองของโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับกรดโอคาดาอิกเป็นเวลานานมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการสังเคราะห์ฮอร์โมรเอสโตรเจนได้ แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างดังกล่าวยังไม่ทีความสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจจะต้องเพิ่มกลุ่มการทดลองต่อไป หรือเพิ่มระยะเวลาการให้กรดโอคาดาอิกแก่เซลล์เพาะเลี้ยง งานวิจัยนี้สามารสรุปได้ว่า กรดโอคาดาอิกยับยั้งการแสดงออกของ NR2 subunit ของ NMDA receptor และ PSD-95 แบบขึ้นกับเวลา โดยกลไกการทำงานยังคงต้องการการศึกษาต่อไป

4. สรุปและเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารสรุปได้ว่า กรดโอคาดาอิกยับยั้งการแสดงออกของ NR2 subunit ของ NMDA receptor และ PSD-95 แบบขึ้นกับเวลา ซึ่งอาจส่งผลต่อกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของกรดโอคาดาอิกยังคงต้องการการศึกษาต่อไป

5. ผลผลิต

โดยส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Proceedings of the Anatomy Association of Thailand ในชื่อเรื่อง The Effect of Okadaic Acid on the Synthesis of Estrogen in Hippocampal neurons.

Chamniansawat S. The Effect of Okadaic Acid on the Synthesis of Estrogen in Hippocampal neurons. Proceedings of the Anatomy Association of Thailand. 2014; 37: 86-87.

บรรณานุกรม

Beyer M, Gimsa U, Eyüpoglu IY, Hailer NP, Nitsch R. Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: upregulation of MHC class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro. Glia 2000; 31(3): 262–266.

Blanco J, Reyero MI, Franco J. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel Mytilus galloprovincialis. Toxicon. 2003;42(7):777-84.

Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. Neurosci Lett 2010; 470(1): 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(6):403-11.

Chung YC, Ko HW, Bok E, Park ES, Huh SH, Nam JH, Jin BK The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. BMB Rep 2010; 43(4): 225–232.

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(3):1432-9.

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(11): 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(2):311-9.

Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science 1982; 218(4571): 433–443.

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

Schlachetzki JC, Hüll M. Microglial activation in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 2009; 6(6): 554–563.

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(1): 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.

Suuronen T, Huuskonen J, Nuutinen T, Salminen A. Characterization of the pro-inflammatory signaling induced by protein acetylation in microglia. Neurochem Int. 2006;49(6):610-8.

Tapia R, Peña F, Arias C. Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. Neurochem Res. 1999; 24(11):1423-30.

Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. Front Neuroendocrinol 2008; 29(4): 507–519.

ภาคผนวก

บทความวิจัยเรื่องเต็มที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในงานประชุม (Proceeding) กายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 37

37th AAT Annual Conference
การประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37
Proceedings of the Anatomy Association of Thailand
May 7-9, 2014

The Effect of Okadaic Acid on the Synthesis of Estrogen in Hippocampal Neurons

Siriporn Chamniansawat[1*]
[1] Department of Biomedical Science, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Chonburi, Thailand.
*Corresponding author, e-mail: siripornc@buu.ac.th

Abstract

Okadaic acid (OA), the main representative diarrheic shellfish poisoning (DSP) toxin, is a specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. Memory impairment induced by intra-hippocampal injection of OA has been reported. Estrogen synthesis in the hippocampus plays a role in the maintenance of learning and memory. It is probably that OA-induced memory impairment is associated with the synthesis of the de novo estrogen in hippocampal neurons. Using ELISA technique, the result showed that OA tented to inhibit the secretion of estrogen from hippocampal neurons. In conclusion, the OA-induced memory impairment may be resulted from the inhibition of estrogen synthesis by hippocampal neuron. Findings contribute to understanding condition accompanied by memory deficits induced by OA administration.

Keyword: Estrogen, Hippocampal neuron, Okadaic acid

Background

It has previously believed that menopause is an important factor of memory deficits in age-related neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease [1]. Consequently, estrogen replacement therapy (ERT) has become a common treatment for reduce risks of neurodegenerative disorders and prevent memory impairments in postmenopausal women [1]. However, because of its detrimental side effects, ERT has been limited [2]. In addition to gonads, estrogen also synthesized de novo by hippocampal neurons [3]. Hippocampal-derived estrogen has been showed to be essential for synaptic plasticity and memory formation [3]. There is a growing body of clinical evidence which shows that women who are treated with aromatase inhibitors exhibits deficits in learning and memory [4]. Recent study demonstrated that impairments of long-term potentiation (LTP), loss of mushroom spines, and loss of spine synapses, which are possible molecular mechanisms contributing to alterations in learning and memory, in ovariectomized mice treated with aromatase inhibitor [4]. Moreover, my previous study demonstrated the priming effect of hippocampal-derived estrogen that helps to organize hippocampal neuron for a dramatic stimulation of exogenous estrogen [5].

Okadaic acid (OA) is a selective and potent inhibitor of serine/threonine phosphatases 1 and 2A [6]. Previously, it has been shown that the activity of protein phosphatase-2A (PP2A) is decreased in the brains of AD patients [6]. Moreover, memory impairment induced by intra-hippocampal injection of OA has been reported but its mechanism is unknown [6]. Therefore, the present study aim to demonstrate the effect of OA on the synthesis of de novo hippocampal-derived estrogen, which may be explored the underlying mechanism of OA-induced memory impairment.

Materials and Methods

Primary hippocampal neuron culture

Primary hippocampal neuron (Catalog Number A10841-01) was cultured in neurobasal medium supplemented with B27, 5 ng/ml basic fibroblast growth factors and seed on the glass cover slips previously coated with polo-L-lysine. Hippocampal neurons were cultured in humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C. After 24 h of co-culturing, hippocampal neuron was treated with 10 nM OA and then incubated at 37 °C for to 120 h.

ELISA technique

Estrogen in the culture supernatants were detected by an ELISA kit. Briefly, culture medium were pipetted into micro-assay well which had been precoated with monoclonal antibody, followed by incubation at 37°C for 30 min. And then washing buffer will be added to wash an excess binding before added HRP-conjugated reagent to each well. To develop the reaction, chromogen substrate will be added and incubated at 37°C for 15 min in light protection. The reaction were stopped by add 50 ml stop solution into each well. Absorbance will be read at 540 nm on a microplate reader (Bio-Tek). Samples were quantified by interpolation with standard curve.

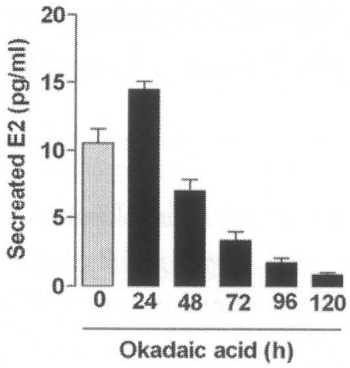


Fig.1 OA inhibited the de novo hippocampal estrogen synthesis.
The released estrogen of OA incubation for 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h in hippocampal neuronal culture medium was demonstrated by ELISA technique. (n=3)

Result, Discussion and Conclusion

The present study aim to demonstrate whether OA-induced memory impairment is acted through hippocampal estrogen synthesis. To address this, we demonstrated amount of secreted estrogen in culture media of H19-7 hippocampal neurons by using ELISA technique. Time-course experiments showed that the amount of estrogen secretion was markedly decreased for 72 h of OA treatment in culture of hippocampal neurons. This effect of OA is time-dependent manner. This result suggested that OA inhibited the de novo hippocampal estrogen synthesis, leading to memory impairment.

Acknowledgements

This study was supported by grant from Higher Education Commission and Burapha University (HERP: No. 1/2557).

References

1. McEwen BS and Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. Endocr Rev. 1999, 20: 279-307.
2. Gorenstein C, Rennó J Jr, Vieira Filho AH, Gianfaldoni A, Gonçalves MA, Halbe HW, Fernandes CE, and Demétrio FN. Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: a randomized trial. Arch Womens Ment Health. 2011, 14: 367-373.
3. Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, and Rune GM. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. Hippocampus. 2006, 16: 464-471.
4. Shilling V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell A. The effects of oestrogens and anti-oestrogens on cognition. Breast 2001, 10: 484-491.
5. 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.
6. Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, Bernardi C, Tortorelli LS, Leal RB, Gonçalves CA. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. Behav Brain Res. 2012, 226: 420-427.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวศิริพร จำเนียรสวัสดิ์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Siriporn Chamniansawat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3240100446071
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่ 169 ถ. ลงหาด บางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
   โทรศัพท์: 038-103175, โทรสาร: 038-393497
   E-mail: siripornc@buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
   5.1. ปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปีที่สำเร็จ 2547
   5.2. ปริญญาโท สาขากายวิภาคศาสตร์ (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่สำเร็จ 2549
   5.3. ปริญญาเอก สาขากายวิภาคศาสตร์และชีววิทยาโครงสร้าง (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่สำเร็จ 2552

   สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ประสาทวิทยาศาสตร์
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
   6.1. หัวหน้าโครงการวิจัย :
      6.1.1. บทบาทของการสังเคราะห์เอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทในภาวะที่มีการให้สาร inflammatory cytokines แก่เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

      ทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาน 2554

      6.1.2. ผลของการอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของ local hippocampal estrogen ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาท hippocampus

      ทุนพัฒนาศักยภาพศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สกว.- สกอ.) ปี 2554-2555
7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน
   7.1. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med. 2012;44(6):403-411. ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2554 และ ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 2554-2555
   7.2. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Modultion of microglia in response to prolonged exposure to high glucocorticoid level, implication from an in vitro model of chronic depression. Journal of Neurochemistry 2010; Suppl 1: 19. ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ให้แก่ รศ.ดร.สุขุมาล จงธรรมคุณ)
   7.3. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2010; 470: 49–54. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
   7.4. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) via MAPK- and PI-3K dependent pathways in SH-

SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2009; 452: 130–135. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.5. Chamniansawat S and Chongthammakun S. Prolonged and high level of cortisol exposure activates microglial HAPI-cells. Proceedings of Anatomy Association of Thailand 2010; 33: 131–132. ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ให้แก่ รศ.ดร.สุขุมาล จงธรรมคุณ)

7.6. Chamniansawat S and Chongthammakun S. Non-genomic effect of estrogen via ERβ and MAPK on activity-regulated cytoskeleton associated protein expression in SH-SY5Y cells. Proceedings of Anatomy Association of Thailand 2009; 32: 29–30. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.7. Chamniansawat S and Chongthammakun S. The effects of genistein on okadaic acid-induced hyperphosphorylated tau protein in SH-SY5Y cells in vitro. Proceedings of 13th TNS conference 2007; 13: 45. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.8. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genistein attenuates hyperphosphorelation of tau protein induced by diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, in SH-SY5Y cells *in vitro*. *J Neurochem* 2008 (Suppl.1); 106: 28. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา