ผลของเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไมโครเกลียในสภาวะที่ถูกกระตุ้น

นางสาว กรองกาญจน์ นาสี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-5117-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MODULATORY EFFECT OF ESTROGEN ON MICROGLIAL ACTIVATION

Miss Krongkan Nasee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-5117-6

Thesis Title	Modulatory effect of estrogen on microglial activation
By	Miss Krongkan Nasee
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.)

..... Member

(Weerapan Khovidhunkit, M.D., Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรองกาญจน์ นาสี : ผลของเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไมโครเกลียในสภาวะที่ถูกกระตุ้น (MODULATORY EFFECT OF ESTROGEN ON MICROGLIAL ACTIVATION.) อ. ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร ISBN 974-17-5117-6

ไมโครเกลีย (microglia) เป็นเซลล์ค้ำจุนในระบบประสาทส่วนกลางที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ macrophages ของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เมื่อได้รับการกระตุ้น microglia จะสร้างและหลั่งสารพวก proinflammatory cytokines รวมถึง inflammatory mediators โดยสารพิษเหล่านี้ มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบของระบบประสาทที่พบได้ใน Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) และ Stroke ซึ่งเป็นโรคที่มีการตายของเซลล์ประสาท เมื่อเร็วๆนี้มีงานวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าระดับธาตุเหล็กที่พบในเซลล์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงยีนที่เกี่ยวกับ inflammatory responses โดยแสดงให้เห็นด้วย microarray analysis เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทของธาตุเหล็กต่อ activated microglia และเข้าใจถึงกลไกการกระตุ้น microglia รวมถึงความเป็นพิษของธาตุเหล็กใน iron-loaded activated microglia ซึ่งพบใน neurodegeneration งานวิจัยนี้เราจึงได้จำลองให้ใกล้เคียงกับสภาวะที่พบจริงในโรค neurodegeneration ซึ่งพบว่า activated microglia จะมีการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์เพิ่มขึ้น มีการรายงานถึงบทบาท neuroprotection ของเอสโตรเจนต่อโรค neurodegeneration เช่น AD และ PD เราจึงสนใจที่จะศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการสร้าง MMP-9, nitric oxide (NO) และการแสดงออกของยีน iNOS, TNF -α และ IL1-β โดยเลือกใช้ HAPI cells ซึ่งเป็น microglia cell line ร่วมกับการใส่ธาตุเหล็กเพื่อใช้เป็น model ในการศึกษา activated microglia จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 17β-estradiol สามารถลดระดับการหลั่ง MMP-9 ใน activated microglia ที่มีธาตุเหล็กสะสมอยู่ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การหลั่ง MMP-9 ก็ยังคงมากกว่าactivated microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้การสร้าง nitric oxide (NO) production สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยเอสโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้น10nM ในไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้น รวมถึงไมโครเกลียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและมีการสะสมของธาตุเหล็กร่วมอยู่ด้วย และที่สำคัญคือระดับ NO ที่ลดลงนั้นต่ำกว่าbaseline ของการสร้าง NO เมื่อเทียบกับ untreated microglia อย่างมีนัยสำคัญด้วย งานวิจัยนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนสามารถลดระดับการแสดงออกของ iNOS และ TNF-α โดยลดลงตามการเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอสโตรเจน แต่ตรงกันข้ามกับที่พบใน IL1-β การใช้เอสโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง(10nM) กลับจะไปเพิ่มการแสดงออกของ IL1-β ทั้งในไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้น แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เอสโตรเจนใน iron-loaded activated microglia ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ IL-1β แต่อย่างใด สรุปได้ว่า effector functions ของ ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS นั้นแตกต่างจากไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นร่วมกับการมีธาตุเหล็ก โดยการที่มีธาตุเหล็กเข้ามาสะสมภายในactivated microglia มีผลต่อการตอบสนองกับเอสโตรเจน แสดงว่าธาตุเหล็กนั้น สามารถเข้าไปแทรกแซงการทำงานของเอสโตรเจน ดังนั้นผลการทดลองครั้งนี้จึงได้ชี้ถึงข้อควรระมัดระวังในการนำ estrogen ไปใช้สำหรับการรักษาโรคทางพยาธิวิทยาทางสมอง (เช่นโรคAlzeimer) ที่สัมพันธ์กับการสะสมธาตุเหล็กใน activated microglia

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

457 52906 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: 17β-ESTRADIOL /MICROGLIA/NO/iNOS/TNF-α/MMP-9

KRONGKAN NASEEE: MODULATORY EFFECT OF ESTROGEN ON MICROGLIAL ACTIVATION.THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR Dr. POONLARP CHEEPSUNTORN, 57 pp. ISBN 974-17-5117-6.

Upon activation, brain macrophages, the microglia, release pro-inflammatory cytokines and inflammatory mediators. These neuroactive substances play important roles in eliciting inflammatory reaction associated with neurodegenerative process as seen in Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and stroke. Activation of microglia *in vivo* is accompanied by intracellular accumulation of iron. Recent studies have shown that alteration of cellular iron levels modulates microglial inflammatory responses, as well as a set of functional genes identified by microarray analysis. Understanding the role of iron in activated microglia should provide insight into mechanisms of microglial activation and potential toxicity of iron-loaded activated microglia in neurodegeneration. Estrogen has been reported to exert its potential neuroprotective effect in AD and PD. In this study using an *in vitro* model of iron loaded LPS-activated microglia its effects on the secretion of MMP-9, nitric oxide (NO) and the expression of the iNOS, TNF -α and IL1-β RNA. The results demonstrated that 17β-estradiol (E_2) diminish MMP-9 secretion in iron loaded activated microglial cells still much more the MMP-9 activity in LPS-activated microglia. Furthermore, NO production could be suppressed significantly by17β-estradiol at 10nM in non-activated, as well as in LPS-activated microglia in the presence and absence of iron. Not only decreased the NO production but also reduced the NO levels significantly less than baseline in several conditions. Further studies revealed that treatment with E_2 decrease the expression of iNOS and TNF-α in a dose-dependent manner. This study demonstrated that a higher dose of E_2 increases the expression of the IL-1β RNA in both non-activated and activated cells. However, treatment with E_2 has no effect on the expression of the IL-1β RNA in iron-loaded activated microglia. In conclusions, effector functions of activated microglia were different from that of iron-loaded activated microglia, suggesting the activation of microglia were linked to cellular iron metabolism. Intracellular iron loading modifies the responses of activated microglia to E_2, suggesting iron could interfere with E_2 actions. Therefore, these findings raise the precaution whether estrogen therapy would be an effective strategy for reversing the pathology of neurological diseases (e.g. AD) that involved brain iron accumulation and microglial activation.

Field of study Medical Science

Academic year 2004

Student's signature.....

Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and profound appreciation to Assistant Professor Dr. Poonlarp Cheepsuntorn my advisor for his valuable advice, guidance, helpfulness, understanding and intelligential motivation throughout my study and during the preparation of this study. I also would like to express my gratefulness to Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura, Assistant Professor Dr. Wacharee Limpanasitthikul, Dr. Weerapan Khovidhunkit my thesis committees, for their valuable discussion and suggestions.

I feel profoundly indebted to Professor Tada Sueblinvong at the Department of Biochemistry, Faculty of medicine, and Chulalongkorn University for allowing me to use her laboratory equipments includings tissue culture facilities during the time I did my thesis. I am really thankful to Cherry, Noot, Jim, Mix, Pon, Yang and my freinds who work on the the 10^{th} floor of Chula MRC for their help, sincerity and friendship.

Finally, I will not forget to give special thanks to my parents and every member in my family for support during my graduate study and their kindness, understanding all the time; thank you very much.

This work was supported by Ratchadapiseksompoch, Faculty of Chulalongkorn University and by Government research budget to Assistant Professor Dr. Poonlarp Cheepsuntorn.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Questions.....3
- Objectives of the Study.....3
- Hypothesis.....4
- Key Words.....4
- Expected Benefits and Applications.....4

II LITERATURE REVIEWS.....5

III MATERIALS AND METHODS

- Cultures and treatment of microglial cells.....14
- RNA Isolation.....14
- Reverse transcription.....15
- Polymerase Chain Reaction.....16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

- Zymography.....17
- Quantitative analysis of nitric oxide 18
- Statistical analysis.....18

IV RESULTS

- Estrogen treatment reduced MMP-9 secretion from iron-loaded activated microglia. 19
- Estrogen treatment attenuated LPS-induced NO production in iron-loaded and non-iron loaded microglia.....19
- Estrogen treatment affected gene expression of inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokine in iron-loaded activated microglia differently. 20

V DISCUSSION AND CONCLUSION.....29

REFERENCES.....34

APPENDICES.....50

BIOGRAPHY.....57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Specific primer for TNF- α, IL-1β, iNOS and GAPDH.....16
2. Preparation of the reaction mix for cDNA synthesis.....51
3. Preparation of the reaction mix for PCR.....52
4. Preparing the solutions for Tris/glycine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for zymogram.....54

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Treatment with iron increased gelatinase activity of MMP-9 in activated microglia.....22
2. No_2^- levels are attenuated by Estrogen (E_2) and iron (FAC) in microglial cells culture.....23
2.1 NO_2^- production in the absence or presence of 17 β –estradiol (E_2) from microglia cells. 24
2.2 LPS induced NO_2^- productions were attenuated by 17 β –estradiol (E_2) from microgial cells. 25
2.3 $NO2^-$ production in the presence of iron (FAC) or by treating 17 β –estradiol (E_2) from microglia. 26
2.4 LPS induced NO_2^- productions were attenuated by iron (FAC) and 17β – estradiol (E_2) in microglial cell.....27
3. Estrogen treatment affected gene expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and pro-inflammatory cytokine TNF-α, and IL-1β in iron-loaded activated microglia.....28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Questions.....3
- Objectives of the Study.....3
- Hypothesis.....4
- Key Words.....4
- Expected Benefits and Applications.....4

II LITERATURE REVIEWS.....5

III MATERIALS AND METHODS

- Cultures and treatment of microglial cells.....14
- RNA Isolation.....14
- Reverse transcription.....15
- Polymerase Chain Reaction.....16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

- Zymography.....17
- Quantitative analysis of nitric oxide 18
- Statistical analysis.....18

IV RESULTS

- Estrogen treatment reduced MMP-9 secretion from iron-loaded activated microglia. 19
- Estrogen treatment attenuated LPS-induced NO production in iron-loaded and non-iron loaded microglia.....19
- Estrogen treatment affected gene expression of inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokine in iron-loaded activated microglia differently. 20

V DISCUSSION AND CONCLUSION.....29

REFERENCES.....34

APPENDICES.....50

BIOGRAPHY.....57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

AD	Alzheimer's dissease
ANOVA	analysis of variance
APPs	amyloid precursor proteins
APs	amyloid plaques
Aβ	amyloid beta peptides
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
^{o}C	degree celsius
cm	centimeter
CNS	central nervous system
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dH_2O	distilled water
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
ECM	extracellular matrix
FAC	ferric ammonium citrate
FBS	fetal bovine serum
g	gram
h	hour
IL-1β	interlukin 1 beta
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LPS	lipopolysacharide
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mM	millimolar
MMPs	matrix metalloproteinases
MS	multiple sclerosis
ng	nanogram
nM	nanomollar
nm	nanometer
NO	nitrix oxide
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RNase	ribonuclease
RT	reverse transcription
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulphate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard errors of mean
TBE	tris borate
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
Tris-HCl	tris-hydrochloric
UV	ultraviolet
µg	microgram
µl	microlitre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย