ผลของธาตุเหล็กต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ชวานน์

นางสาวอรทัย วีระนันทนาพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3458-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MITOGENIC AND DIFFERENTIATIVE EFFECTS OF IRON ON SCHWANN CELLS

Miss Oratai Weeranantanapan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-3458-8

Copyright of Chulalongkorn University

492245

Thesis Title	Mitogenic and differentiative effects of iron on Schwann cells
By	Miss Oratai Weeranantanapan
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

P. Kamolratanakul ..... Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

Vilai Chentanez ..... Chairman

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.)

Poonlarp Cheepsunthorn ..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

Meechai Srisai ..... Member

(Professor Meechai Srisai, M.D., Ph.D.)

Wilai Anomasiri ..... Member

(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D)

Wacharee Limpanasithikul ..... Member

(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D)

อรทัย วีระนันทนาพันธ์ : ผลของธาตุเหล็กต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ชวานน์.
MITOGENIC AND DIFFERENTIATIVE EFFECTS OF IRON ON SCHWANN CELLS.
อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร 54หน้า. ISBN 974-14-3458-8.

เป็นที่ทราบแล้วว่าธาตุเหล็กและ Transferrin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งธาตุเหล็ก มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์โอลิโกซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเยื่อหุ้มไมอิลินในระบบประสาทส่วนกลาง แต่ในทางตรงกันข้ามความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กต่อเซลล์ชวานน์และกระบวนการสร้างเยื่อหุ้มไมอิลินในระบบประสาทส่วนปลายยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ได้ตั้งสมมติฐานว่า การกระตุ้นเมตาบอลิสมของธาตุเหล็กอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ชวานน์ในลักษณะเดียวกันกับของเซลล์โอลิโก และอาจจำเป็นต่อกระบวนการฟื้นฟูของเส้นประสาทภายหลังจากที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงใช้เซลล์ D6P2T ซึ่งมีลักษณะของ immature Schwann cell พบว่าเซลล์ D6P2T มีตัวรับของธาตุเหล็กเช่นเดียวกับเซลล์ชวานน์ในสัตว์ทดลอง ธาตุเหล็กที่ใช้อยู่ในรูปของ iron citrate ที่ความเข้มข้น 50-1000 µg/ml ผลของธาตุเหล็กที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ โดยวิธี MTT และการนับเซลล์ที่ย้อมด้วย trypan blue พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ชวานน์ที่มีความเข้มข้นของธาตุเหล็ก 50 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเพิ่มจำนวนของเซลล์ชวานน์ขึ้นอีก 20% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นของธาตุเหล็กที่เพิ่มสูงขึ้น กลับไปลดเปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนของเซลล์ชวานน์ แต่ผลที่ได้ก็ยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้การใส่ธาตุเหล็กยังมีผลต่อการลดลงของโปรตีนที่เป็นตัวรับของ Transferrin บนผิวเซลล์และการเพิ่มขึ้นของ Ferritin ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่ใช้ในการเก็บธาตุเหล็กภายในเซลล์ โดยดูจากการทำ Flow cytometry และ immunoblot ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใส่ธาตุเหล็กสามารถเพิ่มระดับของธาตุเหล็กภายในเซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของธาตุเหล็กจะแปรผกผันกับระดับของ Ferritin ที่มีอยู่ในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ผลการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่า การใส่ธาตุเหล็กจะเพิ่มระดับ mRNA ของโปรตีน P0 และ MBP ซึ่งเป็นโปรตีนที่สัมพันธ์กับพัฒนาการของเซลล์ชวานน์ในลักษณะที่ผันแปรตามความเข้มข้นของธาตุเหล็กที่ใช้ ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้ได้ชี้ให้เห็นว่า ธาตุเหล็กอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำเป็นต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของเซลล์ชวานน์

สาขาวิชา วิทยาศาสตรการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

477 47975 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: IRON / TRANSFERRIN RECEPTOR / FERRITIN / MYELIN PROTEIN ZERO / MYELIN BASIC PROTEIN

ORATAI WEERANANTANAPAN : THE MITOGENIC AND DIFFERENTIATIVE EFFECTS OF IRON ON SCHWANN CELLS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, PH.D., 54 pp. ISBN 974-14-3458-8.

Recent studies indicate that iron and transferrin (Tf) play significant roles in growth and differentiation of oligodendrocytes, the myelin-forming cells of the CNS. On the other hand, the relationship of iron to Schwann cells and PNS myelination has not yet been elucidated. In this study, we hypothesize that activation of Schwann cell iron metabolism could recapitulate the relationship of iron to oligodendrocytes and myelination and could be essential for the process of nerve regeneration. Therefore, the effect of iron on Schwann cell line D6P2T was examined with regard to its proliferation and differentiation. It was found that D6P2T cells expressed the receptors for Tf similar to Schwann cell *in vivo*. We then investigated the effect of iron citrate at various concentrations (50-1000 μg/ml) on Schwann cell proliferation using MTT assay, which was confirmed by trypan blue dye exclusion method. The results demonstrated that Schwann cell exposed to 50 μg/ml iron for 24 h increased cell proliferation by 20%, when compared to untreated Schwann cells. Percent proliferation of Schwann cells was diminished with increasing concentration of iron, but still higher than that of the untreated cells. Exposure to iron also reduced the expression of Tf receptors on Schwann cell surface and increased the expression of iron storage protein ferritin as determined by flow cytometry and immunoblot, respectively, suggesting that iron treatment elevated intracellular iron levels. However, it appeared that exposure of Schwann cells with increasing concentration of iron significantly decreased ferritin levels without showing a dose-dependent cytotoxicity of iron. We then examined the effect of iron on the expression of myelin gene associated with Schwann cell differentiation. RT-PCR results showed that exposure of Schwann cells to iron induced mRNA expression of myelin protein zero (P0) and myelin basic protein (MBP) in a dose-dependent manner. Thus, these findings suggest that iron may be an indispensable factor for Schwann cell proliferation and differentiation.

Field of Study: Medical Science Student's Signature.....

Academic Year 2006 Advisor's Signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and profound appreciation to Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D. my thesis advisor for his valuable advice, guidance, helpfulness, understanding and intelligential motivation throughout my study and during the preparation of this thesis. My grateful appreciation is extended to Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D., Professor Meechai Srisai, M.D. Ph.D, Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D, Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D, my thesis committees, for their valuable discussion and suggestions.

I feel profoundly indebted to Chula MRC Research Center at 10th floor Aor Por Ror building, Faculty of medicine, Chulalongkorn University for allowing me to use the laboratory equipments includings tissue culture facilities during the time I did my thesis and to the Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for allowing me to use X-ray film facilities. Specials thanks to Miss Supranee Buranapraditkun at Vaccine and Cellular Immunology Lab for providing me all information about FACs analysis in my thesis work, my trainer Miss Nootchanat Mairuae, Miss Tanissara Chomkerd, Miss Pornpen Chaivorakul for their suggestion and encouragement and my friends 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.

CONTENTS

Page

ABSTRACT(THAI).....iv

ABSTRACT(ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I. INTRODUCTION

- Background and rationale.....1
- Research questions.....2
- Objectives of the study.....2
- Hypothesis.....3
- Keywords.....3
- Expected benefits and applications.....3

II. LITERATURE REVIEW.....4

III. MATERIALS AND METHODS

- Cultures and treatments of Schwann cells.....17
- MTT cell proliferation/cytotoxic assay.....17
- Trypan blue dye exclusion assay.....18
- Flow cytometry.....18
- Western blot analysis.....19
- RNA Isolation.....20
- Reverse transcription (cDNA synthesis).....21
- Polymerase Chain Reaction (PCR).....21

- Statistical analysis..... 22

IV. RESULTS

- The effect of iron on Schwann cell proliferation..... 23

- The effect of iron on TfR expression in cultured Schwann cells..... 24

- The effect of iron on ferritin expression in cultured Schwann cell....24

- The effect of iron on the mRNA expression of myelin marker associated with Schwann cell differentiation..... 25

V. DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....33

REFFERENCES.....**36**

APPENDICES.....**44**

BIOGRAPHY.....**54**

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Expression of Schwann cell markers in different Schwann cell phenotypes	12
2.	The comparison between the percentage of myelin protein components in CNS and PNS	13
3.	Specific primers for P0, MBP and GAPDH	22
4.	Mitogenic and differentiative effects of iron on Schwann cell	35
5.	Preparation of the reaction mix for cDNA synthesis	51
6.	Preparation of the reaction mix for PCR	52

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Regulation of cellular iron uptake	5
2.	Ferritin	7
3.	Homeostatic responses to iron supply mediated by IRE-IRP interaction	8
4.	Schwann cell development and some of the molecular markers	11
5.	The effect of iron on Schwann cell proliferation determined by MTT assay	26
6.	The effect of iron on Schwann cell proliferation determined by trypan blue dye exclusion method	27
7.	The effect of iron on TfR (CD71) expression in cultured Schwann cells determined by FACs analysis	28
8.	The effect of iron on ferritin expression in cultured Schwanns cells determined by western blot analysis	30
9.	The effect of iron on the mRNA expression of myelin protein zero (P0) in cultured Schwann cells determined by RT-PCR	31
10.	The effect of iron on the mRNA expression of myelin basic protein (MBP) in cultured Schwann cells determined by RT-PCR	32

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	analysis of variance
bp	base pairs
BFAB	brain fatty acid binding protein
BSA	bovine serum albumin
^{o}C	degree celsius
cm	centimeter
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CMT	Charcot-Marie Tooth disease
CNPase	2′3′-cyclic nucleotide-3′-phosphodiesterase
CNS	central nervous system
Cp	ceruloplasmin
dH_2O	distilled water
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMT1	divalent metal transporter1
DNA	deoxyribonucleic acid
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
FAC	ferric ammonium citrate
FACs	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
g	gram
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein

h	hour
HRP	horseradish peroxidase
HMG CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory protein
LIP	labile iron pool
LSD	least significant difference
p75 NRT	low affinity p75 neurotrophin receptor
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
MAG	myelin-associated glycoprotein
MBP	myelin basic protein
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	multiple sclerosis
ng	nanogram
nm	nanometer
NCAM	neural cell adhesion molecule
NO	nitric oxide
NTBI	non transferrin bound iron
OD	optical density
P0	myelin protein zero
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLP	proteolipid protein
PMP22	peripheral myelin protein 22

PNS	peripheral nervous system
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNase	ribonuclease
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulphate
SEM	standard errors of mean
TBE	tris borate
TBI	transferrin bound iron
TBS	tris-buffered saline
Tf	transferrin
TfR	transferrin receptor
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UTR	untranslated region
UV	ultraviolet
µg	microgram
µl	microlitre