



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อเอนไซม์ inducible nitric oxide
synthase ของเซลล์เพาะเลี้ยง microglia

โดย ดร.จิราภรณ์ โตจรัส และคณะ

สิงหาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อเอนไซม์ **inducible nitric oxide synthase** ของเซลล์เพาะเลี้ยง **microglia**

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.จิราภรณ์ โตจรัส

มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. ศ.ดร.ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงศ์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG 4880090

Project Title : D-amphetamine induced nitric oxide synthase expression in microglia

Investigator : Dr.Jiraporn Tocharus

Naresuan University

E-mail Address : jirapornt@hotmail.com

Project Period : 2 year

D-Amphetamine (AMPH) is a well-known drug of abuse and neurotoxin. High dose exposure of AMPH results in damage of dopaminergic and serotonergic pathways. Low dose exposure to AMPH over a prolong period is associated with the development of Parkinson's disease (PD). AMPH induced massive release of dopamine from synaptic vesicles and then generated the reactive oxygen species (ROS). Furthermore, reactive nitrogen species, nitric oxide (NO) which is a short-lived free radical produced in the central nervous system (CNS) mediated by activation of microglial, appears to play a critical role in stress-induced brain damage. In the present study, we examined the involvement of NO in the neurotoxic effects of AMPH, therefore the contribution of altered nitric oxide synthase (NOS) enzyme function was suspected. AMPH at 0.4 mM to 3.2 mM concentration has cytotoxic effect on HAPI microglial cells. The effect of AMPH towards the increment of iNOS mRNA in HAPI microglial cells is concentration dependent. Pretreatment with S-methylisothiourea (S-MT), a selective iNOS inhibitor or melatonin counteracted the overexpression of iNOS induced by AMPH in a concentration-dependent manner. These results suggest that AMPH could activate

microglial cells which represent the resident macrophage population within the CNS similar to other immunogens. Thus, the induction of iNOS by AMPH in microglial cells may be an important source of NO in CNS inflammatory disorders associated with the death of neurons and oligodendrocytes. Administration of exogenous melatonin will be beneficial as it reduces iNOS mRNA expression, therefore, it probably can be used as a neuroprotective agent in AMPH- or other immunogens-induced toxicity.

Keywords : microglia, nitric oxide synthase, amphetamine, melatonin

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG 4880090

ชื่อโครงการ ศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase
ของเซลล์เพาะเลี้ยง microglia

ชื่อนักวิจัย ดร.จิราภรณ์ โตจรัส
มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail Address : jirapornt@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

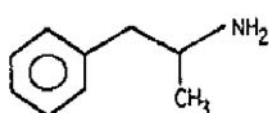
แอมเฟตามีนเป็นสารเสพติดที่มีฤทธิ์ทำลายระบบประสาท เมื่อเสพยาในปริมาณมากจะพบว่ามี
การทำลายระบบประสาทโดปามีน และซีโรโทนิน ในขณะที่สารแอมเฟตามีนในปริมาณต่ำจะมี
ผลทำให้เกิดโรคทางระบบประสาท Parkinson ได้ ทั้งนี้สารแอมเฟตามีนไปมีผลให้มีการหลั่ง
สารโดปามีนที่เก็บไว้ใน synaptic vesicles ออกมาในปริมาณมาก ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้
เกิดสารอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน ที่สำคัญคือ ไนตริกออกไซด์ เป็น
อนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปก๊าซ ซึ่งมีระยะการออกฤทธิ์สั้น สังเคราะห์ได้จากกลุ่มเซลล์ไมโครเกลียที่
ได้รับการกระตุ้นจากภาวะเครียด ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อการ
กระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียต่อการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์โดยศึกษาจากการแสดงออกยีนเอนไซม์
ไนตริกออกไซด์ซินเทส โดยพบว่าสารแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.4 ถึง 3.2 มิลลิโมลาร์ มี
ความเป็นพิษต่อเซลล์ไมโครเกลีย นอกจากนี้ยังพบว่าสารแอมเฟตามีนกระตุ้นการแสดงออก
ของยีนไนตริกออกไซด์ซินเทสเพิ่มความเข้มข้น เมื่อให้ S-methylisothiourea ซึ่งเป็นตัว
ยับยั้งเอนไซม์ iNOS ก่อนเติมสารแอมเฟตามีน พบว่าการแสดงออกของยีนไนตริกออกไซด์ซิน
เทสลดลง จากผลการทดสอบนี้พบว่าสารแอมเฟตามีนสามารถกระตุ้นเกลียเซลล์ ที่ทำ
หน้าที่เป็นตัวควบคุมสิ่งแวดล้อมที่เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง ดังนั้นไนตริกออกไซด์ที่

สังเคราะห์ออกมามากในระบบประสาทอาจไปมีผลให้ระบบประสาทส่วนกลางเกิดการอักเสบซึ่งจะนำไปสู่การทำลายเซลล์ประสาท การให้สารเมลาโท닌แก่เซลล์ยังสามารถลดการแสดงออกของยีนไนตริกออกไซด์ ดังนั้นจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำสารเมลาโท닌มาใช้ในการป้องกันการทำลายระบบประสาทจากสารแอมเฟตามีน

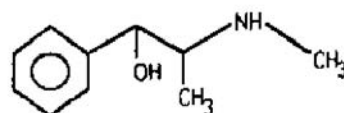
คำหลัก : microglia, nitric oxide synthase, amphetamine, melatonin

บทนำ

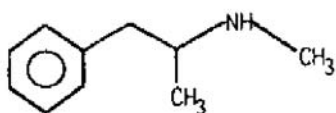
แอมเฟตามีนเป็นวัตถุออกฤทธิ์ตามพระราชบัญญัติวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518 (ประเภท 2) ที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นเป็นยาที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งประกอบไปด้วย แอมเฟตามีน (amphetamine) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า (+) - α -amino-1-phenylpropane, เดกแอมเฟตามีน (Dexamphetamine) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า (+) -2-amino-1-phenylpropane, เมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า (+) -2-methyl-amino-1-phenylpropane, เมทิลเฟนิเดต (Methylphenidate) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า (+) -2-phenyl-2-(2-piperidyl) acetic acid, เฟนไซคลิดีน (Phencyclidine) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 1-(1-phenyl-cyclohexyl) piperidine, เฟนเมตราซีน (Phenmetrazine) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 3-methyl-2-phenylmorpholine และ เซเคบาร์บิทัล (Secobarbital) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 5-allyl-5-(1-methylbutyl) Larbituric acid ทั้งนี้รวมถึงวัตถุที่มีชื่อทางเคมีอย่างเดียวกัน แต่เรียกชื่อเป็นอย่างอื่น เรียกรวมโดยทั่วไปว่า ยาแอมเฟตามีน หรือเรียกว่า ยาบ้า ซึ่งพบได้ในรูปยาเม็ด หรือบรรจุหลอดใช้ฉีดเข้าสู่ร่างกาย



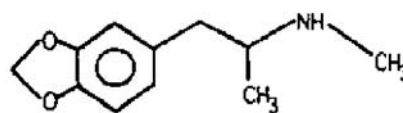
Amphetamine



Ephedrine



Methamphetamine



3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)

รูปที่ 1 โครงสร้างแอมเฟตามีนและอนุพันธ์บางชนิด

แอมเฟตามีนส่วนใหญ่ที่อยู่ในร่างกายจะออกฤทธิ์กระตุ้นประสาทส่วนกลาง (CNS) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการคิด การทำงานของอวัยวะต่างๆ โทษเฉียบพลันของการได้รับสารแอมเฟตามีนจะมีอาการทางสมองให้เห็นได้ชัดเจน ได้แก่ วิงเวียนศีรษะ นอนไม่หลับ ประสาทตึงเครียด เพ้อคลั่งประสาทหลอน ถ้ามีอาการรุนแรงมาก ก่อนเสียชีวิตมักจะมีอาการชัก หมดสติ นอกจากนี้ในกลุ่มที่ได้รับสารแอมเฟตามีนติดต่อกันเป็นเวลานานเรื้อรัง จะมีผลทำให้สมองและร่างกายกระตุ้นอยู่เสมอ เกิดอาการเช่นเดียวกับกลุ่มเฉียบพลัน ระบบประสาทการรับรู้ลดลง เกิดอาการสมองเสื่อมแบบ Parkinson's disease เมื่อถึงวัยสูงอายุ ในการบำบัดผู้ที่เสพติดยามักทำได้ยาก เนื่องจากเมื่อผู้ใช้ติดแอมเฟตามีนแล้ว หากไม่ได้ใช้อีกจะเกิดอาการขาดยา เพราะแอมเฟตามีนนี้เป็นยาเสพติด ผู้ใช้จะมีอาการทุกข์ทรมานมากคือรู้สึกอ่อนเพลียแรงมาก จนกระทั่งอาจไม่มีแรง จะมีอาการคลุ้มคลั่งทำร้ายผู้อื่น อาจถึงฆ่าตัวตายได้เพราะขาดยา ผู้ที่ติดแล้วมักทนอาการขาดยาไม่ไหว ต้องหายานี้มาใช้อีกเพื่อบำบัดตัวเองให้พ้นความทรมานเลย กลายเป็นวัฏจักร ผู้เสพยามักใช้จำนวนยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนทำให้เกิดอาการที่ควบคุมโดยระบบประสาทได้แก่ ความดันโลหิตสูงมาก คลื่นไส้ อาเจียน ชัก และหมดสติ อาจถึงตายได้

สมองเป็นส่วนสำคัญของร่างกายที่ควบคุมการทำงานของอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังเป็นตัวควบคุมกลไกการเสพติดยา มีรายงานพบว่าสารแอมเฟตามีนจะทำลายระบบประสาทส่วนกลาง แต่ข้อมูลกลไกที่แท้จริงในการออกฤทธิ์ของสารแอมเฟตามีนต่อระบบประสาทยังไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานพบว่าเมื่อทดสอบสารที่มีโครงสร้างคล้ายแอมเฟตามีน 3, 4- Methylendioxyamphetamine (MDMA) ในสัตว์ทดลอง จะมีผลให้มีการทำลายเส้นใยประสาท และลดจำนวนของ dopamine และ serotonin ที่ปลายประสาท โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine hydroxylase และ tryptophan hydroxylase และยังมีผลให้เซลล์เกิด apoptosis ตามมาในที่สุด (Gibb et al., 1997 and Davidson et al., 2001) ต่อมาพบว่าสารแอมเฟตามีนจะทำให้มีการสะสมของ reactive oxygen species (ROS) มากในสมอง

ในระบบประสาทส่วนกลางประกอบด้วยสมองและไขสันหลัง สมองประกอบด้วยเซลล์สมองจำนวนมากสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ทำหน้าที่นำกระแสประสาทเรียกว่า เซลล์ประสาท ส่วนเซลล์อีกกลุ่มหนึ่งไม่ได้นำกระแสประสาทแต่มีหน้าที่เฉพาะเรียกว่า glia cell ซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ astrocyte ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนและควบคุมการซึมผ่านเข้าออกของไอออนชนิดต่าง ๆ oligodendrocyte เป็นเซลล์ขนาดเล็กมีหน้าที่สร้าง myelin sheath, ependymal cell ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างและดูดซึมน้ำไขสันหลัง, microglia cell เป็น neuroglia ที่มีขนาดเล็กที่สุดที่พบในระบบประสาทส่วนกลางที่ทำหน้าที่เหมือนระบบภูมิคุ้มกันในสมอง โดยทำหน้าที่ปกป้องเซลล์สมองจากสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เมื่อได้รับการกระตุ้นเช่นจากการอักเสบ (inflammation) การทำลายเซลล์สมอง การได้รับสารแปลกปลอมหรือโรคต่าง ๆ เซลล์ microglia จะหลั่งสารพวก proinflammatory เช่น cytokine, nitric oxide (NO), superoxide เพื่อออกไปกำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอม การกระตุ้นเซลล์ microglia เป็นระยะเวลานาน ๆ และเป็นจำนวนมาก จะทำให้มีการหลั่งสารพวก proinflammatory ออกมาในปริมาณมาก ๆ โดยเฉพาะ NO NO เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระยะเวลาสั้นมากและเป็นตัวส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular messenger) ให้มีทำงานภายในเซลล์เช่น การส่งสัญญาณประสาท (neurotransmission) ปริมาณของ NO ที่มีปริมาณมากมีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการทำลายเซลล์ระบบประสาท (neurotoxin) ซึ่งเป็นผลให้เกิด neurodegenerative disease เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis เป็นต้น

Nitric oxide synthase (NOS) มี 3 isozyme คือ nNOS ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์ NO โดยการเปลี่ยน L-arginine เป็น NO ในจำนวนนี้ 2 isozyme พบได้ภายในเซลล์ประสาท และ endothelial cell ซึ่งพบในภาวะปกติ ส่วนอีกหนึ่ง isozyme คือ iNOS เป็น isozyme ที่พบได้มากและถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์มากในเซลล์ microglia เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารพวก cytokine, amyloid β หรือ lipopolysaccharide (LPS) ให้มีการสร้างสาร NO ในระบบประสาทส่วนกลางมากขึ้น ซึ่งจะเป็นพิษต่อระบบประสาท ซึ่งโดยทั่วไปการควบคุม

การสังเคราะห์เอนไซม์ nitric oxide synthase ถูกควบคุมในระดับ transcription โดยตัวที่สำคัญ คือ NF- κ B ซึ่งเป็น nuclear transcription factor ตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่ในการควบคุมให้มีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก cytokine นอกจากนี้ยังพบว่า signaling pathway ใน MAPK pathway ซึ่งเป็น pathway ที่สำคัญในการควบคุมให้มีการเหนี่ยวนำให้มีสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ที่เกิดจากภาวะ stress, endotoxin หรือจาก cytokines อื่น ๆ ซึ่ง MAPK pathway จะมี signaling cascade ที่แตกต่างกันและผ่าน signaling molecules ต่างกัน ได้แก่ ERK1/2, JNK และ p38

จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายระบบประสาทส่วน กลางโดยผ่านการทำงานของ nitric oxide synthase (iNOS) รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารแอมเฟตามีนในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ภายในเซลล์ว่าเกิดขึ้นในระดับใด และผ่าน signaling pathway ใด ซึ่งยังไม่มีรายงาน และข้อมูลที่ได้จะทำให้เราทราบว่าสารแอมเฟตามีนที่ออกฤทธิ์ในการทำลายระบบประสาทโดยทางหนึ่งคือโดยการทำลายเซลล์ระบบประสาทส่วนกลางโดยการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ NO จากการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS มากขึ้นโดยผ่าน signaling ใด ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการแนวทางการรักษาบำบัดผู้เสพติดอย่างถูกต้องในการจะเลือกหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้ง signaling pathway เป้าหมายที่เป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS เพื่อลดการทำลายเซลล์สมองซึ่งส่งผลให้มีการรักษาผู้ป่วยได้อย่างจำเพาะ รวมทั้งค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ในการรักษาก็น่าลดลง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (iNOS) ในเซลล์เพาะเลี้ยง microglia
2. เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารแอมเฟตามีนในการกระตุ้นภายในเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยง

วิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนการศึกษาความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยง microglia

ทดสอบความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีนต่อเซลล์ (cytotoxicity test) เทียบกับตัวทำละลาย โดยวิธี MTT assay โดยเตรียมเซลล์ microglia จำนวน 1×10^5 cells/ml มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เติมสารแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน รวมทั้งตัวทำละลายคือน้ำกลั่นทั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจากนั้นเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมงดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด เติมสารละลาย DMSO ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จะได้ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารแอมเฟตามีนที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Hong et al., 2002)

2. การศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (iNOS)

ศึกษาขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase ในเซลล์เพาะเลี้ยง microglia 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับสารแอมเฟตามีน กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ได้รับสารแอมเฟตามีน กับ กลุ่ม

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ได้รับสารแอมเฟตามีน แต่ได้รับสาร Lipopolysaccharide ที่เป็นสารกระตุ้นทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase ในเซลล์ microglia โดยทำการตรวจวัดการสังเคราะห์ยีนของ nitric oxide synthase โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ microglia ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37° ซ, 5% CO₂ incubator จำนวน 8 x 10⁵ cells/ml มาเพาะเลี้ยงใน 6 well plate ทั้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เติมสารทดสอบแอมเฟตามีนลงไปที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน และเวลาที่แตกต่างกัน โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ได้รับ lipopolysaccharide ซึ่งไปเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ยีนของ nitric oxide synthase และกลุ่มได้รับน้ำกลั่น จากนั้นทำการแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์แต่ละกลุ่ม จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA และมา amplified ด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีนของ nitric oxide synthase และ primer GAPDH สำหรับ control

3. การศึกษา signaling pathway การทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase

เมื่อได้รับสารแอมเฟตามีน หลังจากได้ข้อมูลสารแอมเฟตามีนออกฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (iNOS) ที่ขึ้นตอนใดแล้ว จะทำการศึกษาต่อไปว่า signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase ที่เกิดการกระตุ้นจากสารแอมเฟตามีน ได้แก่ MAPK signaling molecules ได้แก่ ERK, JNK, P38 โดยนำเซลล์ microglia มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 8 x 10⁵ cells/ml มาเพาะเลี้ยงใน 6 well plate ที่อุณหภูมิ 37° ซ, 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารทดสอบทั้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาทำการแตกเซลล์ จากนั้นปั่นแยกส่วน cell extract ไปวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford นำโปรตีนจำนวน 40 ไมโครกรัม ทำการแยกขนาดโปรตีนใน SDS-PAGE จากนั้น transfer โปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง nitrocellulose membrane จากนั้นเติมแอนติบอดีจำเพาะต่อ phosphorylated form ของ ERK, JNK, P38 ตามด้วย 2nd antibody และ stain ด้วย NBT และ BCIP จากผลการทดลองเราจะทราบว่าสารแอมเฟตามีนที่เราทำการทดสอบกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase โดยผ่าน

signaling pathway ใด โดยที่เราตรวจเช็ค band ที่เกิดขึ้นว่ามีการกระตุ้นและเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน ดูจากความเข้มของ band ของ phosphorylated form ของ signaling molecules จะเป็นตัวบ่งชี้ถึง signaling molecules ที่ active ที่ถูกกระตุ้นโดยสารแอมเฟตามีน ปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นแต่ละ band จะนำมาเปรียบเทียบโดยใช้ densitometer

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยง microglia

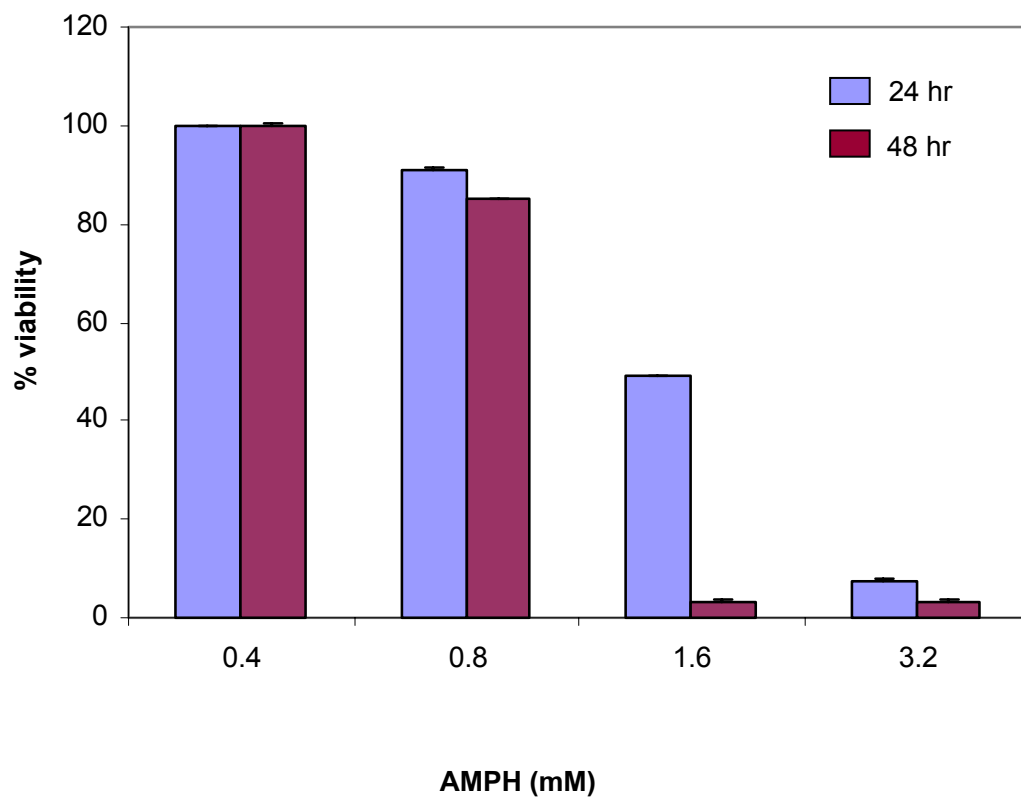
ผลการทดสอบ

การศึกษาความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยง microglia โดยใช้สารแอมเฟตามีนความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.4 - 3.2 mM พบว่า สารแอมเฟตามีนความเข้มข้น ตั้งแต่ 1.6 mM เป็นต้นไปจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ถึงร้อยละ 49 และ 3.4 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 3.2 mM สารแอมเฟตามีนจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถึงร้อยละ 7.5 และ 3.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2)

ดังนั้นในการศึกษาผลสารแอมเฟตามีนต่อการทำงานของเอนไซม์ iNOS จะเลือกความเข้มข้นสารแอมเฟตามีนที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือที่ต่ำกว่า 1.6 mM

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีน (AMPH) ต่อเซลล์ microglia ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

หลอดที่	Concentration of AMPH (mM)	% viability	% viability
		24 hr	48 hr
1	0.4 mM	100 $\pm$ 0.4	100 $\pm$ 0.2
2	0.8 mM	91.15 $\pm$ 0.8	85 $\pm$ 0.3
3	1.6 mM	49.06 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 0.4
4	3.2 mM	7.5 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.4

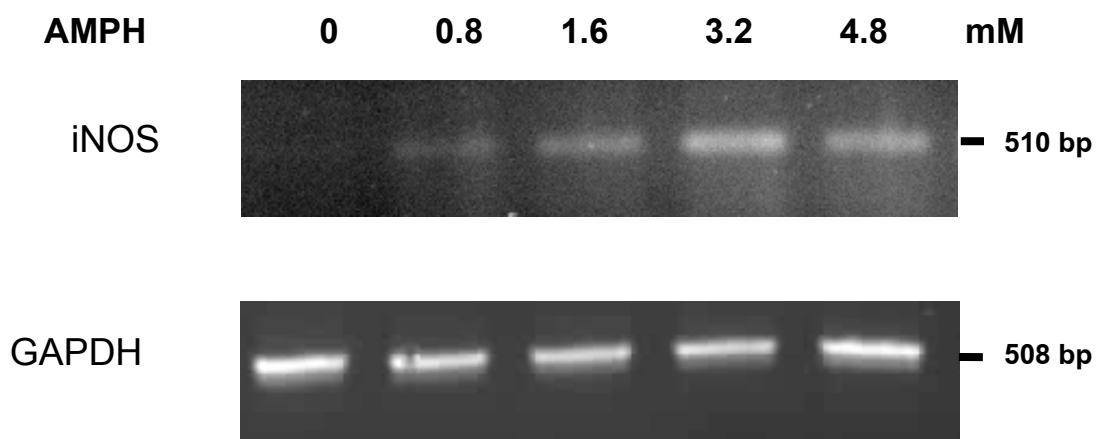


รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีน (AMPH) ที่ความเข้มข้น 0.4 – 3.2 mM ต่อเซลล์ microglia เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2. ศึกษาผลของสารแอมเฟตามีนต่อการเหนี่ยวนำ nitric oxide synthase (iNOS)

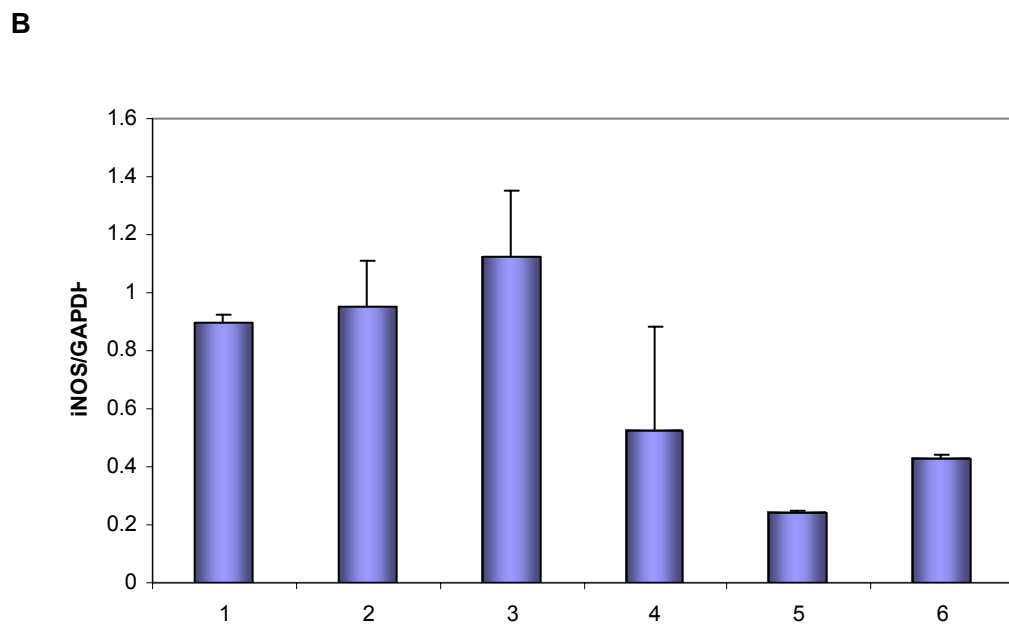
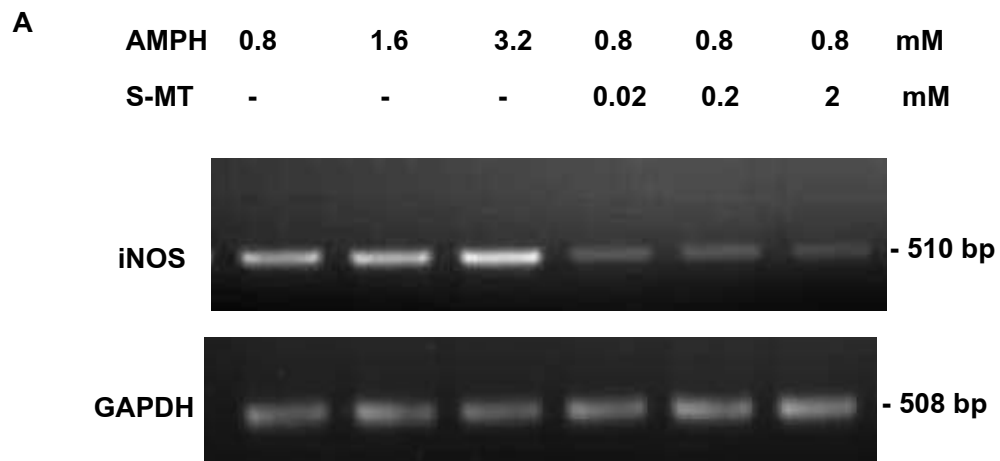
ผลการทดสอบ

ศึกษาการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ nitric oxide synthase (iNOS) จากการสังเคราะห์ iNOS gene ที่แยกได้จาก mRNA ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับสารแอมเฟตามีนเป็นตัวกระตุ้น ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.8 – 4.8 mM พบว่า สารแอมเฟตามีนมีผลในการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ iNOS gene เพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มของสารมากขึ้นด้วย (รูปที่ 2)



รูปที่ 3 การเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ iNOS gene จาก เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจากแอมเฟตามีนความเข้มข้นแตกต่างกัน

เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าสารแอมเฟตามีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ใช้สาร S-methylisothiourea (S-MT) ซึ่งเป็น inhibitor ของเอนไซม์ iNOS pretreatment 2 ชั่วโมงก่อนเติมสารแอมเฟตามีน โดยใช้ S-MT ความเข้มข้น 2, 0.2, 0.02 mM จากนั้นดูการสังเคราะห์ iNOS gene ที่แยกได้จาก mRNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง (รูปที่ 4) จากผลการทดลองพบว่า สารแอมเฟตามีนสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ iNOS gene มากขึ้น เมื่อให้ S-MT pretreatment ก่อนเติมสารแอมเฟตามีนลงไป พบว่าสามารถลดการสังเคราะห์ iNOS gene ได้ ผลที่ได้ สามารถสรุปได้ว่า สารแอมเฟตามีนมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ iNOS gene ได้ ซึ่งถือว่าสังเคราะห์ NO ออกมานั่นเอง



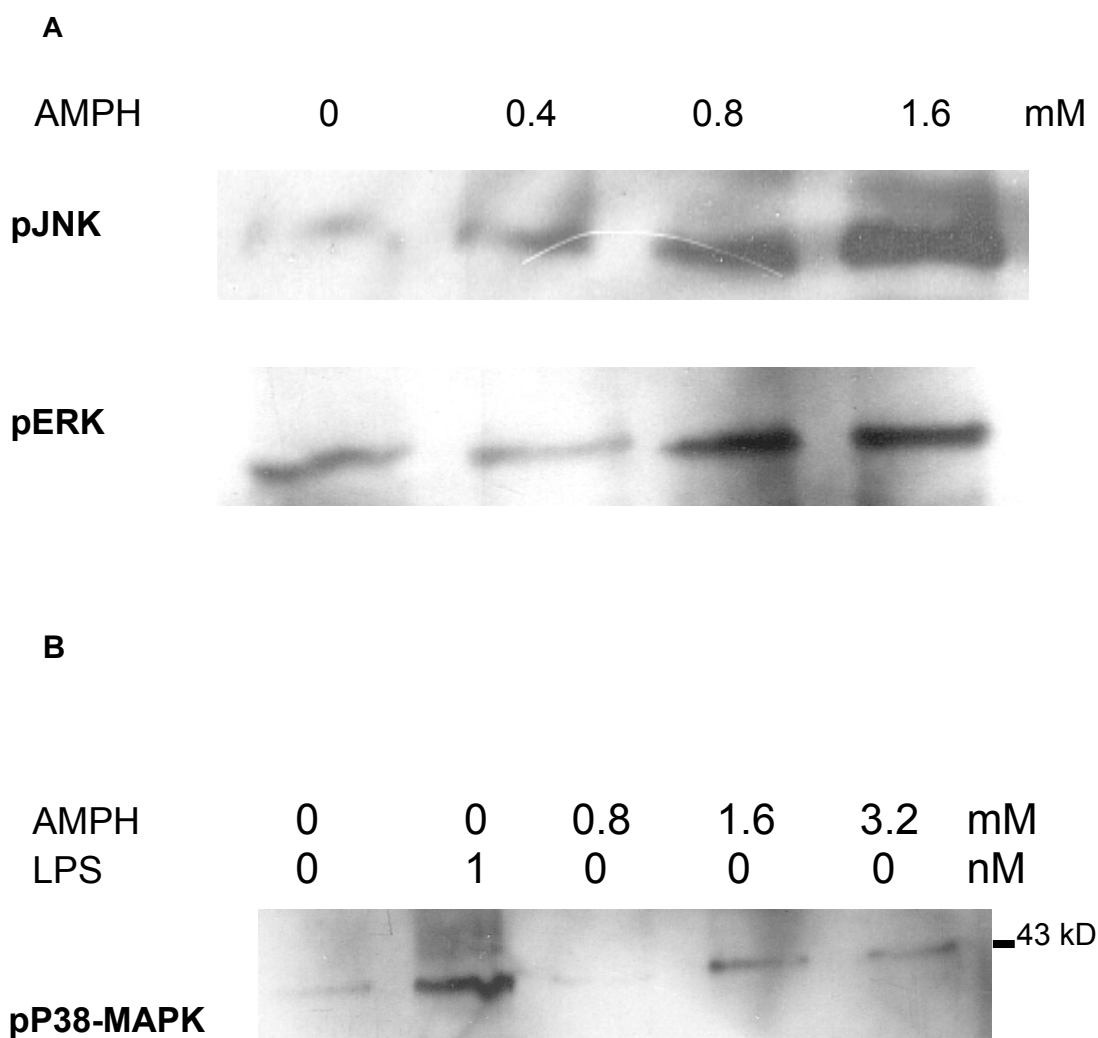
รูปที่ 4 A. ภาพแสดงผล RT-PCR ของ iNOS gene จากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจากแอมเฟตามีน และ เซลล์ที่ได้รับ S-MT pretreatment ก่อนได้สารแอมเฟตามีน

B. กราฟแสดงผลที่ได้จากการ densitometer ของความหนาของ band ที่ได้

3. การศึกษา signaling pathway การทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase

ผลการทดสอบ

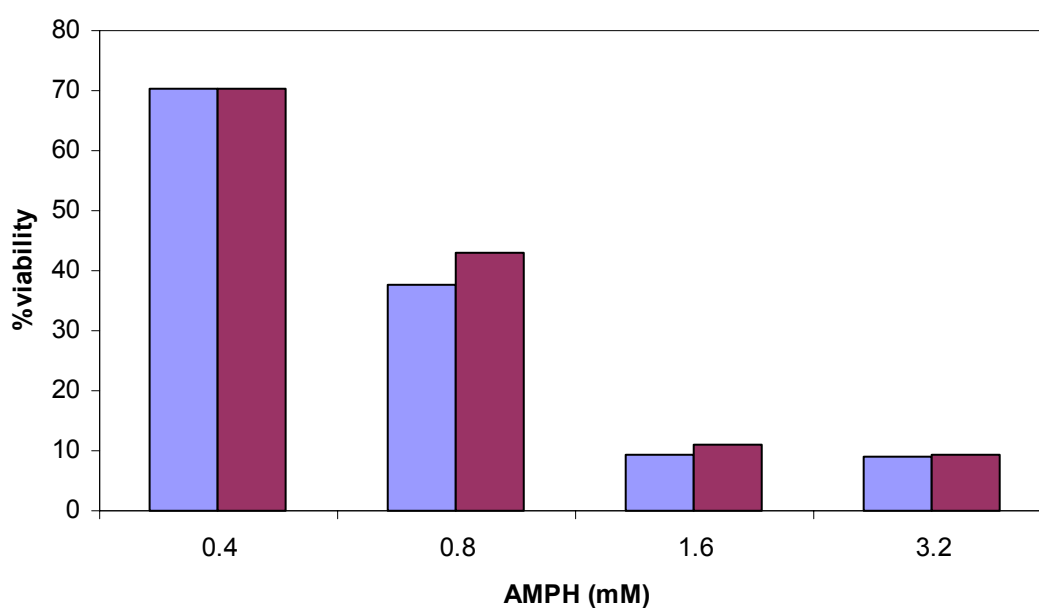
ในการทดลองต่อไปเป็นการศึกษา signaling pathway ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสังเคราะห์ iNOS gene เมื่อได้รับสารแอมเฟตามีนเป็นตัวกระตุ้น โดยศึกษา MAPK signaling pathway โดยทำการวัดปริมาณของ phosphorylated form ของ JNK, ERK, p38 ซึ่งเป็น downstream ของ MAP kinase signaling pathway ผลการทดสอบแสดงดังรูป 5



รูปที่ 5 แสดง phosphorylated form ของ pJNK, pP38 และ pERK ของเซลล์ microglia เมื่อได้รับสารแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้นต่างกัน

จากผลที่ได้พบว่าสารแอมเฟตามีนสามารถกระตุ้น MAP kinase signaling pathway ใน microglia ได้ ซึ่งเป็นแบบ dose-dependent

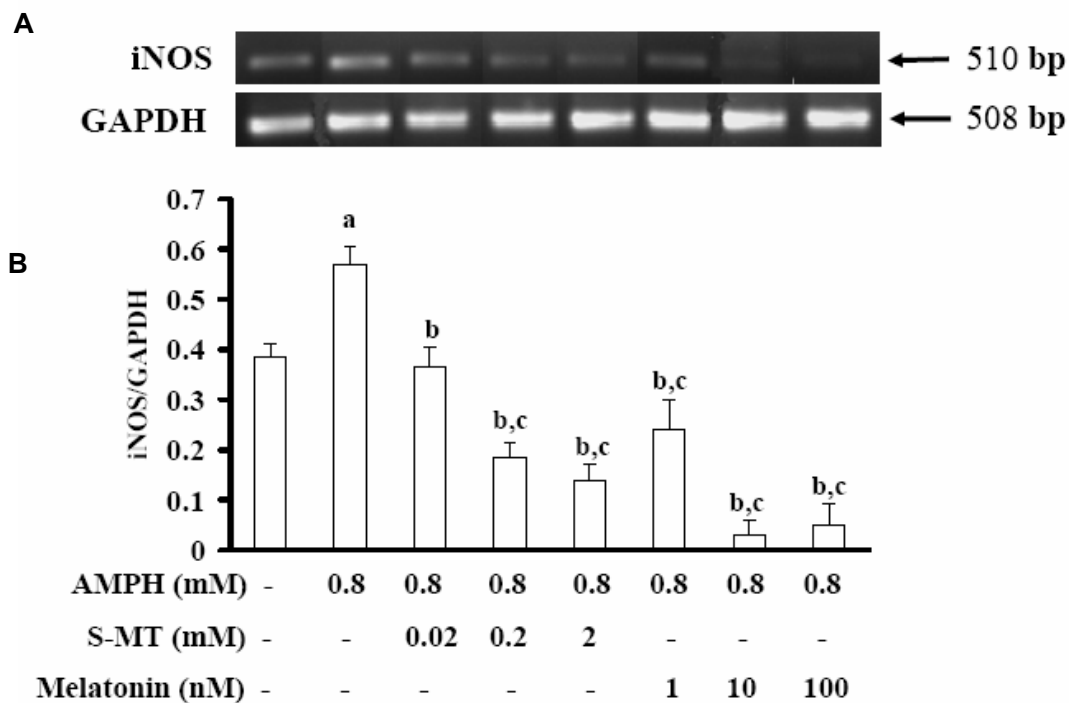
จากผลการทดลองที่ได้ เราพบว่าสารแอมเฟตามีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์ microglia ให้สังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ได้ นั้นหมายถึงปริมาณของ NO มากด้วยเช่นกัน ซึ่ง NO เป็นอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์สมองได้ ในการทดลองต่อไปได้ใช้สาร melatonin ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่ามีฤทธิ์ antioxidant มาทดสอบในการลดความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีน พบว่าเมื่อให้สาร melatonin แก่เซลล์ ก่อนเติมสารแอมเฟตามีน สามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ เมื่อทำการทดสอบ MTT assay (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงผลการทดสอบ melatonin ต่อการลดความเป็นพิษของสารแอมเฟตามีน (AMPH) ที่

ความเข้มข้น 0.4 – 3.2 mM ต่อเซลล์ microglia เวลา 48 ชั่วโมง

นอกจากนี้ทดสอบฤทธิ์ของสารเมลาโท닌ต่อการแสดงออกของยีนไนตริกออกไซด์เมื่อได้รับสารแอมเฟตามีน จากผลการทดลองพบว่าสารเมลาโท닌สามารถลดการแสดงออกของยีนไนตริกออกไซด์ได้ เป็นแบบ dose-dependent (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 A. ภาพแสดงผล RT-PCR ของ iNOS gene จากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นสารเมลาโท นิน ก่อนการกระตุ้นจากแอมเฟตามีน และ เซลล์ที่ได้รับ S-MT pretreatment ก่อนได้สารแอมเฟตามีน

B. กราฟแสดงผลที่ได้จากการ densitometer ของความหนาของ band ที่ได้

สรุปผลการทดลอง

1. แอมเฟตามีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของ microglia cells โดย มีการหลั่งสารพวก nitric oxide จากการการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase ออกมา
2. สาร nitric oxide ที่หลั่งออกมาจาก microglia cells ในปริมาณมาก สามารถไปทำลายเซลล์ประสาททำให้เกิดภาวะ neurodegenerative diseases ตามมาได้มากที่สุด
3. แอมเฟตามีนสามารถกระตุ้นการทำงานของ MAPK signaling pathway ภายใน microglia cells โดยกระตุ้นกระบวนการ phosphorylation ให้แก่ ERK, JNK และ p38 ได้ ซึ่งเป็น signaling pathway ของกระบวนการเกิด apoptosis ของเซลล์
4. สารเมลาโทนิน สามารถลดการสังเคราะห์เอนไซม์ nitric oxide synthase ได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษากลไกการทำงานต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแอมเฟตามีนกระตุ้น microglia cells ให้มีการสังเคราะห์ NO ออกมาโดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสารแอมเฟตามีนจะไปกระตุ้นให้มีการหลั่งสารพวก proinflammatory factor ตัวอื่นๆ ออกมาอีกหรือไม่ ซึ่งสารเหล่านี้จะเป็นตัวชี้วัดกระบวนการเกิด neuroinflammation ในเซลล์ประสาท
2. สารเมลาโทนินสามารถลดการสังเคราะห์ NO ได้ จึงเป็นที่น่าสนใจถึงกลไกการทำงานของเมลาโทนินต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Bowyer, J. F. (2000) Neuronal degeneration in the limbic system of weanling rats exposed to saline, hyperthermia or d-amphetamine. *Brain Res* 885, 166-171.
- Bowyer, J. F., DeLongchamp, R. R. and Jakab, R. L. (2004) Glutamate N-methyl-D-aspartate and dopamine receptors have contrasting effects on the limbic versus the somatosensory cortex with respect to amphetamine-induced neurodegeneration. *Brain Res* ,
- Chen, C. J., Raung, S. L., Liao, S. L., Chen, S. Y. (2004) Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Biochemical Pharmacology* 67, 957-965.
- Creese, I. and Iversen, S. D. (1975) The pharmacological and anatomical substrates of the amphetamine response in the rat. *Brain Res* 83, 419-436.
- Emerit, J., Edeas, J. and Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 58, 39-46.
- Eun, S. Y., Hong, Y. H., Kim, E. H., Jeon, H., Suh, Y. H., Lee, J. E., Jo, C., Jo, S. A., Kim, J. (2004) Glutamate receptor-mediated regulation of c-fos expression in cultured microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 320-327.
- Hong, C. H., Hur, S. K., Oh, O-J., Kim, S. S., Nam, K. A. and Lee, S. K. (2002). Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J. Ethnopharmacology*. 83: 153-159
- Iravani, M. M., Liu, L., Rose, S., Jenner, P. (2004) Role of inducible nitric oxide synthase in N-methyl-D-aspartic acid-induced strio-nigral degeneration. *Brain Res* 1029, 103-113.
- Ishibashi, N., Prokopenko, O., Reuhl, K. R., Microchnitchenko, O. (2002) Inflammatory response and glutathione peroxidase in a model of stroke. *J. Immunol* 168, 1926-1933.

- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., et al. (1997). Cancer chemoprevention activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275: 218-220.
- Jayanthi, S., Deng, X., Bordelon, M., McCoy, M. T. and Cadet, J. L. (2002) Methamphetamine causes differential regulation of pro-death and anti death Bcl-2 genes in the mouse neocortex. *FASEB J* 15, 1745-1752.
- Lee, H., Jeong, J., Son, E., Mosa, A., Cho, G. J., Choi, W. S., Ha, J. H., Kim, I. K., Lee, M. G., Kim, C. Y., Suk, K. (2004) Ethanol selectively modulates inflammatory activation signaling of brain microglia. *J. Neuroimmunol* 156, 88-95.
- Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J.S. and Liu, b. (2002) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 81, 1285-1297.
- Liberatore, G. t., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., McAuliffe, W. G. (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 5, 1403-1409.
- McGeer, P. L., McGeer, E. G. (2004) Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders* 10, 53-57.
- Miller, D. B. and O'Callaghan, J. P. (1996) Neurotoxicity of D-amphetamine in the C57BL/6j and Cd-1 mouse. Interactions with stress and the adrenal system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 801, 148-167.
- Miyagishi, R., Kikuchi, S., Fukazawa, T., Tashiro, K. (1995) Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *J. Neurol. Sci* 129, 223-227.
- Perry, V. H. (2004) The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity* 18, 407-413.

- Pocock, J.M. and Liddle, A. C. (2001) Microglia signaling cascades in neurodegenerative disease. *Prog. Brain Res* 132, 555-565.
- Schmued, L. C. and Bowyer, J. F. (1997) Methamphetamine exposure can produce neuronal degeneration in mouse hippocampal remnants. *Brain Res* 759, 135-140.
- Thomas, D. M., Dowgiert, J., Geddes, T. J., Dina, F. V., Liu, X., Kuhn, D. M. (2004) Microglia activation is a pharmacologically specific marker for the neurotoxic amphetamines. *Neurosciences Letters* 367, 349-354.
- Vilhardt, F. (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *The international of Journal of Biochemistry and cell biology* 37, 17-21.
- Wu, D. c., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H. (2003) NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4 phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6145-6150.
- Wyss-Coray, T. and Mucke, L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease-a double-edged sword. *Neuron* 35, 419-432.

Output ที่ได้จากโครงการ

Manuscript ส่งไปวารสาร Neuroscience Letters มีค่า impact factor 2.092

ภาคผนวก

Manuscript ส่งไปวารสาร Neuroscience Letters

Melatonin inhibits D-Amphetamine-induced nitric oxide synthase

mRNA overexpression in microglial cell lines

Jiraporn Tocharus^a, Sukumal Chongthammakun^{b,c} and Piyarat Govitrapong^{c,d,e}

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University,

Phitsanulok 65000, ^bDepartment of Anatomy, ^cCenter for Neuroscience and

^dDepartment of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok ,

^eNeuro-behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand

Number of page: 15

Number of figure: 3

Key words: nitric oxide synthase, D-amphetamine, microglial, melatonin, S-methyisothiurea, Parkinson's disease, immune

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education to JT and by a Senior Research Scholar Fellowship from TRF and a Mahidol University Research Grant to PG.

Abstract

D-Amphetamine (AMPH) is a well-known drug of abuse and neurotoxin. High dose exposure of AMPH results in damage of dopaminergic and serotonergic pathways. Low dose exposure to AMPH over a prolonged period is associated with the development of Parkinson's disease (PD). AMPH induced massive release of dopamine from synaptic vesicles and then generated the reactive oxygen species (ROS). Furthermore, reactive nitrogen species, nitric oxide (NO) which is a short-lived free radical produced in the central nervous system (CNS) mediated by activation of microglia, appears to play a critical role in stress-induced brain damage. In the present study, we examined the involvement of NO in the neurotoxic effects of AMPH, therefore the contribution of altered nitric oxide synthase (NOS) enzyme function was suspected. AMPH at 0.4 mM to 3.2 mM concentration has cytotoxic effect on HAPI microglial cells. The effect of AMPH towards the increment of iNOS mRNA in HAPI microglial cells is concentration dependent. Pretreatment with S-methylisothiourea (S-MT), a selective iNOS inhibitor or melatonin counteracted the overexpression of iNOS induced by AMPH in a concentration-dependent manner. These results suggest that AMPH could activate microglial cells which represent the resident macrophage population within the CNS similar to other immunogens. Thus, the induction of iNOS by AMPH in microglial cells may be an important source of NO in CNS inflammatory disorders associated with the death of neurons and oligodendrocytes. Administration of exogenous melatonin will be beneficial as it reduces iNOS mRNA expression, therefore, it probably can be used as a neuroprotective agent in AMPH- or other immunogens-induced toxicity.

D-amphetamine (AMPH) is a well-known drug of abuse and neurotoxin. It has been reported that AMPH produce long-term damage to dopaminergic (DA) and serotonergic nerve terminals in multiple brain areas [1, 2]. AMPH increased the superoxide and lipid peroxide formation in cortical and hippocampal submitochondrial particles *in vivo* [3]. The administration of antioxidants α -phenyl-N-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine partially prevented amphetamine-induced DA depletion and lipid peroxide in rat striatum [4]. Recently, it has been suggested that AMPH-induced neurotoxicity involves not only the production of reactive oxygen species but also reactive nitrogen species [5]. Microglial cells, the brain macrophages, are the resident immune cells of the central nervous system (CNS). They are activated in response to brain injury from inflammation, damage, or disease and then, release neurotoxic factors including pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β as well as the free radicals nitric oxide (NO $\cdot$) and superoxide anion (O $_2^{\cdot-}$) [6]. Among these, NO has been implicated in the etiopathology of several neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease. NO, a short-lived free radical is formed from arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). Three major isoforms of this enzyme have been identified and characterized in the CNS: the neuronal (nNOS), the endothelial (eNOS), and the inducible (iNOS) forms [7]. The induction of iNOS in microglial cells in the CNS may be an important source of NO in CNS inflammatory disorders associated with the death of neurons and oligodendrocytes [8]. iNOS are inducible after stimulation with immunogens such as lipopolysaccharide (LPS), cytokines, and amyloid β . Thomas et al showed that methamphetamine could activate microglial in dose and time-dependent response that

leaded to neurotoxic effect [9]. Moreover, several studies have shown that NOS inhibitors provide a protection against amphetamine-induced dopaminergic and serotonergic neurotoxicity [10,11]. The neutralization of free radicals by antioxidant agents provides significant neuroprotection [12,13]. Melatonin, a multifunctional signaling molecule predominantly synthesized in the pineal gland, performs several important physiological roles in mammals such as transmission of photoperiodic information, regulation of seasonal reproductive cycles, immune enhancement and inhibition of cell proliferation. Melatonin and its metabolites display important antioxidant properties by reacting with reactive oxygen and nitrogen species [14,15,16]. Moreover, it plays a role in the upregulation of antioxidant and downregulation of prooxidant enzymes [17,18]. The neuroprotective effects of melatonin on amphetamine-induced neurotoxicity have been shown in cultured human dopaminergic neuroblastoma SK-N-SH cells by our group [19]. Attempts have been made in this study to investigate whether amphetamine can induce iNOS expression and whether melatonin can inhibit this effect in microglial.

In this study, HAPI microglial cells which were generously provided by Dr. James R. Connor (Hershey Medical Center, Hershey, PA) were used. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) except Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) obtained from GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD), RNA isolation kit and reverse transcriptase PCR obtained from Invitrogen (Invitrogen, Calsbad, CA, USA). Cells were maintained in DMEM supplemented with FBS (10%, v/v), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) at 37°C under a humidified 5% CO₂ and 95% air atmosphere. Cells were cultured at a

density of 1.5×10^5 cells/ml on 96-well plates. In all experiments, cells were grown overnight before any treatment. First, we investigated the toxic effects of AMPH on HAPI microglial cells. Cell viability was measured by quantitative colorimetric assay with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). HAPI microglial cells in 96 well plates were treated with different concentration of AMPH (0.4 – 3.2 mM) for 24 and 48 h. Then, the medium was removed and 10 mg/ml MTT was added to each well and further incubated for 4 h at 37°C under a humidified 5% CO₂. The resulting MTT-formazan product was dissolved by the addition of 100 µl of DMSO. The amount of formazan was determined by measuring the absorbance at 540 nm with a microplate reader (Bio-Tek, Instruments, Winooski, VT). Experimental data were analyzed using ANOVA (analysis of variance) followed by Student's t-test to compare experimental and control groups. Sigma-stat statistical software was employed. All values are represented as mean $\pm$ S.E.M. The significance was taken when p-values were less than 0.05. The result showed that AMPH induced cell death in a concentration and time dependent manner. The viability of cells was 100, 91, 49, 7.5 % and 100, 85, 3.4, 3.4 % when cells were treated with 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mM AMPH for 24 and 48 h, respectively (Fig. 1). The maximum cytotoxic effect was observed in cells treated with AMPH at the concentration of 1.6 and 3.2 mM for 48 h. From this result, AMPH at the concentration of 0.8 mM was subsequently used to examine the effects of AMPH on the expression of iNOS further. To investigate the effects of AMPH on iNOS mRNA, total RNA isolated from AMPH treated HAPI microglial cells were amplified with iNOS primers. Microglial cells in 6-well plate were incubated with AMPH for 6 h. Total RNA was isolated using TRIzol according to the manufacturer's protocol.

A volume of 1 µg total RNA from each sample was subjected to reverse transcription using Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Calsbad, CA, USA). PCR amplification was performed in a reaction volume of 25 µl containing 2 µl of cDNA product and HotStar TaqTM DNA polymerase (Qiagen, Germany) using Perkin-Elmer 9700 thermal cycler. Amplification of the constitutively expressed enzyme D-glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. The oligonucleotide primers used were; iNOS, 5' TCACTGGGACAGCACAGAAT (sense) and 5'TGTGTCTGCAGATGTGCTGA (antisense) and GAPDH, 5'TCCCTCAAGATTGTGAGCAA (sense) and 5' AGATCCACAACGGATACATT (antisense). The temperature cycling condition of amplification were as follows : for iNOS and GAPDH, 15 min at 95°C, then 25 cycles of 94°C for 40s, 55°C for 40 s, 72°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 10 min. The amplification products were electrophoresed on 1.0 % agarose gel, visualized by ethidium bromide staining, and photographed Gel images were scanned using an image analysis system. Gel images were scanned using an image analysis system (Gel Doc 1000; Bio-Rad, Hercules, CA). The intensities of specific PCR bands were quantitated in relation to GAPDH bands amplified from the same cDNA using Gene Tools analysis software (Syngene, Cambridge, UK). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M from three independent experiments. The result showed that AMPH concentration-dependently increased iNOS mRNA in HAPI microglial cells after 6 hr of incubation (Fig.2). AMPH induces iNOS gene expression in microglial cells generate large quantities of nitric oxide (NO). This result indicated that amphetamine induced iNOS over expression at the transcriptional level or the pathway upstream of iNOS gene. Activation of microglial

by LPS or cytokines causes neuronal death in mixed glial/neuron cocultures by a mechanism involving glial iNOS expression and release of NO [20]. It has been reported that iNOS is induced in various types of CNS injuries and disease such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease [21,22,23]. Our finding indicates that AMPH could activate microglial cells which represent the resident macrophage population within the CNS similar to other immunogens. Therefore, induction of iNOS by AMPH in microglial cells may be an important source of NO in CNS inflammatory disorders associated with the death of neurons and oligodendrocytes.

Inhibition of NO overproduction has been proved to increase cell survival in several models. For example, addition of iNOS antagonist was able to prevent rat amoeboid microglial from lysing oligodendrocytes *in vitro* [24]. Another study reported that in neuronal cells co-cultured with murine neonatal microglial, administration of iNOS inhibitor also prolong the survival of neuronal cells [25]. S-methylisothiourea (S-MT), a selective iNOS inhibitor was used in the present study. The result showed that pretreated S-MT inhibited the expression of iNOS mRNA caused by 0.8 mM AMPH in a concentration-dependent manner (Fig. 3). The result further supports AMPH-induced NO over expression in microglial. Higher concentrations, 0.2 and 2 mM S-MT inhibited the basal level of iNOS mRNA. Pretreatment with 1 nM melatonin significantly counteracted iNOS mRNA over expression induced by AMPH. Furthermore, melatonin at 10 or 100 nM not only abolished the AMPH-induced iNOS mRNA production but also significantly reduced the basal level of iNOS mRNA expression. Our data are compatible to the previous report [26] demonstrated that 1 nM melatonin which approximates the physiological concentration of the pineal hormone at night,

significantly inhibited NOS activity *in vitro*. Moreover, *in vivo* studies showed that during night, when endogenous melatonin levels are elevated, resulted in a significant decrease of NOS activity. Melatonin reduced both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation *in vitro* [27]. Several studies also reported that melatonin inhibited iNOS expression caused by a variety of stimuli such as tumor necrosis factor (TNF- α), phorbol ester, and irradiation [28,29,30]. Melatonin at concentration in the 1 μ M range reduced nitric oxide production in immunostimulated macrophages. It was due to an inhibition of iNOS associated with inhibition of the transcription factor nuclear kappa B (NF κ B) [31]. The results from the present and numerous previous studies suggest that melatonin may modulate immune function either directly or indirectly on the immune cells. The present study showed that the up-regulated iNOS mRNA expression in response to AMPH stimulation, was inhibited by the addition of melatonin in cultured microglial. The results give a potentially implication for the use of melatonin as a neuroprotective agent in AMPH- or other immunogens-induced toxicity in microglial. The possible therapeutic and physiopathological implications of immunoenhancing properties of melatonin remain to be further investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education to JT and by a Senior Research Scholar Fellowship from TRF and a Mahidol University Research Grant to PG.

References

- [1] J. L. Cadet, S. Jayanthi, X. Deng, Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis, *FASEB J.* 17 (2003) 1775- 1788.
- [2] J. P. O'Callaghan, D. B. Miller, Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 741-751.
- [3] B. N. Frey, S. S. Valvassori, K. M. Gomes, M. R. Martins, F. Dal-Pizzol, F. Kaczynski, J. Quevedo, Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure, *Brain Res.* 1097 (2006) 224-229.
- [4] F. J. Wan, C. S. Tung, I. S. Shiah, H. C. Lin, Effects of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine on hydroxyl radical formation and dopamine depletion in the rat striatum produced by d-amphetamine, *Eur Neuropsychopharmacol.* 16 (2006) 147-153.
- [5] V. Bashkatova, M. M. Kraus, A. Hornick, A. Philippi, H. Prast, -nitroindazole, nNOS inhibitor, attenuates amphetamine-induced amino acid release and nitric oxide generation but not lipid peroxidation in the rat brain, *J Neural Transm.* 112 (2005)779-788.
- [6] B. Liu, J. S. Hong, Role of microglial in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention, *J Pharmacol Exp Ther.* 304 (2003) 1-7.
- [7] R. G. Knowles, S. Moncada, Nitric oxide synthase in mammals, *Biochem. J.* 298 (1994) 249-258.
- [8] A. Bal-Price, G. C. Brown, Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity, *J Neurosci.* 21 (2001) 6480 – 6491.

- [9] D. M. Thomas, P. D. Walker, J. A. Benjamins, T. J. Geddes, D. M. Kuhn, Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation, *J Pharmacol Exp Ther.* 311 (2004) 1-7.
- [10] V. Bashkatova, M. M. Kraus, A. Vanin, A. Hornick, H. Prast, Comparative effects of NO-synthase inhibitor and NMDA antagonist on generation of nitric oxide and release of amino acids and acetylcholine in the rat brain elicited by amphetamine neurotoxicity, *Ann N Y Acad Sci.* 1025 (2004) 221- 230.
- [11] S. F. Ali, Y. Itzhak, Effects of 7-nitroindazole, an NOS inhibitor on methamphetamine-induced dopaminergic and serotonergic neurotoxicity in mice, *Ann N Y Acad Sci.* 844 (1998) 122- 130.
- [12] M. S. Levi, M. A. Brimble, A review of neuroprotective agents, *Curr Med Chem.* 11 (2004) 2383-2397.
- [13] A. Santamaria, A. Flores-Escartin, J.C. Martinez, L. Osorio, S. Galvan-Arzate, J. Pedraza-Chaverri, P. D. Maldonado, O. N. Medina-Campos, M. E. Jimenez-Capdeville, J. Manjarrez, C. Rios, Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems, *Free Radic Biol Med.* 15 (2003) 418-427.
- [14] R. J. Reiter, D. X. Tan, C. Osuna, E. Gitto, Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress, *J Biomed Sci.* 7(2000) 448-458.
- [15] D. X. Tan, L. C. Manchester, R. J. Reiter, B. F. Plummer, J. Limson, S. T. Weintraub, W. Qi, Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation, *Free Radic Biol Med.* 29 (2000) 1177-1185.
- [16] D. X. Tan, L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores, R. J. Reiter, One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?, *J Pineal Res.* 42 (2007) 28-42.

- [17] C. Tomaz-Zapico, A. Coto-Montes, A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes, *J Pineal Res.* 39 (2005) 99-104.
- [18] C. Rodriguez, J. C. Mayo, R. M. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martin, R. J. Reiter, Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, *J Pineal Res.* 36 (2004) 1 – 9.
- [19] S. Klongpanichapak, P. Phansuwan-Pujito, M. Ebadi, P. Govitrapong, Melatonin protects SK-N-SH neuroblastoma cells from amphetamine-induced neurotoxicity. *J Pineal Res.* (2007) accepted.
- [20] A. Bal-Price, G. C. Brown, Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity, *J Neurosci.* 21(2001) 6480-6491.
- [21] S.C. Lee, M.L.Zhao, A. Hirano, D.W. Dickson, Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirono bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques, *J Neuropathol Exp Neurol.* 58(1999) 1163-1169.
- [22] M.A. Moro, A. Cardenas, O. Hurtado, J.C. Leza, I. Lizasoain, Role of nitric oxide after brain ischemia, *Cell Calcium.* 36(2004) 265-275.
- [23] S. Singh, T. Das, A. Ravindran, R.K. Chaturvedi, Y. Shukla, A.K. Agarwal, M.Dikshit, Involvement of nitric oxide in neurodegeneration: a study on the experimental models of Parkinson's disease, *Redox Rep.* 10(2005) 103-109.
- [24] J. E. Merrill, L. J. Ignarro, M. P. Sherman, J. Melinek, T. E. Lane, Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide, *J Immunol.* 151 (1993) 2132 – 2141.

- [25] C. C. Chao, S. Hu, T. W. Molitor, E. G. Shaskan, P. K. Peterson, Activated microglial mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism, *J Immunol.* 149 (1992) 2736-2741.
- [26] I. Bettahi, D. Pozo, C. Osuna, R.J. Reiter, D. Acuna-Castroviejo, J.M. Guerrero, Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus, *J Pineal Res* 20 (1996):205-10.
- [27] E. Sewerynek, D. Melchiorri, L. Chen, R. J. Reiter, Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide –induced lipid peroxidation in vitro, *Free Rad Biol Med.* 19 (1995) 909-909.
- [28] S. Rodriguez, C. Leal, E. Portilla, N. Olivares, J. Muniz, Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide, *J Surg Res.* 100 (2001) 141-149.
- [29] M. Serin, H. Gulbas, I. Gurses, H.S. Erkal, N. Yucel, The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model, *Int J Radiat Biol.* 83 (2007) 187-193.
- [30] A. Carrillo-Vico, P.J. Lardone, L. Naji, J. M. Fernandez-Santos, I. Martin-Lacave, J.M. Guerrero, J.R. Calvo, Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects, *J Pineal Res.* 39(2005) 400-408.
- [31] E. Gilad, H.R. Wong, B. Zingarelli, L. Virag, M. O'Connor, A. L. Salzman, C. Szabo, Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: Role of inhibition of NF κ B activation, *FASEB J.* 12 (1998) 685-693.

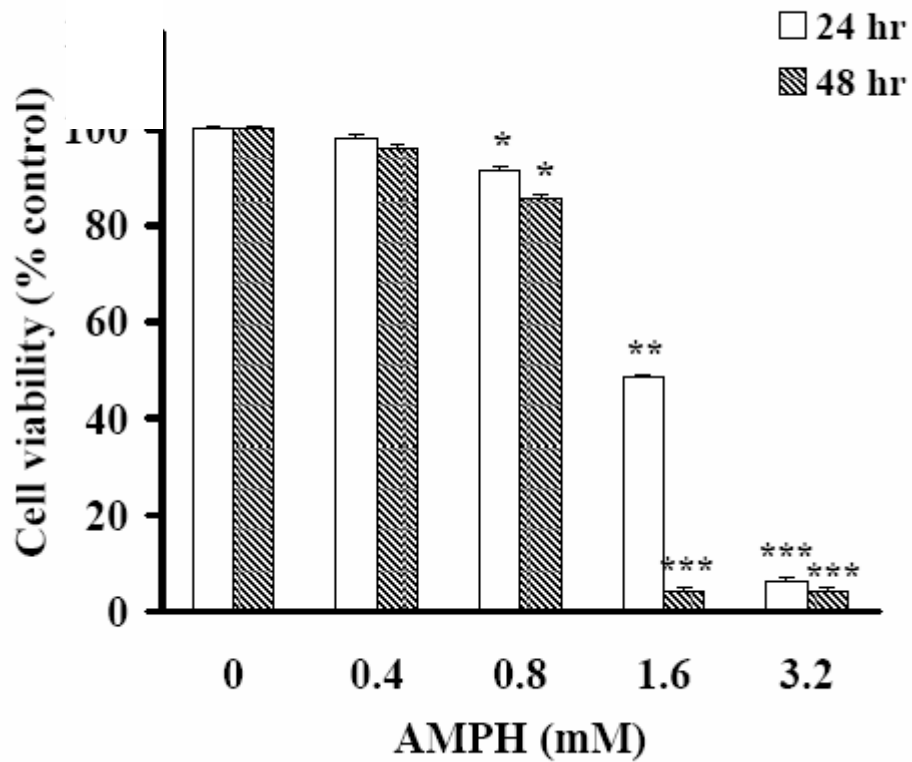


Fig.1. Concentration and time dependent effects of amphetamine on cell viability in HAPI microglial. Cells were treated with various concentration of amphetamine (0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mM) for 24 and 48 hr. Cell viability was assessed by the MTT assay and presented as percent of untreated controls. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. of three separate determinations. $p < 0.05$ * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ *** significance compared with untreated controls.

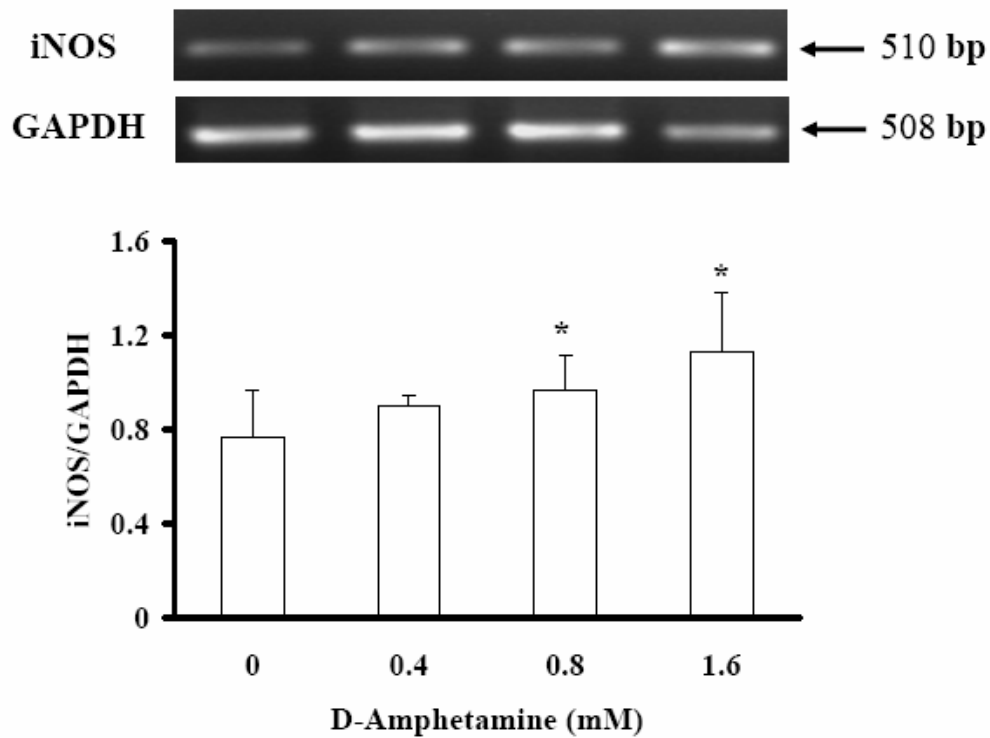


Fig. 2. Concentration dependent effect of amphetamine on iNOS mRNA expression in HAP1 microglial. Cells were treated with various concentration (0.4, 0.8 and 1.6) mM amphetamine for 6 hr. Cells were harvested, total RNAs were extracted and subjected to semiquantitative RT-PCR. GAPDH is used as reference to control equal loading. Values are mean $\pm$ S.E.M. from three separated experiments which represent relative iNOS levels normalized with GAPDH. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

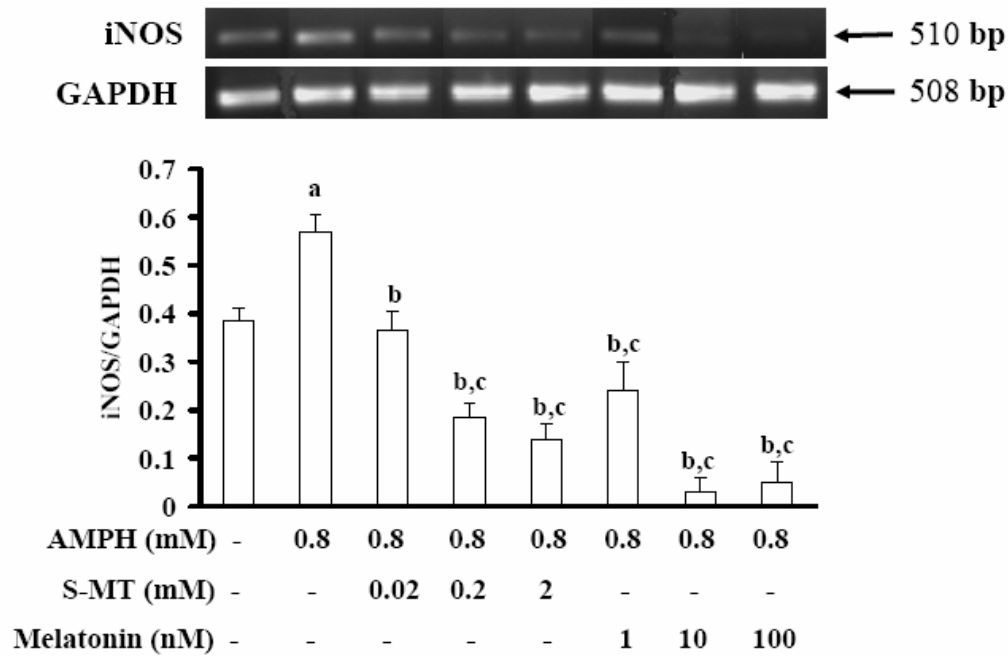


Fig. 3 The inhibitory effect of S-methylisothiourea/or melatonin on amphetamine-induced iNOS mRNA expression in HAPI microglial. Cells were pretreated with various concentrations (0.02, 0.2 and 2 mM) of 5-methyl isothiourea (S-MT) or with 1, 10, and 100 nM of melatonin followed by treatment of 0.8 mM amphetamine, for 6 hr. Cells were harvested, total RNAs, were extracted and subjected to semiquantitative RT-PCR. Values are mean $\pm$ SEM from three separate experiments which represent relative iNOS mRNA levels normalized with GAPDH.