



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์และ
การออกฤทธิ์ของ local hippocampal estrogen ซึ่งสัมพันธ์กับ
กระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาท hippocampus

โดย ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

มิถุนายน พ.ศ. 2556

สัญญาเลขที่ MRG5480211

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์และ
การออกฤทธิ์ของ local hippocampal estrogen ซึ่งสัมพันธ์กับ
กระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาท hippocampus

ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5480211

Project Title : The effects of activated microglia-mediated inflammation on the production and function of local hippocampal estrogen that associate with the synaptic plasticity in hippocampal neurons

Investigator : Dr.Siriporn Chamniansawat
Division of Anatomy, Department of Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Science, Burapha University

E-mail Address : siripornc@buu.ac.th

Project Period : 2 years

Memory loss is one of the primary consequences of aging. Deficits mainly include specific impairments in hippocampal-dependent learning and memory. Aging changes in microglia have been hypothesized to play an important role in the pathogenic mechanism underlying age-related memory impairment. Microglial aging exhibited both morphological changes and alterations in immunophenotypic expression by up-regulated in activated microglial markers. However, the mechanism underlying age-related microglial activation on memory dysfunction is still largely unknown. The present study aims to demonstrate the effects and mechanisms of activated microglia on processes of memory formation in H19-7 hippocampal neuron. Initially, the pattern of estrogen synthesis was clearly shown in H19-7 hippocampal neuron. Hippocampal-derived estrogen plays a priming role for systemic estrogen function. In microglia-neuron co-culture techniques, the result showed that activated microglia significantly inhibited expression of synaptic marker proteins (Arc, PSD95, and synaptophysin) on H19-7 hippocampal neuron, indicating that microglia activation could be inhibited synaptic plasticity and memory formation. Furthermore, the results also showed that activated microglia decrease the number of synaptic marker protein via an inhibition of hippocampal estrogen production and estrogen receptor expression in H19-7 hippocampal neuron. In summary, the present study proposed a novel mechanism that microglia activation inhibits hippocampal-derived estrogen-dependent memory formation that could be targeted to recovery memory function of aging.

Keywords : aging, hippocampal estrogen, microglia activation, synaptic plasticity

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480211

ชื่อโครงการ : ผลของการอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของ local hippocampal estrogen ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาท hippocampus

ชื่อนักวิจัย : ดร. ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์, ภาควิชาชีวเวชศาสตร์, คณะสหเวชศาสตร์,
มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail Address : siripornc@buu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

ความจำเสื่อมคือสิ่งที่เกิดขึ้นต่อเนื่องจากความชรา ซึ่งความเสื่อมเกิดจากการสูญเสียกระบวนการสร้างความจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส มีการสันนิษฐานว่าการเปลี่ยนแปลงของไมโครเกลียในภาวะชราคือกลไกสำคัญของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ การชราของเซลล์ไมโครเกลียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกโปรตีนบ่งชี้การกระตุ้นไมโครเกลีย อย่างไรก็ตามกลไกของการสูญเสียความจำจากสาเหตุดังกล่าวก็ยังไม่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ผลและกลไกของการกระตุ้นไมโครเกลียต่อกระบวนการสร้างความจำในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส เบื้องต้นแสดงให้เห็นรูปแบบที่ชัดเจนของการสร้างเอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีบทบาทสำคัญต่อการเตรียมเซลล์เพื่อรองรับต่อการทำงานของเอสโตรเจนจากภายนอก ในวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างไมโครเกลียกับเซลล์ประสาท ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไมโครเกลียสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้จุดประสานประสาท ที่สำคัญได้แก่ Arc, PSD95 และ synaptophysin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส บ่งชี้ว่าการกระตุ้นไมโครเกลียสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสได้ มากไปกว่านั้นงานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไมโครเกลียลดการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้จุดประสานประสาทผ่านการยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส และยับยั้งการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน โดยสรุป งานวิจัยนี้เสนอกลไกใหม่ของกระบวนการสูญเสียความจำในภาวะที่มีการกระตุ้นไมโครเกลีย เช่น ภาวะชรา ซึ่งน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญต่อการรักษาการสูญเสียความจำในผู้สูงอายุ

คำสำคัญ : ภาวะชรา, เอสโตรเจนจากฮิปโปแคมปัส, การกระตุ้นไมโครเกลีย, ไซแนปติกพลาสติกซิตี

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ภาวะความจำเสื่อม พบในผู้สูงอายุทั่วไปและผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคทางระบบประสาท เช่น Alzheimer's disease, และ Parkinson's disease ซึ่งในภาวะชราาร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ จำนวนมาก ทั้งการเปลี่ยนแปลงระดับอวัยวะและการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ การเปลี่ยนแปลงที่มีผลกระทบต่อภาวะความจำเสื่อม ที่สำคัญ ได้แก่ การสูญเสียเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ และการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ของไมโครเกลีย

เอสโตรเจนเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และกระตุ้นกระบวนการ synaptic plasticity โดยอาศัยการเหนี่ยวนำให้เกิด actin polymerization ตลอดจนเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้จุดประสานประสาท ที่สำคัญ ได้แก่ Arc, PSD95 และ synaptophysin การทำงานของเอสโตรเจนต้องการการกระตุ้นตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor; ER) โดยเฉพาะชนิด ER β ซึ่งหากยับยั้งการแสดงออกและการทำงานของ ER จะส่งผลยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity และลดความสามารถในการสร้างความจำ ในร่างกายมนุษย์ เอสโตรเจนส่วนใหญ่ถูกสร้างจากต่อมเพศก่อนหลังเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อไปควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมายภายในอวัยวะต่างๆ นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์เป้าหมาย เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์นั้นๆ อย่างรวดเร็วและเฉพาะเจาะจง อาทิเช่น เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส จากหลักฐานงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนที่สร้างจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีอิทธิพลโดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ โดยมีฤทธิ์เพิ่มจำนวนจุดประสานประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจะไม่เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ถึงแม้ว่าจะมีการให้เอสโตรเจนเพิ่มก็ตาม แสดงให้เห็นว่าหากไม่มีเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสแล้ว เซลล์ประสาทจะไม่ตอบสนองต่อการให้เอสโตรเจน เนื่องจากการรายงานที่เอสโตรเจนที่สร้างจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีฤทธิ์ควบคุมการแสดงออกของ ER ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ดังนั้น เอสโตรเจนที่สร้างจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเตรียมตัวและการปรับตัวของเซลล์ประสาทเพื่อตอบสนองต่อการให้เอสโตรเจน หรือ ตอบสนองต่อเอสโตรเจนในกระแสเลือดที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ โดยควบคุมการสร้างหรือการทำงานของ ER ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาวิจัยถึงความสัมพันธ์ระหว่าง เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสกับ การให้เอสโตรเจน หรือ เอสโตรเจนจากต่อมเพศ ภายใต้กระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะปกติ

เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะความจำเสื่อมที่พบในผู้สูงอายุ มีสาเหตุมาจากการสูญเสียเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ แต่อย่างไรก็ดี หากร่างกายยังมีเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทก็ไม่

น่าจะเกิดผลกระทบต่อกระบวนการสร้างความจำในภาวะชราได้ แต่ในความเป็นจริงเรายังคงพบว่าอุบัติการณ์ของโรคความจำเสื่อมในภาวะชราสูงอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า การขาดเอสโตรเจนจากต่อมเพศอาจไม่ใช่ศูนย์กลางของกระบวนการสูญเสียความจำในภาวะชรา

งานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่พบในภาวะชรา ซึ่งน่าจะเป็นพื้นฐานหลักของการสูญเสียความจำ มีการตั้งสมมุติฐานว่าการเปลี่ยนแปลงของไมโครเกลียในสมองของผู้สูงอายุเป็นผลมาจากความชรา โดยมีเหตุผลดังต่อไปนี้ 1) ไมโครเกลียเป็นเซลล์ที่มีอายุยาวนานตลอดชีวิตของมนุษย์ ดังนั้นจึงง่ายที่จะได้รับผลกระทบจากความชรา 2) ลักษณะของ microglia ในสมองของผู้สูงอายุมีการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค สรีรวิทยา ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุล ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบันว่าเป็นลักษณะภายนอกของไมโครเกลียชรา (aging microglia phenotype) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนจากไมโครเกลียระยะพักเป็นระยะกระตุ้น โดยมีการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ระยะกระตุ้นจำนวนมาก ได้แก่ major histocompatibility complex II (MHC-II), CD11b, and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) เป็นต้น นอกจากนี้ในระยะกระตุ้นยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบได้โดยการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ได้แก่ interleukin-1 (IL-1), IL-6, nitric oxide (NO) และ prostaglandins (PGs) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทนอกจากนั้น pro-inflammatory cytokines ยังมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity และ long-term potentiation ในเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ แต่อย่างไรก็ตามกลไกของการกระตุ้นไมโครเกลียในภาวะชรายับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity และทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

จากสมมุติฐานที่ว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีหน้าที่หลักในการสนับสนุนกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ ดังนั้น เป็นไปได้หรือไม่ว่าในภาวะชราการกระตุ้นไมโครเกลียอาจส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของการกระตุ้นไมโครเกลียต่อการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนที่สร้างจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส รวมถึงกระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส สืบเนื่องจากอุบัติการณ์ของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุทั้งปกติ และที่มีโรคทางระบบประสาทร่วมด้วยของประชากรทั่วโลกเพิ่มขึ้นและรุนแรงขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยไม่ทราบสาเหตุ และถือเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะสร้างองค์ความรู้เพื่อนำไปสู่การเข้าใจถึงกลไกของการสูญเสียความจำที่เกิดขึ้นในภาวะชรา และมีศักยภาพต่อการศึกษาต่อเนื่องเพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการป้องกัน หรือการรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุปกติและผู้สูงอายุที่มีโรคทางระบบประสาทอื่นร่วมด้วย ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษารูปแบบการสังเคราะห์เอสโตรเจนของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron
2. ศึกษาการทำงานของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทต่อการทำงานของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron ในภาวะปกติ
3. ศึกษาผลของภาวะอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อกลไกการสร้างความจำ ใน hippocampal neuron
4. ศึกษาผลของการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

ก. เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ H19-7 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) และ 10% fetal bovine serum (Gibco) ใน poly-L-lysine-coated T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 25 cm² ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 33°C และความเข้มข้น CO₂ ที่ 5% ภายใต้สภาวะแวดล้อมและอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron (cell proliferation)

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron จะถูกเลี้ยงด้วย estrogen-free culture medium ที่ประกอบด้วย 0.01% N2 supplement (Gibco) และ 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma) ใน 6-well plate (Corning) ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 39°C และ ความเข้มข้น CO₂ ที่ 5% ซึ่งในสภาวะนี้เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons จะถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) กลายเป็น mature hippocampal neuron

ข. เซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI ใน DMEM ที่ประกอบด้วย 5% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acid (Sigma) ใน T-flask ขนาด 25 cm² ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และความเข้มข้น CO₂ ที่ 5% ในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI เพื่อนำไปศึกษาวิจัยนั้น เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเลี้ยงบน Transwell polyester membrane insert (Product ID 3450; Corning) ในตู้ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C และ ที่ 5% CO₂

ค. Neuron-microglia co-culture

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron ร่วมกับ เซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI (neuron-microglia co-culture) โดยเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons ใน 6-well plate ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI ที่ถูกเลี้ยงบน Transwell polyester membrane insert มาวางลงในแต่ละ well ของ 6-well plate ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons อยู่ด้านล่าง

3.2 การวัดการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI (MTT assay)

การวัดเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 19-7 hippocampal neuron ด้วยวิธี MTT assay มีหลักการที่สำคัญคือ สารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) จะถูกเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นผลึกสีน้ำเงิน (formazan crystal) ในเซลล์ที่มีชีวิตโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไมโทคอนเดรีย ในขณะที่เซลล์ตายจะไม่สามารถเปลี่ยนสีสารละลาย MTT ได้ วิธีการทดลอง หลังจากการให้สารต่างๆเรียบร้อยแล้วดูด culture media ออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.01M phosphate buffer saline (PBS) ก่อนที่จะบ่มด้วยสารละลาย MTT เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลาย (solubilization) formazan crystal ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm

3.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การตรวจหาปริมาณของโปรตีน IL-6, IL-10 และ estrogen ด้วยวิธี ELISA แบบวิธี double sandwich เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวของ 96-well plate ด้วย anti-IL-6 หรือ anti-IL-10 antibody หรือ anti-estrogen (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติม ELISA Blocking Buffer (R&D systems) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding จากนั้นจึงเติม culture media ที่ได้จากกลุ่มการทดลองต่างๆ (กระบวนการทดลองที่ 8.2.2) เพื่อทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงล้าง antigen ส่วนเกินด้วย 0.01M PBS แล้วเติม anti-IL-6 หรือ anti-PGE₂ antibody (ตัวเดียวกับที่ใช้

เคลือบ 96-well-plate) บ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงบ่มด้วย secondary antibody ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) (R&D systems) เพื่อทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง จากนั้นจึงล้าง antibody ส่วนเกินด้วย 0.01M PBS แล้วเติม Tetramethylbenzidine (TMB) substrate (R&D systems) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1M HCl ซึ่งหากมี IL-6 หรือ IL-10 หรือ เอสโตรเจน สารน้ำจากการทดลองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.4 Western blot analysis

สกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, EDTA 5 mM, Na_2HPO_4 30 mM, NaF 50 mM) นำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปบ่มใน 5% non-fat milk เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนนำไปบ่มด้วย primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ chemiluminescent detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image

3.6 Quantitative-real time PCR (qRT-PCR)

นำเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron มาสกัด RNA โดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) แล้ววัดความเข้มข้นของ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการคำนวณเพื่อปรับปริมาณของ RNA ให้เท่ากันทุกกลุ่ม แล้วเปลี่ยนกลับไปเป็น cDNA ด้วยเครื่อง thermocycle โดยใช้ high capacity cDNA reverse transcription kit (Apply Biosystems, CA, USA) จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเป้าหมาย กับ ยีน housekeeping (GAPDH) ด้วยเครื่อง real-time PCR (Applied biosystems) โดยใช้ TaqMan® gene expression assay kit (Apply Biosystems) ซึ่งประกอบด้วย customized primer design และ DNA-probe ที่ถูกติดฉลากด้วย FAMTM dye และคำนวณปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี threshold cycle (Ct method) โดยใช้ SDS software v. 1. 4 (Apply Biosystems)

3.7 Immunocytochemistry

ศึกษาการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี immunocytochemistry เริ่มจากการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron บน coverslip ใน 6-well plate หลังจากให้สารต่าง ๆ แก่เซลล์เพาะเลี้ยงเรียบร้อยแล้ว (กระบวนการทดลองที่ 8.2.5) ทำการบ่มเซลล์ด้วย 4% cold-paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มด้วย 0.2 M glycine เป็นเวลา 25 นาที แล้วตามด้วย 10% normal goat serum เป็นเวลา 30 นาที เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนที่จะบ่มด้วย primary-antibody (Abcam, Cambridge, UK) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วตามด้วย fluorescent-conjugated secondary antibody ตามลำดับ และทำการศึกษาภายใต้กล้อง Leser confocal microscopy (Model FV 1000; Olympus, Tokyo, Japan)

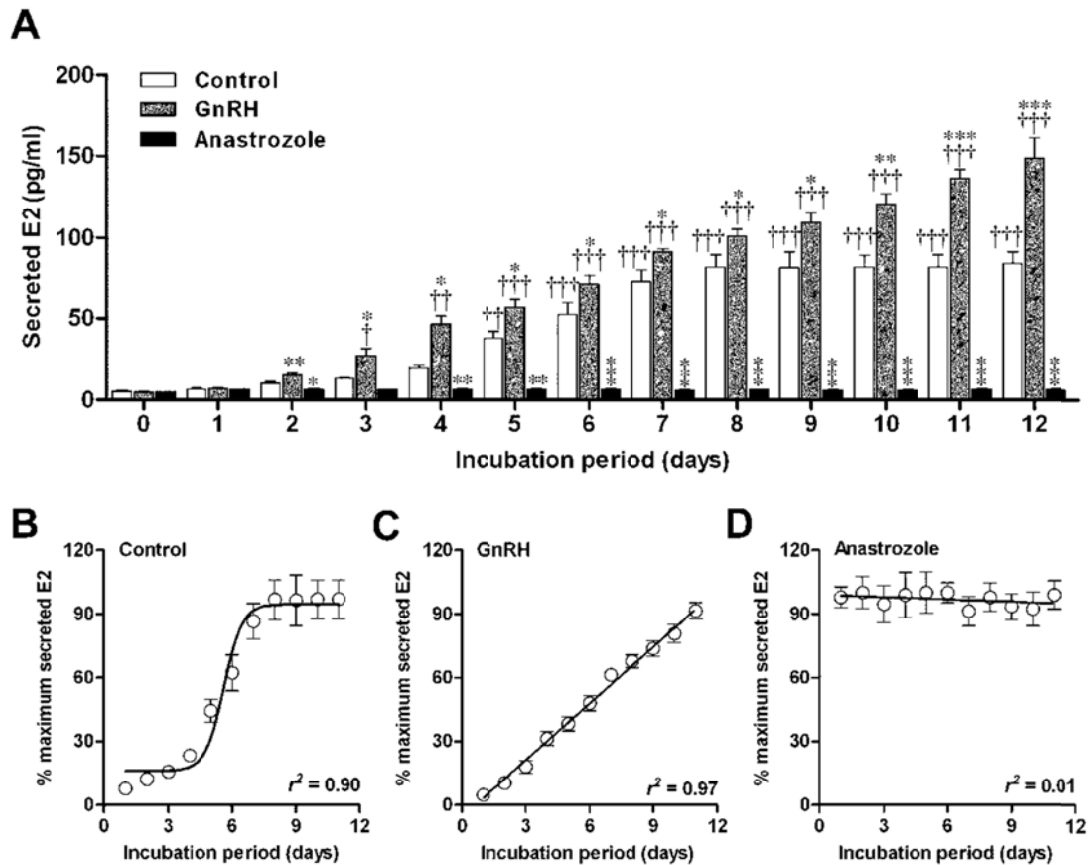
3.8 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล

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

ผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

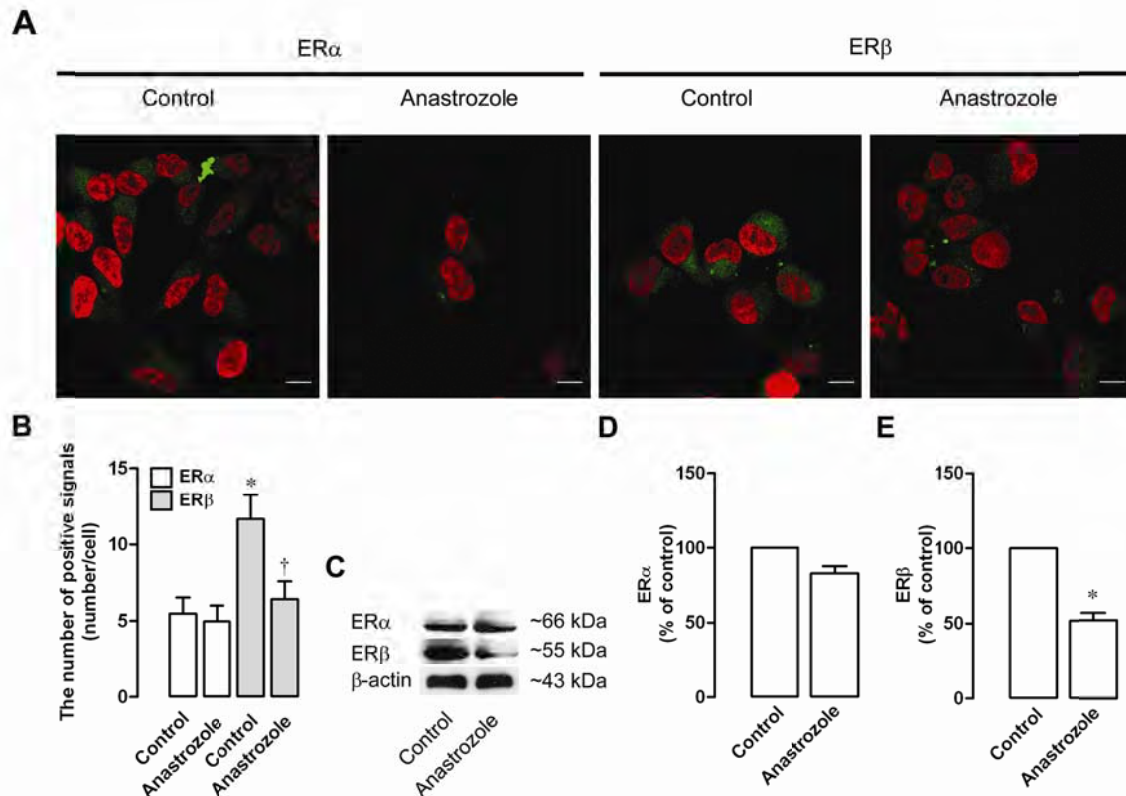
เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการสังเคราะห์ estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการสังเคราะห์ estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ในภาวะปกติ (control) เทียบกับการให้ anastrozole (aromatase inhibitor) และการให้ Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ และกลุ่มควบคุมเชิงบวกตามลำดับโดยการวัดปริมาณการหลั่งในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในภาวะปกติสามารถวัดปริมาณ estrogen ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป ส่วนกลุ่มที่ได้รับ GnRH นั้นสามารถวัดได้ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถตอบสนอง GnRH ได้ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ anastrozole สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ได้ตลอดการทดลอง (รูปที่ 1A) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการศึกษารูปแบบของการสังเคราะห์ local estrogen และนำเสนอในรูปแบบของการแสดงความสัมพันธ์ ดังแสดงในรูปที่ 1B-D



รูปที่ 1 แสดงระดับการหลั่งของ local estrogen จากเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal (n = 5) ในภาวะปกติ ภาวะที่มีการให้ GnRH และ Anastrozole

2. เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของ estrogen receptor β

ผู้วิจัยทำการศึกษาผลของ 2. เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสต่อการแสดงออกของ estrogen receptor ทั้งสองชนิด คือ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ ด้วยวิธี western blot (รูปที่ 2 D และ E), และ immunocytochemistry (รูปที่ 2A และ B) เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออก และตำแหน่งของการแสดงออก ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กลุ่มที่ได้รับ anastrozole มีการแสดงออกของ $ER\beta$ ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ $ER\alpha$ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 2A-E) นอกจากนี้จากการวัดความเข้มของสีฟลูออเรสเซนจากการทดลองด้วยวิธี immunocytochemistry (B) แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ $ER\beta$ สูงกว่า $ER\alpha$ ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

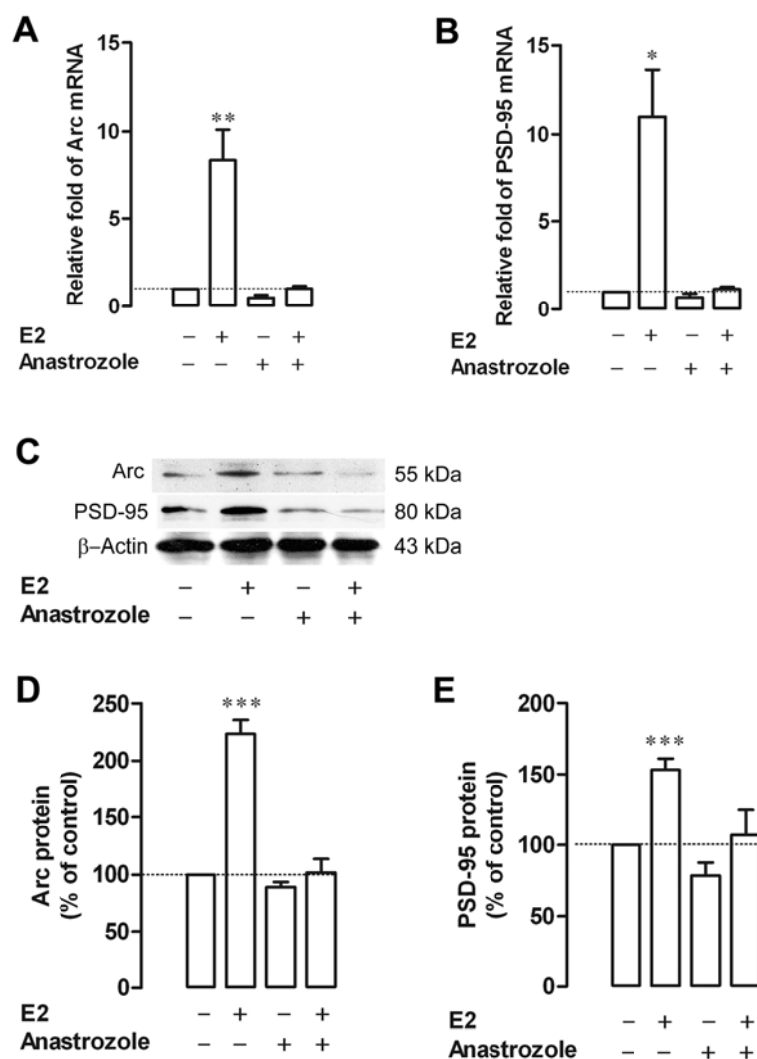


รูปที่ 2 แสดงการแสดงออกของ ER α และ ER β ในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ anastrozole ด้วยวิธี immunocytochemistry (A และ B) และ วิธี western blot (C-E)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

3. การยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสส่งผลให้เซลล์ไม่ตอบสนองต่อการได้รับเอสโตรเจน ซึ่งไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ synaptic plasticity

จากการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR (รูปที่ 3A และ B) และวิธี western blot (รูปที่ 3C-E) แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่ทำการยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนด้วย anastrozole ระดับของโปรตีนบ่งชี้กระบวนการสร้างความจำ (Arc และ PSD95) มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และนอกจากนี้เมื่อให้เอสโตรเจนกลับไปในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนด้วย anastrozole จะไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนและโปรตีน Arc และ PSD95 กลับขึ้นมาได้ แสดงให้เห็นว่าหากไม่มีเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเซลล์จะไม่สามารถตอบสนองต่อการให้เอสโตรเจน หรือเอสโตรเจนในกระแสเลือดได้ ทำให้เอสโตรเจนที่เพิ่มไปนั้นไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำได้



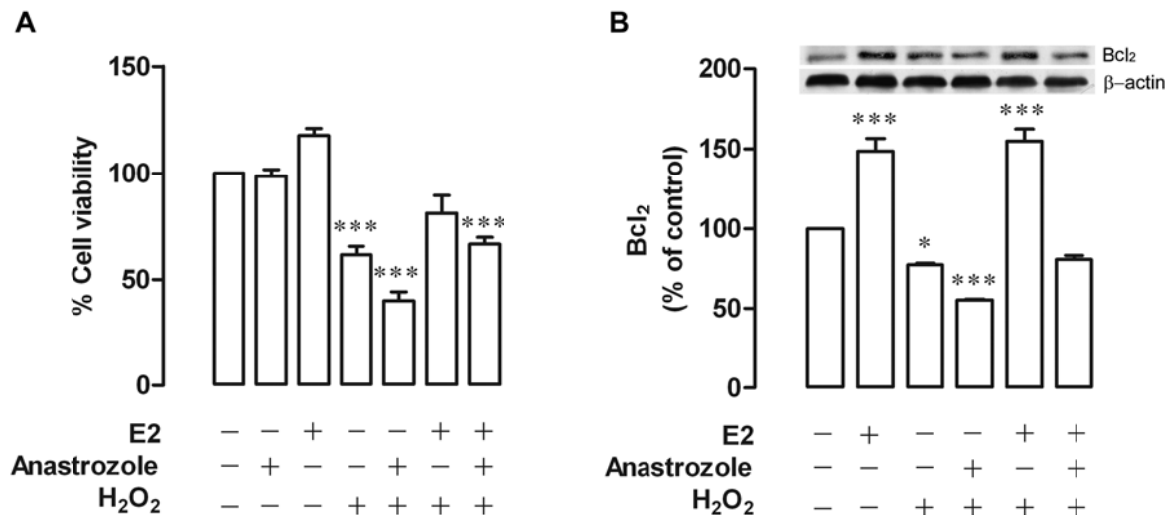
รูปที่ 3 แสดงระดับการแสดงออกของยีน (A และ B) โปรตีน (C-E) Arc และ PSD95 หลังจากได้รับ anastrozole หรือ เอสโตรเจน ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4. การยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสส่งผลให้เซลล์ไม่ตอบสนองต่อการได้รับเอสโตรเจน ซึ่งไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการปกป้องเซลล์ประสาท

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในภาวะที่ทำการยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนด้วยการให้ anastrozole ร่วมกับการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แก่เซลล์ประสาทพบว่าร้อยละของการมีชีวิตจากการทดสอบด้วยวิธี MTT assay (รูปที่ 4A) และระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการเกิด apoptosis จากการทดสอบด้วยวิธี western blot (รูปที่ 4B) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบขึ้นกับเวลา และเมื่อให้เอสโตรเจนกลับไปในกลุ่มที่ให้

anastrozole จะไม่สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตและระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ได้ แสดงให้เห็นว่าหากไม่มีเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเซลล์จะไม่สามารถตอบสนองต่อการให้เอสโตรเจน หรือ เอสโตรเจนในกระแสเลือดได้ ทำให้เอสโตรเจนที่ให้เพิ่มไปนั้นไม่สามารถปกป้องเซลล์ประสาทได้

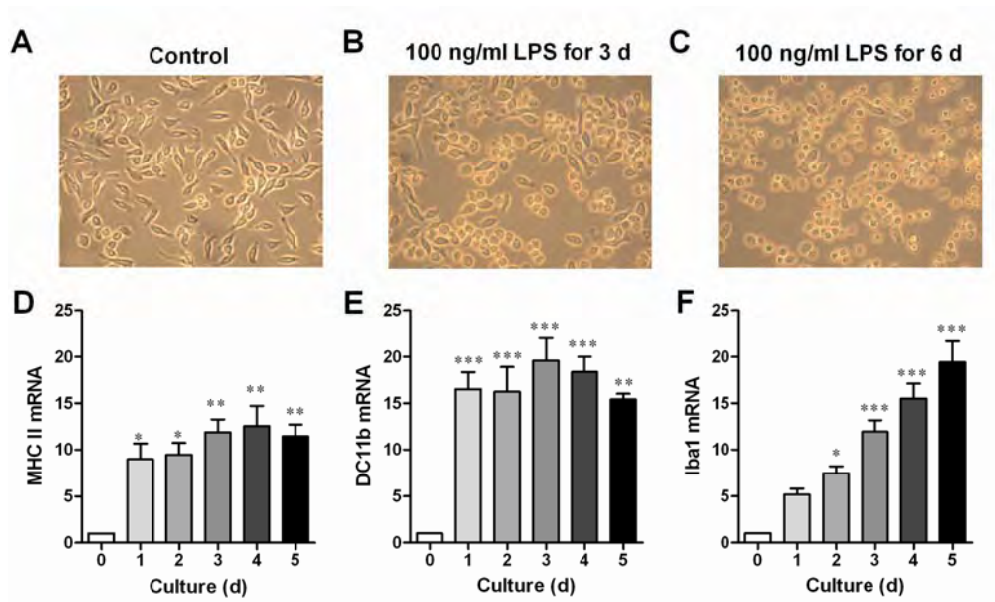


รูปที่ 4 แสดงร้อยละของการมีชีวิต (A) และระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 (B) หลังจากได้รับ anastrozole หรือ เอสโตรเจน หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. LPS เพิ่มการแสดงออกของ age-related microglia activation markers ในเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI cell

ผลการทดลองจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงหัวกลับ (รูปที่ 5A-C) แสดงให้เห็นว่า 100 ng/ml LPS สามารถเหนี่ยวนำให้ไมโครเกลียอยู่ในระยะกระตุ้น โดยมีรูปร่างกลม และแขนงของเซลล์หดสั้นลง เมื่อทำการบ่มด้วย LPS เป็นเวลานานขึ้น นอกจากนี้ยังทำการศึกษาระดับ mRNA ของ MHCII CD11b และ Iba1 (รูปที่ 5D-F) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะที่ไมโครเกลียถูกกระตุ้นแบบสัมพันธ์กับภาวะชรา พบว่า LPS สามารถเพิ่มระดับ mRNA ของโปรตีนทั้ง 3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในเวลา 1 วัน (หรือ 2 วัน สำหรับ Iba1) หลังจากให้ LPS แก่เซลล์

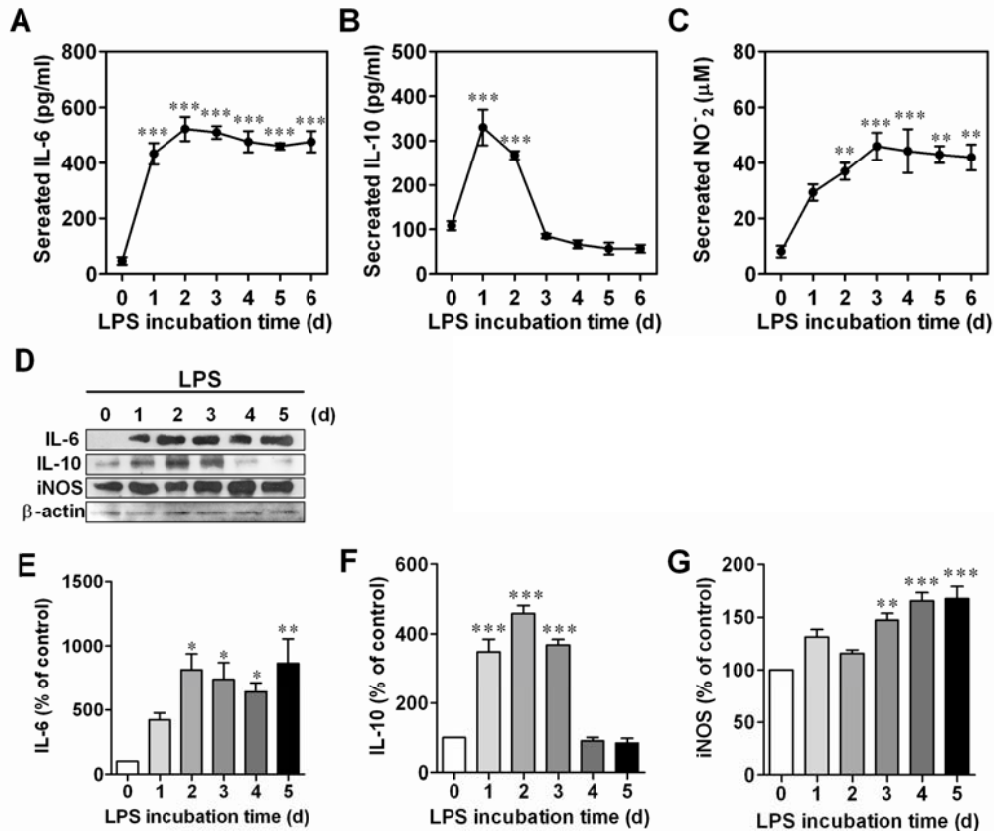


รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (A-C) และระดับการแสดงออกของยีน MHCII CD11b และ Iba1 (D-F) หลังจากเหนี่ยวนำด้วย LPS

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

6. LPS เพิ่มการแสดงออกของ inflammatory cytokines ในเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI cell

ผลการทดลองจากวิธี ELISA (รูปที่ 6 A-C) และ Western blot (รูปที่ 6D-G) แสดงให้เห็นว่า LPS สามารถเหนี่ยวนำให้ไมโครเกลียเพิ่มปริมาณการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ IL-6 และ nitric oxide และ ลดการแสดงออกของ anti-inflammatory cytokine ได้แก่ IL-10 ที่เวลา 5 วัน หลังจากได้รับ LPS แสดงให้เห็นว่าการให้ LPS เป็นเวลานานเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบได้

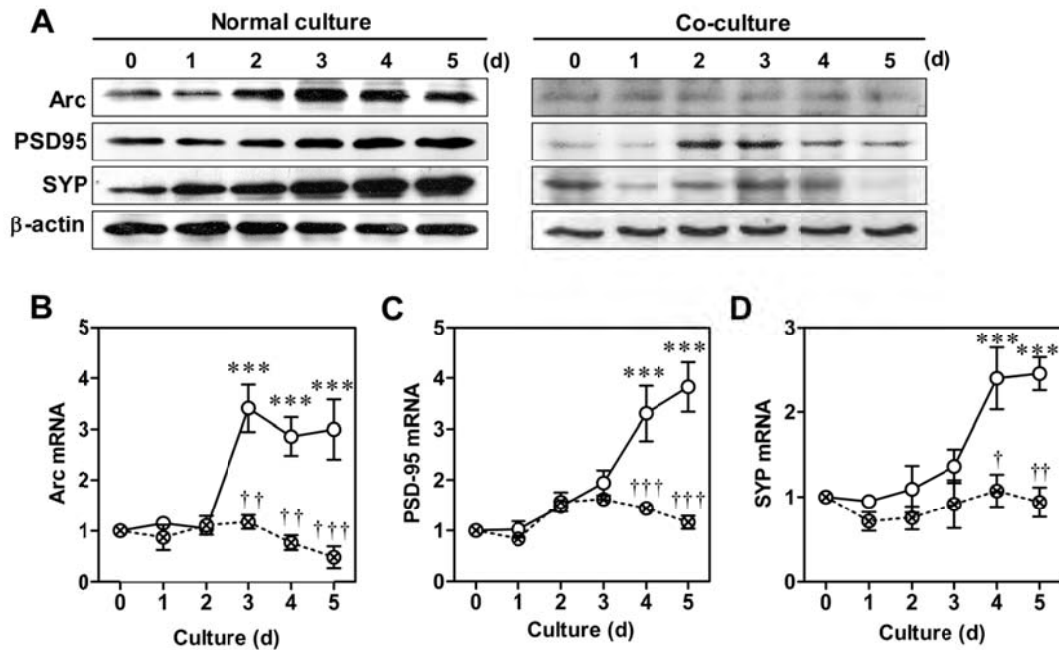


รูปที่ 6 แสดงระดับการแสดงออกของ cytokine ในอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์ (A-C) และที่อยู่ภายในเซลล์ (D-G) หลังจากให้ LPS แก่เซลล์เพาะเลี้ยงไมโครเกลีย

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

7. การกระตุ้นไมโครเกลียยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้กระบวนการสร้างความจำในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

จากการทดลองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ประสาทกับไมโครเกลีย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไมโครเกลียด้วย LPS ยับยั้งการแสดงออกของยีน (รูปที่ 7B-D) และโปรตีน (รูปที่ 7A) บ่งชี้กระบวนการสร้างความจำ ที่สำคัญได้แก่ Arc PSD-95 และ synaptophysin ซึ่งโปรตีนทั้งสามจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 3 วัน สำหรับ Arc และ 4 วัน สำหรับ PSD-95 และ synaptophysin ของการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons ของกลุ่มควบคุม

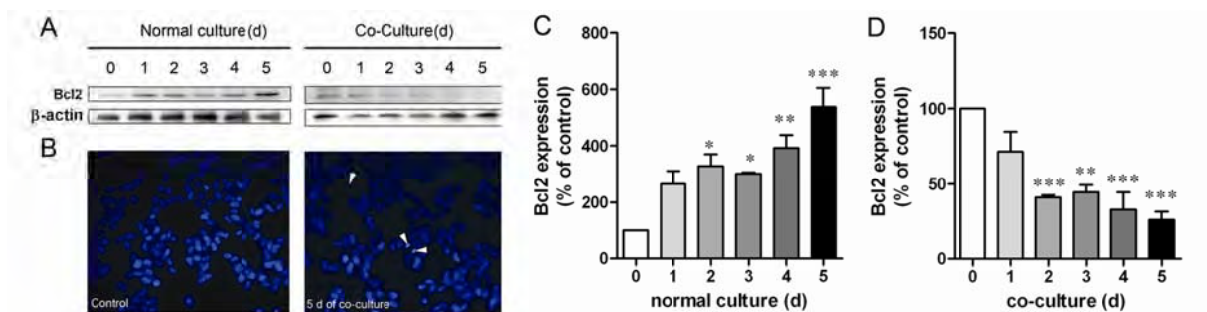


รูปที่ 7 แสดงการแสดงออกของโปรตีน (A) และ ยีนของ (B-D) Arc PSD-95 และ synaptophysin หลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น (Co-culture)

*** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

8. การกระตุ้นไมโครเกลียเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทเกิดการตายแบบ apoptosis โดยยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Bcl2

จากการทดลองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ประสาทกับไมโครเกลีย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไมโครเกลียด้วย LPS เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยยับยั้งการแสดงออกของ Bcl2 (รูปที่ 8A, C และ D) อีกทั้งยังพบว่ามี การหดตัวของนิวเคลียส ซึ่งเป็นลักษณะของ apoptotic nucleus (รูปที่ 8B)

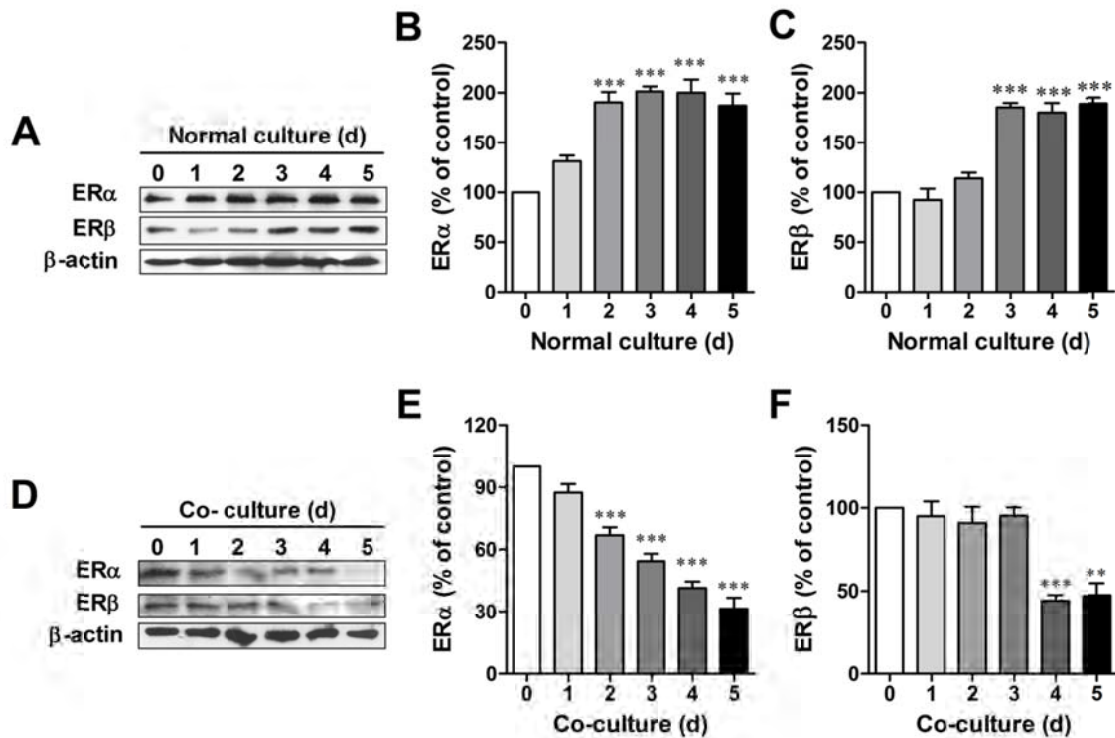


รูปที่ 8 แสดงระดับของโปรตีน Bcl2 (A, C และ D) และลักษณะนิวเคลียส (B) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น (Co-culture)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

9. การกระตุ้นไมโครเกลียยับยั้งการแสดงออกของ ER α และ ER β

จากการทดลองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ประสาทกับไมโครเกลีย ผลการทดลองด้วยวิธี western blot แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไมโครเกลียด้วย LPS มีผลยับยั้งการแสดงออกของ ER α และ ER β (รูปที่ 9D-F) ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 2 วัน สำหรับ ER α และ 3 วัน สำหรับ ER β ของการเพาะเลี้ยงแบบปกติ (normal culture) (รูปที่ 9 A-C)



รูปที่ 9 แสดงระดับของโปรตีน ER α และ ER β ของการเพาะเลี้ยงปกติ (A, C และ D) และหลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น (D-F)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้พบว่า H19-7 hippocampal neuron มีคุณสมบัติเหมือน hippocampal neuron กล่าวคือ สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้ภายในเซลล์หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมเป็นเวลา 3 วัน เอสโตรเจนที่ได้จากการสังเคราะห์ของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron ทำให้เซลล์เพิ่มการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนโดยเฉพาะชนิดบีต้า ($ER\beta$) เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมสำหรับการตอบสนองต่อการได้รับเอสโตรเจน ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหากไม่มีเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาท เซลล์จะไม่ตอบสนองต่อการได้รับเอสโตรเจน ส่งผลให้เอสโตรเจนที่ให้ไปนั้นไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ synaptic plasticity และการปกป้องเซลล์ประสาทได้

นอกจากนี้ในภาวะที่มีการกระตุ้นไมโครเกลีย ซึ่งเป็นสภาวะเทียบเคียงกับภาวะชรา และภาวะของโรคเซลล์ประสาทเสื่อมในผู้สูงอายุ แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นไมโครเกลียยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity ของเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron โดยการไปยับยั้งการสร้างและการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron และส่งผลให้มีการตายแบบ apoptosis ในที่สุด

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- Chamniansawat* and Chongthammakun. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp. Mol. Med. 2012; 44 (6): 403-411.
- Chamniansawat* and Chongthammakun. Activated microglia inhibits hippocampal estrogen synthesis-mediated memory formation. Manuscript submitted for publication.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชิงสาธารณะ

- งานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้มีบทบาทสำคัญก่อให้เกิดความรู้ใหม่เกี่ยวกับการสูญเสียความจำในภาวะชรา ที่ไม่เพียงแต่เกิดจากการลดลงของระดับเอสโตรเจนจากต่อมเพศเพียงอย่างเดียว แต่ยังต้องคำนึงถึงระดับของเอสโตรเจนที่สร้างจากเซลล์ประสาทร่วมด้วย จึงจะสามารถรักษาความผิดปกติที่เกิดในสมองของภาวะชราได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. เชิงวิชาการ

- นำความรู้เรื่องบทบาทของเอสโตรเจนที่สร้างจากเซลล์ประสาทมาเป็นส่วนหนึ่งของหัวข้อโครงการงานวิจัยของนิสิตปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์
- ทำการเรียบเรียงความรู้ที่ได้เขียนเป็นบทความทางวิชาการเพื่อเผยแพร่ข้อมูลสู่สาธารณะชนอย่างทั่วถึง ในหัวข้อเรื่อง “บทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสและเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส” (วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 17 (2555) 2: 234-239)

3. อื่นๆ -

ภาคผนวก

1. Chamniansawat S, Chongthammakun S. *A priming role of local estrogen on endogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection*. Experimental and Molecular Medicine **2012**; 44: 403-411.
2. Chamniansawat S. The role of hippocampal estrogen and gonadal estrogen on hippocampal neuronal functions. Burapha science journal **2013**; 18(1): 234-239.
3. Manuscript: Chamniansawat S, Chongthammakun S. Activated microglia inhibits hippocampal estrogen-mediated memory formation.

แบบแสดงหลักฐานการมีส่วนร่วมในผลงานวิชาการ
Confirmation for participation in academic work

☐ ตำราหรือหนังสือ

Textbook/book

☒ งานวิจัย

Research

☐ ผลงานทางวิชาการในลักษณะอื่น

Other academic work

ชื่อเรื่อง (Title) A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection, Experimental and Molecular Medicine 2012; 44(6): 403 – 411.

จำนวนผู้ร่วมงาน 2 ท่าน แต่ละท่านมีส่วนร่วมในงานดังนี้

ชื่อผู้ร่วมงาน (Names of all members)	ปริมาณงานร้อยละ (%) และหน้าที่ความรับผิดชอบ
1. Siriporn Chamniansawat	95 (A, B, C, D, E)
2. Sukumal Chongthammakun	5 (D, F)

(A) Performed research, (B) Designed research, (C) Analyzed data, (D) Wrote the paper, (E) Corresponding author, (F) Provided experimental tools

ลงชื่อ Siriporn Chamniansawat
(Siriporn Chamniansawat, Ph.D.)

ลงชื่อ Sukumal Chongthammakun
(Assoc. Prof. Sukumal Chongthammakun, Ph.D.)

Signed on: July 18, 2012

A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection

Siriporn Chamniansawat^{1,3} and
Sukumal Chongthammakun²

¹Faculty of Allied Health Sciences

Burapha University

Chonburi 20131, Thailand

²Department of Anatomy and Center for Neuroscience

Faculty of Science

Mahidol University

Bangkok 10400, Thailand

³Corresponding author: Tel, 66-38-393-497;

Fax, 66-38-393-497; E-mail, siripornc@buu.ac.th

<http://dx.doi.org/10.3858/emmm.2012.44.6.046>

Accepted 26 March 2012

Available Online 18 April 2012

Abbreviations: Arc, activity-regulated cytoskeleton associated protein; Bcl2, B cell lymphoma 2; DPN, estrogen receptor β agonist; E2, estrogen; ER, estrogen receptor; GnRH, gonadotrophin releasing hormone; H₂O₂, hydrogen peroxide; OVX, ovariectomized; PI-3K, phosphoinositide kinase-3; PPT, estrogen receptor α agonist; PSD-95, postsynaptic density protein-95; Wort, wortmannin

Abstract

The localization of estrogen (E2) has been clearly shown in hippocampus, called local hippocampal E2. It enhanced neuronal synaptic plasticity and protected neuron from cerebral ischemia, similar to those effects of exogenous E2. However, the interactive function of hippocampal and exogenous E2 on synaptic plasticity activation and neuroprotection is still elusive. By using hippocampal H19-7 cells, we demonstrated the local hippocampal E2 that totally suppressed by aromatase inhibitor anastrozole. Anastrozole also suppressed estrogen receptor (ER) β , but not ER α , expression. Specific agonist of ER α (PPT) and ER β (DPN) restored ER β expression in anastrozole-treated cells. In combination treatment with anastrozole and phosphoinositide kinase-3 (PI-3K) signaling inhibitor wortmannin, PPT could not improve hippocampal ER β expression. On the other hand, DPN induced basal ER β translocation into nucleus of anastrozole-treated cells.

Exogenous E2 increased synaptic plasticity markers expression in H19-7 cells. However, exogenous E2 could not enhance synaptic plasticity in anastrozole-treated group. Exogenous E2 also increased cell viability and B-cell lymphoma 2 (Bcl2) expression in H₂O₂-treated cells. In combined treatment of anastrozole and H₂O₂, exogenous E2 failed to enhance cell viability and Bcl2 expression in hippocampal H19-7 cells. Our results provided the evidence of the priming role of local hippocampal E2 on exogenous E2-enhanced synaptic plasticity and viability of hippocampal neurons.

Keywords: estrogen receptor beta; estrogens; hippocampus; neuronal plasticity; neurons; neuroprotective agents

Introduction

E2 is mainly synthesized in the gonad, called gonadal or exogenous E2, and reaches its target organ via blood circulation. It has been reported to influence memory function (Henderson, 2010; Gorenstein *et al.*, 2011) and neuroprotection (McCullough *et al.*, 2003) through estrogen receptor (ER), which highly expressed in cerebral cortex and hippocampus (Henderson, 2010). In menopausal women, E2 replacement therapy relieved memory impairment (Gorenstein *et al.*, 2011). Previous study demonstrated the decreasing of hippocampal dendritic spine in ovariectomized (OVX) rats that restored by an administration of exogenous E2 (Gould *et al.*, 1990). During estrous cycle, the hippocampal spine density is varied in response to fluctuating level of E2 in female rats (Woolley and McEwen, 1992). Moreover, our previous studies demonstrated that a variety of synaptic marker proteins is up-regulated after exogenous E2 application (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009; 2010), confirming the positive role of exogenous E2 on synaptic plasticity and memory consolidation. E2 also prevents neuronal death from ischemic brain injury (Dubal *et al.*, 1999). It regulated neuronal viability through Bcl2 expression, but not other members of Bcl2 family (Dubal *et al.*, 1999).

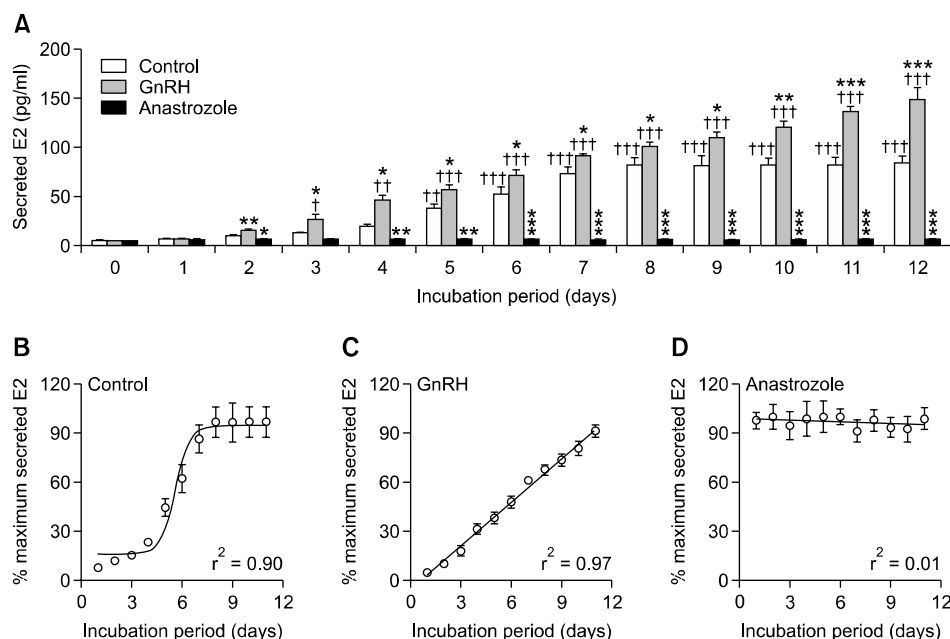


Figure 1. Secreted local E2 in culture media of hippocampal H19-7 neurons. Secreted E2 of control (open bars), GnRH-treated (gray bars) and anastrozole-treated (black bars) in H19-7 hippocampal cells (A). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs day-matched control group, $^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$ vs corresponding day 0 group. Percent maximum secreted E2 of control (B), GnRH-treated (C) and anastrozole-treated (D) in H19-7 hippocampal cells. Dark line represented the best-fitted sigmoid line (non-linear regression) in B and straight line (linear regression) in C and D ($n = 5$).

In addition to gonad, endogenous E2 production and secretion in hippocampus were well demonstrated (Prange-Kiel and Rune, 2006). The presence of all enzymes responsible for endogenous E2 biosynthesis and a sixfold higher E2 concentration in hippocampus than that in plasma (Hojo *et al.*, 2004) strongly indicate the potential roles of local hippocampal E2 on hippocampal functions. Previous studies revealed that inhibition of the local E2 biosynthesis by aromatase inhibitor significantly reduced the density of hippocampal synapses and down-regulated synaptic proteins, including spinophilin and synaptophysin (Kretz *et al.*, 2004; Mukai *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Local hippocampal E2 also regulated the expression of ER (Murata *et al.*, 2003; Prange-Kiel *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004). In addition to synaptic plasticity, the neuroprotective role of local hippocampal E2 had been demonstrated by using aromatase knockout mice (McCullough *et al.*, 2003). Loss of endogenous or local E2 exhibited an increase in the severity of ischemic injury compared with the normal as well as OVX mice. These evidences indicated that the neuronal functions are mainly affected by local hippocampal E2. However, the decreased in synaptic plasticity was presented in OVX rats (Woolley and McEwen, 1992), which local hippocampal E2 should be intact. Therefore, hippocampal neuronal function is depended on both endogenous and exogenous E2. We hypothesized in the present study that the mechanism of exogenous E2 action is an endogenous E2-dependent manner. The aims of this study were to investigate the effects and mechanisms of endogenous E2 action on the

modulation of synaptic plasticity and neuroprotection in hippocampal H19-7 cells.

Results

Local E2 production in hippocampal H19-7 cells

To determine the production and secretion of E2 in hippocampal H19-7 cells, we measured E2 concentration in culture media of untreated, gonadotrophin releasing hormone (GnRH)-treated or anastrozole-treated hippocampal H19-7 cells by using ELISA kit. At day 0, basal E2 levels of untreated, GnRH-treated, and anastrozole-treated cells were 5.46 ± 0.51 , 5.11 ± 0.25 , and 4.89 ± 0.25 pg/ml, respectively (Figure 1A). In untreated hippocampal H19-7 cells, secreted E2 significantly increased from days 5 through 12 (37.52 ± 4.58 pg/ml to 80.04 ± 7.40 pg/ml) (Figure 1A). Maximum secreted E2 level in untreated hippocampal H19-7 cells was comparable to those report in hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). GnRH increased hippocampal E2 secretion from days 3 through 12 (26.81 ± 4.55 to 148.72 ± 12.47 pg/ml) (Figure 1A). Moreover, when compared with the untreated group, GnRH significantly increased E2 levels from days 2 through 12 (Figure 1A). However, when the activity of aromatase was inhibited by anastrozole, the E2 levels were not changed throughout 12 days of experimental period.

The hippocampal E2 secretion profile of control, GnRH-treated, and anastrozole-treated hippocampal H19-7 cells were demonstrated by the percent

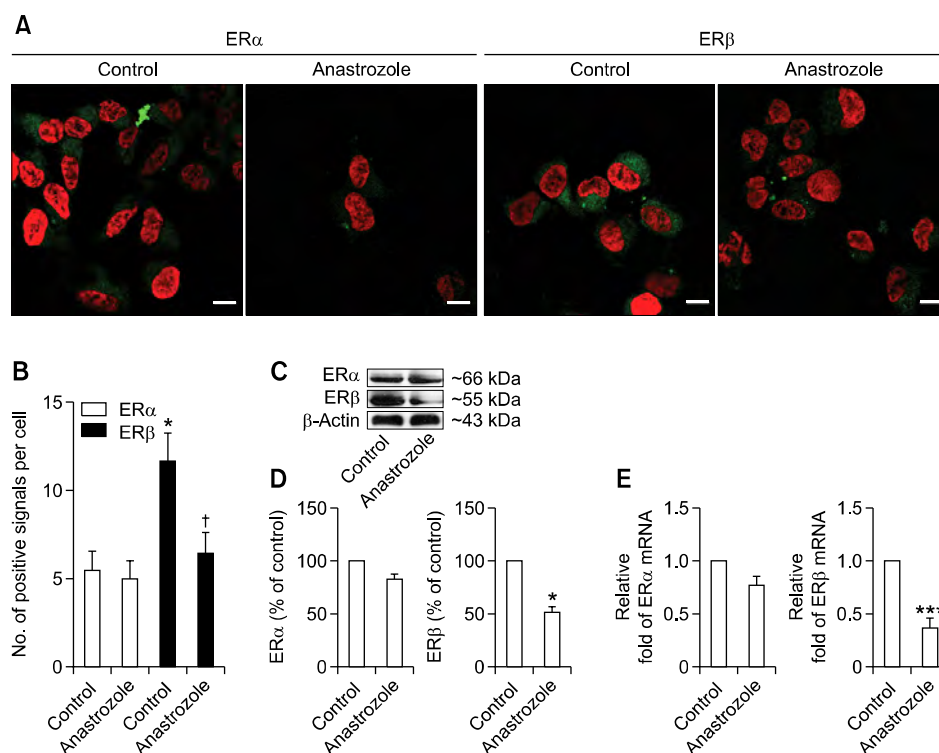


Figure 2. Endogenous H19-7 hippocampal E2 regulates ER β expression. Representative immunofluorescent images of ER α and ER β expression of control, and anastrozole-treated H19-7 hippocampal cells (A). Red signal represented nuclear-staining and green signal represented ER α or ER β (scale bars = 10 μ m). The number of ER α or ER β positive green signal was counted and presented (B). Quantitative immunoblot analysis of ER α and ER β proteins expression in control and anastrozole-treated H19-7 hippocampal cells (C, D). Representative qRT-PCR of ER α and ER β mRNA expression in H19-7 hippocampal neurons (E). β -actin was the housekeeping protein. * P < 0.05, *** P < 0.001 vs control group, † P < 0.05 vs anastrozole-treated group (n = 5).

maximum secreted E2-experimental period relationship. The data of control cells were best fitted with the non-linear regression equation that revealed the sigmoidal line ($r^2 = 0.90$, Figure 1B). In the first three days, E2 levels slowly increased, while it rapidly increased from 4th day and to the maximum level in 8th day (Figure 1B). The half maximum E2 secretion was presented in 5th day to 6th day and the maximum E2 secretion with the plateau phase was showed in day 8 though 12 (Figure 1B). Therefore, we selected 8th day as a suitable culture condition in next experiments for studied the effect of local E2 on hippocampal H19-7 neuron. GnRH changed the secretory profile from sigmoid function to linear function ($r^2 = 0.97$, Figure 1C). The E2 levels of GnRH-treated group rapidly increased from day 1 through 12 (Figure 1C), whereas E2 levels of anastrozole-treated group showed relatively constant throughout 12 days of experimental period (Figure 1D).

Local E2 regulates ER β expression in hippocampal H19-7 cells

It is well known that ER, including ER α and ER β , expression is upregulated by E2 (Murata *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004). We therefore investigated the effects of the local E2 on ER expression by using the confocal immunocytochemistry, qRT-PCR, and Western blot techniques. To determine those effects,

hippocampal H19-7 cells were cultured in either steroid-deprived media with or without anastrozole for 8 days. In control group, ER β expression was significantly higher than ER α (Figures 2A-2D). In the presence of anastrozole, the level of ER β expression was significantly decreased, whereas ER α expression was not changed (Figures 2A-2E). These results indicated that the local E2 up-regulated ER β , but not ER α , expression in hippocampal H19-7 cells.

Local E2-increased ER β expression is a basal ER α - and ER β -dependent mechanism

We further examined the underlying mechanism of local E2-induced ER β expression by using qRT-PCR and Western blotting analysis. Hippocampal H19-7 cells exposed to anastrozole for 8 days had significantly lower ER β expression than control group (Figures 3A-3C). The level of ER β expression could be restored by administration of specific agonist of ER α (100 nM PTT) and ER β (100 nM DPN) in day 7th of experimental period. This result indicates that the local E2-induced ER β expression is a basal ER α and ER β -dependent mechanisms. Wortmannin (200 nM Wort.), a specific PI-3K inhibitor, had no additive effect on anastrozole-suppressed ER β expression (Figures 3A-3C). Wortmannin attenuated PPT-, but not DPN-, induced ER β expression. Therefore, local hippocampal E2

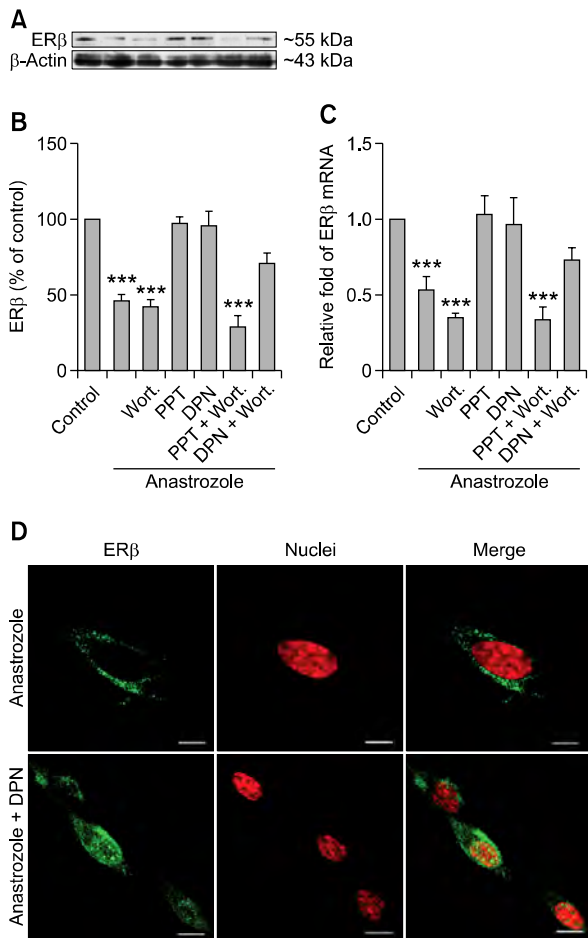


Figure 3. The mechanism of local hippocampal E2 regulated ERβ expression. The quantitative immunoblot analysis of ERβ in control and 8 days-anastrozole exposed neuron (A). 100 nM PPT, 100 nM DPN, or 200 nM Wortmannin (Wort.) was added to the culture media of anastrozole-treated neuron in 7-8 days prior to harvested cells. Representative densitometric analysis of ERβ expression in H19-7 cells (B). Representative immunofluorescent image of ERβ (green signal) and nucleus (red signal) of anastrozole and anastrozole plus DPN-treated cells (C). Scale bar = 10 μM. β-actin was the housekeeping protein. *** $P < 0.001$ vs control group.

enhanced ERβ expression in basal ERα-PI-3K dependent mechanism.

We further examined the effect of local E2 on ERβ activation by determining the translocation of basal ERβ in hippocampal H19-7 cells by using laser confocal microscopy (Figure 4D). In anastrozole treated group, the basal ERβ localized in cytoplasmic and membranous regions of hippocampal H19-7 cells. After DPN treatment, basal membranous and cytoplasmic ERβ decreased, but the nuclear ERβ increased. This findings suggest that the membranous and cytoplasmic ERβ translocalize into nucleus in ligand-dependent mechanism, indicating a characteristic of classical genomic action.

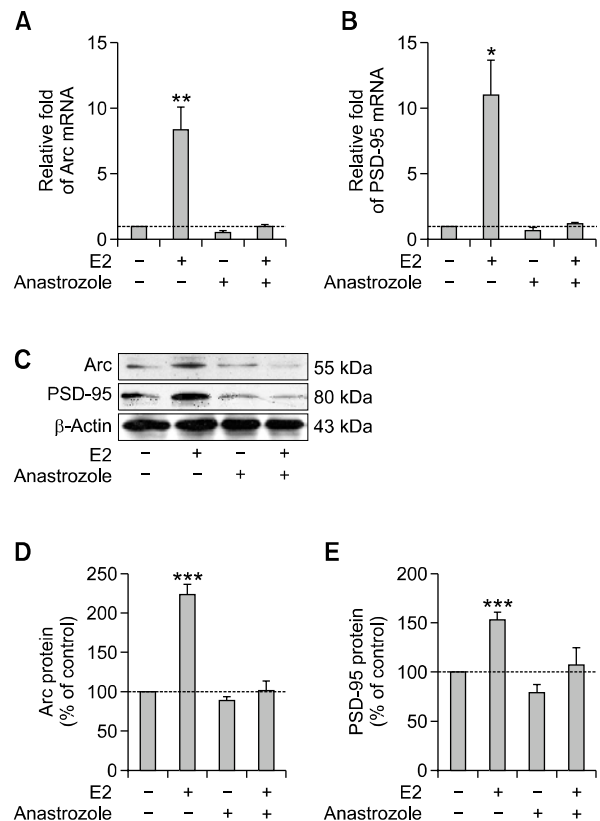


Figure 4. The effect of endogenous E2 on exogenous E2-induced H19-7 hippocampal synaptic plasticity. Representative quantitative qRT-PCR (A, B) and Western blotting analysis (C, D, E) of Arc and PSD-95 expression in H19-7 hippocampal neurons. Densitometric analysis of Arc (D) and PSD-95 (E) protein in H19-7 cells. GAPDH was the housekeeping mRNA in real-time PCR. β-actin was the housekeeping protein. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group ($n = 5$).

Local E2 mediates exogenous E2-induced synaptic plasticity

Although local hippocampal E2- and exogenous E2-enhanced hippocampal synaptic plasticity had been explained (Prange-Kiel and Rune, 2006), the role of the local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity is still unclear. By using synaptic plasticity markers, Arc and PSD-95, we observed the interactive effect of local and exogenous E2 on synaptic plasticity using qRT-PCR and Western blot analysis in hippocampal H19-7 cells. As shown in Figures 3A and 3B, exogenous E2 treatment for 30 min and 6 h significantly increased Arc and PSD-95 mRNA expression, respectively. Anastrozole unaltered the basal Arc and PSD-95 mRNA expression. Interestingly, exogenous E2 could not enhance Arc and PSD-95 mRNA expression when hippocampal H19-7 cells were cultured in anastrozole-containing media (Figures 3A and 3B).

Similar to those mRNA, administration of exogenous

E2 (1 h and 48 h for Arc and PSD-95, respectively) also induced Arc and PSD-95 proteins expression (Figures 3C-3E). Anastrozole had no effect on basal Arc and PSD-95 proteins expression. Exogenous E2 failed to enhance Arc and PSD-95 protein expression in anastrozole-treated neurons (Figures 3D and 3E). These findings indicated that hippocampal E2 was prerequisite for exogenous E2-enhanced hippocampal synaptic plasticity.

Local E2 mediates neuroprotective effect of exogenous E2

The neuroprotective effects of E2 have been well demonstrated. However, the involvement of local E2 on neuroprotective effect of exogenous E2 is still elusive. As demonstrated in Figure 5A, 1 h of 200 μ M H₂O₂ exposure significantly decreased hippocampal H19-7 cell viability. H₂O₂-induced cell death was enhanced by anastrozole. Preincubation of the cells with exogenous E2 for 24 h prior to addition of H₂O₂ attenuated H₂O₂-induced cell death. However, therapeutic effect of exogenous E2 on H₂O₂-induced H19-7 cell death was absent when cells were exposed to anastrozole (Figure 5A).

We also observed the effect of local E2 and exogenous E2 on anti-apoptotic protein Bcl2, the specific target of E2 (Dubal *et al.*, 1999). While 24 h of exogenous E2 preincubation significantly enhanced Bcl2 expression, H₂O₂ significantly suppressed its expression (Figures 5B and 5C). Additional effect of anastrozole on H₂O₂-suppressed Bcl2 expression was demonstrated. Similar to those cell viability studies, exogenous E2 totally rescued Bcl2 expression in H₂O₂-treated H19-7 cells. Exogenous E2 could not restore H₂O₂-suppressed Bcl2 expression in anastrozole treated neurons (Figures 5B and 5C). These findings suggest the prerequisite role of local hippocampal E2 on neuroprotective function of exogenous E2.

Discussion

De novo E2 production and secretion in hippocampus has been demonstrated in both primary hippocampal neurons (Prange-Kiel *et al.*, 2003) and hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). In the present study, we showed the production and secretion of local E2 in hippocampal H19-7 cells. Our findings demonstrate the sigmoidal secretory profile of H19-7 hippocampal E2. In first 3 days after seeding the secreted E2 levels relatively constant probably due to the preparation of intracellular machinery that responsible for production and secretion of E2, we named this period as "the

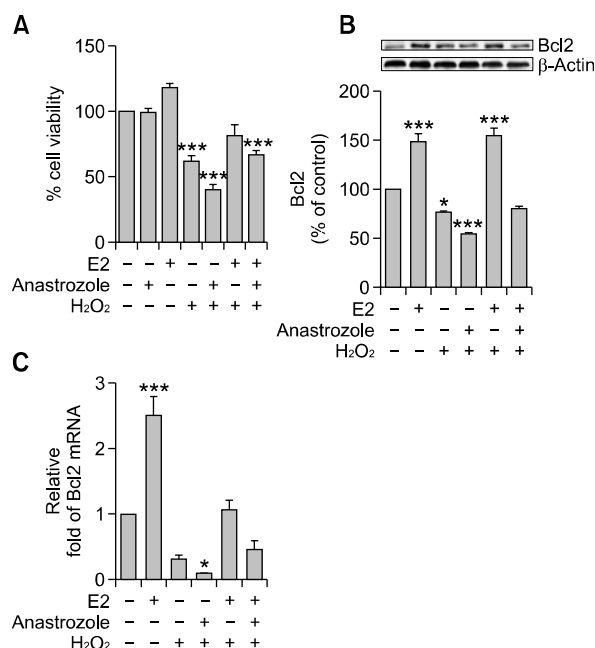


Figure 5. The effect of endogenous E2 on neuroprotective effect of exogenous E2. Representative cell viability data from MTT assay (A). Anti apoptotic Bcl2 expression in H19-7 hippocampal neurons (B and C). β -actin was the housekeeping protein. * P < 0.05, *** P < 0.001 vs control group (n = 5).

preparation state". In days 4 to 7, secreted E2 rapidly increased from 16.2% to 90.6% of maximum secreted E2; it was named "the active state". Finally, secreted E2 reached the maximum plateau state in days 8 to 12. However, secreted E2 levels were relatively unaltered when hippocampal H19-7 cells were incubated with anastrozole. This finding indicates that E2 production and secretion in hippocampal H19-7 cells required aromatase activity similar to those reported in primary hippocampal neurons (Prange-Kiel *et al.*, 2003) and hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). In addition, the maximum secreted E2 levels in hippocampal H19-7 cells were comparable to that report in hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). Therefore, H19-7 hippocampal cells were a suitable model for studying the effect and mechanism of hippocampal E2 on hippocampal neuronal functions.

It has clearly been demonstrated that GnRH receptor expressed in hippocampus (Chu *et al.*, 2008; Schang *et al.*, 2011), thus, hippocampal neuron can selectively respond to GnRH treatment. In the present study, we reported the activating effect of GnRH on local hippocampal E2 level, indicating that GnRH enhanced endogenous E2 biosynthesis in hippocampal H19-7 cells. Similar to previous study, that demonstrated the activating

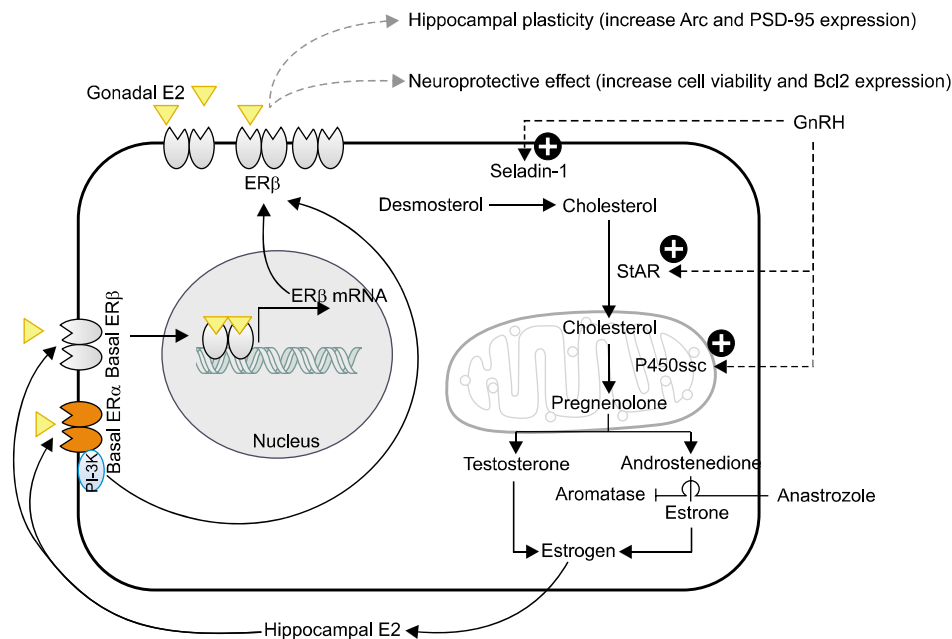


Figure 6. Schematic hypothetical model illustrating the prerequisite action of local hippocampal E2 on exogenous E2-induced synaptic plasticity and neuroprotection. GnRH enhanced local hippocampal E2 biosynthesis possibly via seladin-1, StAR, and P450scc expression. Hippocampal E2 biosynthesis regulates by endogenous aromatase activity. Secreted hippocampal E2 activates basal ER α and ER β to further upregulate ER β expression. Hippocampal synaptic plasticity enhancing and neuroprotective functions of exogenous E2 mediates by ER β .

effect of GnRH on E2 biosynthesis and secretion in SH-SY5Y neurons (Rosati *et al.*, 2011). GnRH enhanced the expression of enzymes involved in E2 biosynthesis, including seladin-1, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and cytochrome P450 (Attar and Bulun, 2006), indicated the feasibility of using hippocampal H19-7 cell for investigating the role of local E2 on hippocampal function.

There are two ER subtypes, ER α and ER β , which are expressed in hippocampus (Bliss and Collingridge, 1993). Expressions of those ERs are regulated by its ligand, E2 (Murata *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004). In the present study, we showed the direct activating action of local hippocampal E2 on ER β expression. Suppression of the local E2 by aromatase inhibitor led to downregulation of ER β expression in hippocampal neurons. Local hippocampal E2 had no effect on ER α expression. In hippocampus, ER β play an important role in long-term potentiation (LTP) enhancement, memory improvement (Day *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008), and neuroprotection (Dubal *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). The autocrine and paracrine actions of hippocampal E2 on an enhancement of ER β expression are suggested to prime hippocampal neurons for further activation by exogenous E2.

We also demonstrated that hippocampal E2 acted through basal ER α -PI-3K-dependent pathway to enhance ER β expression, which classified as a non-genomic pathway. Membrane ER α directly interacted with PI-3K (Simoncini *et al.*, 2003),

therefore ER α agonist PPT failed to activate wortmannin-treated cells. On the other hand, local hippocampal E2 activated nuclear translocation of basal ER β in H19-7 hippocampal cells, which was consistent with our previous report (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010). Exogenous E2 activated ER β translocation into nucleus to enhance synaptic plasticity (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010), hence local hippocampal and exogenous E2 regulated neuronal function in classical genomic ER β -dependent mechanism.

Previously, the potential action of hippocampal and exogenous E2 on hippocampal synaptic plasticity has been reported (Gould *et al.*, 1990; Prange-Kiel and Rune, 2006). Little is known about the interactive function of local hippocampal and exogenous E2 on synaptic plasticity. Exogenous E2 upregulated synaptic plasticity marker expression in hippocampal H19-7 cells. However, when endogenous E2 synthesis was inhibited by aromatase inhibitor anastrozole, exogenous E2 could not enhance synaptic plasticity in hippocampal H19-7 cells, suggesting that exogenous E2 function is endogenous E2-dependent mechanism. Previously, ER β knockout mice exhibited attenuation of hippocampal plasticity and memory impairment (Day *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008) although exogenous E2 is still present. Since the downregulation of ER β expression is demonstrated in anastrozole-treated hippocampal H19-7 cells, E2 could not enhance hippocampal synaptic plasticity similar to those transgenic mice. The priming action of local hippocampal E2 on ER β expression is suggested to

be essential for exogenous E2-enhanced hippocampal synaptic plasticity.

Neuroprotective function of both exogenous E2 and endogenous E2 has been identified (Dubal *et al.*, 1999; McCullough *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Exogenous E2 exclusively mediated Bcl2 expression, but not other Bcl2 family, including Bax, Bcl-xl, Bcl-xs, and Bad, to prevent neuronal death in ischemic brain injury model (Dubal *et al.*, 1999). On the other hand, aromatase knockout mice exhibited higher brain damage than the wild type-OVX mice after cerebral artery occlusion (McCullough *et al.*, 2003), indicated an important role of local E2 on neuronal viability. In the present study, we reported the priming action of hippocampal E2 on exogenous E2 enhanced hippocampal H19-7 cell viability and Bcl2 expression. Local hippocampal E2 influenced ER β expression that required for exogenous E2-enhanced Bcl2 expression and neuronal viability (Dubal *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Therefore, neuroprotective action of exogenous E2 requires autocrine and paracrine actions of hippocampal E2-induced ER β expression.

In conclusions, our study demonstrated the priming action of hippocampal E2 on systemic E2 functions, as depicted in Figure 6. Endogenous aromatase mediates H19-7 hippocampal E2 biosynthesis. GnRH enhances hippocampal E2 biosynthesis and secretion probably via STAR and P450scc activation (Mukai *et al.*, 2010). Secreted hippocampal E2 upregulates hippocampal ER β expression through basal ER α and ER β activations. The basal ER α activation directly mediates PI-3K signaling pathway, whereas basal ER β activation translocates into nucleus. This mechanism provides the hippocampal ER β to respond to systemic E2 lead to enhance hippocampal synaptic plasticity and neuroprotection.

Methods

Cell culture

H19-7 cells of hippocampal origin (H19-7 hippocampal cells; ATCC[®] Number, CRL-2526[™]) were grown on poly-L-lysine-coated dishes, in Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 33°C as described previously (Bhargava *et al.*, 2000). Hippocampal H19-7 cells are transformed with a temperature-sensitive mutant of simian virus 40 T antigen and are conditionally differentiated. For differentiation, cells were incubated in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 39°C in DMEM and N₂ supplements (Invitrogen, Carlsbad, CA), and the process was accelerated by adding 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (Sigma, St. Louis, MO). To find out the optimal level of E2 secretion, hippocampal H19-7 cells were incubated with

culture media, 25 nM anastrozole-containing culture, or 0.01 μ M GnRH-containing culture media for 12 days. To investigate the effect and mechanisms of local hippocampal E2 on exogenous E2, cells were treated with 10 nM E2, 25 nM anastrozole, 100 nM PPT, 100 nM DPN, or 200 nM wortmannin according to the need of each experiment. All stimulant drugs are purchased from Sigma.

ELISA

To evaluate secreted E2 levels in culture media, colorimetric rat E2 ELISA kits (TSZ ELISA; Framingham, MA) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, culture medium were pipetted into micro-assay well which had been precoated with monoclonal antibody against E2, followed by incubation at 37°C for 30 min. And then washing buffer was added to wash an excess binding before added HRP-conjugated reagent to each well. To develop the reaction, chromogen substrate was 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 was read at 540 nm on a microplate reader (Bio-Tek). Samples were quantified by interpolation with standard curve.

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, hippocampal H19-7 cells were seeded on 12-mm glass coverslips at a density of 10,000 cells/coverslip and cultured overnight as previously described (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). At the end of all treatments, cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde at 4°C, followed by permeabilization in 0.2 M glycine. After blocking of nonspecific binding, cells were incubated overnight at 4°C with 1:100 mouse anti-ER α or 1:100 mouse anti-ER β antibodies (Abcam, Cambridge, UK). After washing away excess primary antibodies, cells were then incubated with 1:1000 fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-mouse IgG secondary antibody (Zymed), and subsequently stained for nuclei with 1:500 TROPO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). We used a confocal laser-scanning microscope (model FV 1000; Olympus, Tokyo, Japan) to analyze the fluorescent signals.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). H19-7 hippocampal cells were lysed with RIPA buffer. Equal amounts of protein were separated on 10% SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with 1:1000 mouse anti-ER α , -ER β , -Arc (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), rabbit anti-PSD-95 (Abcam), or -Bcl2 (Abcam) antibodies, and then incubated with a HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA). The signal was detected with ECL Western blotting substrate (Pierce, Rockford, IL) and captured on Hyperfilm[™] (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Quantitative real time-PCR (qRT-PCR)

To determine mRNA levels of *Arc*, *PSD-95*, *ER α* , *ER β* , and *Bcl2* in H19-7 hippocampal neuron, total RNA was extracted by using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol as previously described (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). A 2 μ g total RNA was converted to cDNA with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on the Applied Biosystems PRISM 7700 Sequence Detection System using TaqMan-Gene Expression Assays with FAMTM dye-labeled TaqMan[®] MGB probes, which contained customized primer design according to the manufacturer's protocol. The positive endogenous control was GAPDH and the negative control was water. The relative expression of mRNA was calculated using the comparative Ct method by using SDS software v.1.3.1 (Applied Biosystems). All data were normalized with the endogenous reference gene GAPDH expression (Applied Biosystems).

MTT reduction assay

The cell viability was determined by the quantitative colorimetric with MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma). Cells were plated on 96-well culture plates at a density of 10,000 cells per well. Cells were cultured in media or media containing anastrozole for 8 days, then, treated with 200 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂) or culture media for 1 h. The medium was removed and mixed with a solution of 1 mg/ml MTT for 3 h in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. The supernatant was then removed, and the formazan crystals in the cells were solubilized with DMSO. Absorbance was read at 570 nm on a microplate reader.

Data analysis

All data were expressed as mean $\pm$ SEM. Two sets of data were compared using the unpaired Student's *t*-test. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's posttest was employed for multiple sets of data. The level of significance of all statistical tests was $P < 0.05$. Linear regression and non-linear regression analysis were performed to obtain the % maximum secreted E2-incubation period relationship. All data were analyzed by GraphPad Prism version 5.0 for Window (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund and Higher Education Commission (No. MRG5480211) and Higher Education Commission (No. 44496) to S. Chamniansawat. We also thanks Dr. Narongrit Thongon for a kind technical assistance.

References

- Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006;12:49-56
- Bhargava A, Meijer OC, Dallman MF, Pearce D. Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. *J Neurosci* 2000;20:3129-38
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-9
- Chamniansawat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (*Arc*) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2009;452:130-5
- Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2010;470:49-54
- Chu C, Gao G, Huang W. A study on co-localization of FSH and its receptor in rat hippocampus. *J Mol Histol* 2008;39: 49-55
- Day M, Sung A, Logue S, Bowlby M, Arias R. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 2005;164:128-31
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates *Bcl2* in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 1999;19: 6385-93
- Gorenstein C, Rennó J, Vieira Filho AH, Gianfaldoni A, Gonçalves MA, Halbe HW, Fernandes CE, Demétrio FN. Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: a randomized trial. *Arch Womens Ment Health* 2011;14:367-73
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 1990;10:1286-91
- Henderson VW. Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800:1077-83
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:865-70
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 2004;24:5913-21
- Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen receptor-

beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 2008;11:334-43

McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Oz OK, Hurn PD. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci* 2003;23:8701-5

Murata T, Narita K, Honda K, Matsukawa S, Higuchi T. Differential regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNAs in the rat uterus during pregnancy and labor: possible involvement of estrogen receptors in oxytocin receptor regulation. *Endocr J* 2003;50:579-87

Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, Kawato S, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:1030-44

Oliveira CA, Mahecha GA, Carnes K, Prins GS, Saunders PT, França LR, Hess RA. Differential hormonal regulation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction* 2004;128:73-86

Prange-Kiel J, Rune GM. Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 2006;138:765-72

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 2003;13:226-34

Rosati F, Sturli N, Cungi MC, Morello M, Villanelli F, Bartolucci

G, Finocchi C, Peri A, Serio M, Danza G. Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;124:77-83

Schang AL, Ngô-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut MC, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN. GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity. *Endocrinology* 2011;152:568-80

Simoncini T, Rabkin E, Liao JK. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:198-203

Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 1992;12:2549-54

Zhao L, Wu TW, Brinton RD. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res* 2004;1010:22-34

Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM. Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of OVX mice. *Endocrinology* 2010;151:1153-60

บทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสและเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จาก
ต่อมเพศต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

The Role of Hippocampal Estrogen and Gonadal Estrogen on Hippocampal Neuronal Functions

ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์*

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Siriporn Chamniansawat*

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University.

บทคัดย่อ

เอสโตรเจนเป็นกลุ่มของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีการสังเคราะห์มากในต่อมเพศ ก่อนส่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย รวมถึง ระบบประสาท โดยมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท และส่งเสริมกระบวนการเรียนรู้และการสร้างความจำ นอกจากนี้เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศแล้วยังมีการสังเคราะห์เอสโตรเจนขึ้นภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสโดยตรง ยิ่งไปกว่านั้นหากไม่มีเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในฮิปโปแคมปัสเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจะไม่สามารถตอบสนองต่อเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในฮิปโปแคมปัสมีหน้าที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อเอสโตรเจนปริมาณมากในกระแสเลือด บทความวิชาการนี้จะแสดงความเชื่อมโยงระหว่างเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศและเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในฮิปโปแคมปัสต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในหลอดทดลอง

คำสำคัญ : การสังเคราะห์เอสโตรเจน การสร้างความจำ การปกป้องเซลล์ประสาท ฮิปโปแคมปัส

Abstract

Estrogen is a group of steroid hormones which is mainly synthesized in the gonad and reaches its target organs via blood circulation. It plays an important role in several body systems including nervous system, such as neuroprotection and memory function. In addition to gonadal estrogen, the localization of endogenous estrogen has been clearly shown in hippocampus. Hippocampal estrogen has a direct effect on hippocampal neuronal functions. In addition, hippocampal neuron can not respond to gonadal estrogen when hippocampal estrogen is not present. Therefore, hippocampal estrogen may exist to prime hippocampal neurons for further activation by systemic estrogen. This article indicates the interactive action of hippocampal estrogen on gonadal estrogen effects on hippocampal neurons in an *in vitro* study.

Keywords : estrogen biosynthesis, memory formation, neuroprotection, hippocampus

*E-mail: siripornc@buu.ac.th

เอสโตรเจน (estrogen) เป็นกลุ่มของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (McEwen & Alves, 1999) กระตุ้นและส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010) งานวิจัยจำนวนมากจึงพยายามศึกษาและพัฒนาเอสโตรเจนเพื่อนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน เป็นต้น (Vegeto *et al.*, 2008; Purohit & Reed, 2002) ในร่างกายมนุษย์ เอสโตรเจนส่วนใหญ่ถูกสร้างจากต่อมเพศก่อนหลังเข้าสู่กระแสเลือด (gonadal estrogen) เพื่อไปควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมาย (Fang *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์เป้าหมาย (endogenous estrogen) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์นั้นๆ อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูง (Purohit & Reed, 2002) เช่น เอสโตรเจนที่ถูกสร้างภายในเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampal estrogen) และมีอิทธิพลโดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ ดังนั้นการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจึงน่าจะเป็นอิสระจาก gonadal estrogen แต่ในความเป็นจริงโรคทางระบบประสาทต่างๆ มักเกิดขึ้นกับหญิงชราวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีระดับ gonadal estrogen ต่ำลงอย่างมาก แสดงให้เห็นชัดเจนว่า gonadal estrogen ยังคงมีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส จึงเป็นที่น่าสนใจว่าโดยแท้จริงแล้วการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสนั้นขึ้นกับเอสโตรเจนจากแหล่งใดเป็นสำคัญ และมีกลไกการออกฤทธิ์อย่างไร โดยบทความนี้จะนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทที่ชัดเจนของ hippocampal estrogen และ gonadal estrogen ต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

1. การสังเคราะห์เอสโตรเจน

เอสโตรเจน คือ กลุ่มของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในเพศหญิง ซึ่งส่วนมากถูกสร้างขึ้นจากต่อมเพศ (gonadal estrogen หรือ exogenous estrogen) และหลังเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อไปควบคุมการทำงานของอวัยวะเป้าหมาย (McEwen & Alves, 1999) นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนซึ่งถูกสังเคราะห์ที่บริเวณอื่นนอกเหนือจากต่อมเพศ เรียกเอสโตรเจนในกลุ่มนี้ว่า extragonadal estrogen หรือ endogenous estrogen อวัยวะที่สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้เอง ได้แก่ ต่อมหมวกไต รก เต้านม และ สมอง (Fester *et al.*, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซึ่งมีการค้นพบในปี 1995 โดย Robel และคณะ แสดงให้เห็นว่ามีการคงอยู่ของเอสโตรเจนในสมองของสัตว์ทดลองขณะที่ยับยั้ง

การสร้าง gonadal estrogen โดยการตัดรังไข่ (Robel *et al.*, 1995) ต่อมาในปี 2003 Prange-Kiel และคณะได้ตรวจพบเอสโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ของ primary hippocampal neuron (1 pg/ml) และในปี 2004 Kretz และคณะ พบเอสโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัส (24 pg/ml) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสังเคราะห์และการหลั่งเอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

การสังเคราะห์เอสโตรเจนเริ่มจากการเปลี่ยนโคเรสเตอรอลเป็น pregnenolone ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) ภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งการส่งผ่านข้ามเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียต้องอาศัยโปรตีนตัวพาที่สำคัญคือ steroidogenic acute regulatory protein (StAR) และจัดเป็นขั้นตอนกำหนดอัตรา (rate-limiting step) ของกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน จากนั้น pregnenolone จะถูกเปลี่ยนเป็น dehydroepiandrosterone (DHEA) และ DHEA ถูกเปลี่ยนเป็น testosterone ตามลำดับ สุดท้ายเอนไซม์ aromatase จะทำการเปลี่ยน testosterone ไปเป็นเอสโตรเจนภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Fang *et al.*, 2001; Saldanha *et al.*, 2009) ดังนั้นการพบเอนไซม์ aromatase และ P450scc จึงบ่งชี้ว่าการสังเคราะห์เอสโตรเจนขึ้นภายในเซลล์นั้นๆ เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีการแสดงออกของ steroidogenic enzymes ที่สำคัญจำนวนมาก อาทิเช่น StAR (Wehrenberg *et al.*, 2001), P450scc (Do Rego *et al.*, 2009) และ aromatase (Fester *et al.*, 2011; Yague *et al.*, 2010) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส คือ steroidogenic cell ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอสโตรเจนและใช้ศึกษากันอย่างแพร่หลายทั้ง primary hippocampal neuron (Prange-Kiel *et al.*, 2003) และ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H19-7 hippocampal neuron (Chamniansawat & Chongthammakun, 2012)

2. กลไกการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน

นอกจากจะมีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์แล้ว เอสโตรเจนยังมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท ได้แก่ การปกป้องและรักษาเซลล์ประสาทด้านการอักเสบในสมอง ตลอดจนกระตุ้นกระบวนการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2009, 2010, 2012; Vegeto *et al.*, 2008) ทั้งนี้เอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่านตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมาย ในปัจจุบันนี้มีการจำแนกตัวรับเอสโตรเจนออกเป็น 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งการแสดงออก คือ ตัวรับเอสโตรเจนในนิวเคลียส

(nuclear ER) และ ตัวรับเอสโตรเจนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane ER) เมื่อเอสโตรเจนจับกับ nuclear ER ภายในเซลล์ nuclear ER ที่จับกับเอสโตรเจนจะมีการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ เป้าหมายเพื่อกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยจับกับตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงบนสายดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย (estrogen responsive element) เพื่อการสังเคราะห์ยีนและโปรตีนชนิดใหม่ เรียกกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวว่า กลไกแบบผ่านยีน (genomic action) หากเอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่าน membrane ER จะนำไปสู่การกระตุ้นกลไกการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signaling pathway) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมายอย่างรวดเร็ว เรียกกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวว่า กลไกแบบไม่ผ่านยีน (non-genomic action) (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010) เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจนจะสามารถจำแนกตัวรับเอสโตรเจนออกเป็น 3 ชนิด คือ ตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา ($ER\alpha$), ตัวรับเอสโตรเจนชนิดบีตา ($ER\beta$) และ G-protein coupled receptor 30 (GPR30) (Raz *et al.*, 2008) ซึ่งตัวรับเอสโตรเจนทั้ง 3 ชนิด มีหน้าที่และการแสดงออกในอวัยวะที่ต่างกัน กล่าวคือ $ER\alpha$ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ และระบบต่อมไร้ท่อ โดยมีรายงานว่าหนูทดลองที่ไม่มียีน $ER\alpha$ ($ER\alpha$ knockout mice) ไม่สามารถสืบพันธุ์และแพร่พันธุ์ได้ ในขณะที่หนูทดลองที่ไม่มียีน $ER\beta$ ($ER\beta$ knockout mice) ไม่มีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ (Rissman *et al.*, 1997; Kregge *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาต่อมาแสดงให้เห็นว่าทั้ง $ER\alpha$ และ $ER\beta$ มีการแสดงออกในสมอง บริเวณที่แตกต่างกัน กล่าวคือ $ER\alpha$ มีการแสดงออกมากในเซลล์ประสาทชนิด cholinergic บริเวณ basal forebrain bundle ซึ่งเป็นส่วนของสมองที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมทางอารมณ์ ในขณะที่ $ER\beta$ มีการแสดงออกมากบริเวณฮิปโปแคมปัส และ ซีรีบรัม คอร์เท็กซ์ (Shughrue *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นส่วนของสมองที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ และการสร้างความจำ (Ter Horst, 2010) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chamniansawat และ Chongthammakun ในปี 2010 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่าน $ER\beta$ ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010) ส่วนการทำงานของ GPR30 นั้นยังไม่มีที่ทราบแน่ชัด

2.1 อิทธิพลของเอสโตรเจนต่อการสร้างความจำ

2.1.1 Gonadal estrogen

มีหลักฐานที่ชัดเจนแสดงให้เห็นว่าระดับของเอสโตรเจน

ที่ลดลงในหญิงวัยหมดประจำเดือนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความรุนแรงของภาวะความจำเสื่อม (Purohit & Reed, 2002) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และการได้รับเอสโตรเจนทดแทนสามารถยับยั้งและป้องกันภาวะดังกล่าวได้ (Miller, 1996; Henderson, 2010) แสดงให้เห็นว่า gonadal estrogen มีอิทธิพลต่อกระบวนการเรียนรู้และการสร้างความจำ (Sherwin, 1994) โดยการทำงานของ gonadal estrogen สามารถเพิ่มศักยภาพไฟฟ้าที่เรียกว่า long-term potentiation ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (Smith *et al.*, 2009) เพิ่มการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ synaptic plasticity (Chamniansawat & Chongthammakun, 2009) ตลอดจนเพิ่มจำนวน synapse ในฮิปโปแคมปัสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Smith *et al.*, 2009) ซึ่งทั้งหมดเป็นกลไกที่สำคัญในการสร้างความจำ จึงสรุปได้ว่า gonadal estrogen หรือการได้รับเอสโตรเจนทดแทน ส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งการทำงานดังกล่าวนี้อาศัยการทำงานของ $ER\beta$ (Liu *et al.*, 2008) นอกจากนี้ Chamniansawat และ Chongthammakun (2010) แสดงให้เห็นลำดับของกลไกการทำงานของ gonadal estrogen ผ่านการกระตุ้น $ER\beta$ กล่าวคือ ในภาวะปกติหรือภาวะที่มีเอสโตรเจนระดับต่ำจะกระตุ้น $ER\beta$ ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์และเกี่ยวข้องสอดคล้องกับกระตุ้นการสร้างความจำในระยะเริ่มต้น จากนั้น $ER\beta$ ที่จับกับเอสโตรเจนจะเคลื่อนที่เข้ามาภายในเซลล์และเข้าสู่นิวเคลียส ที่ซึ่งเกิดการสังเคราะห์ยีนและโปรตีนชนิดใหม่เพื่อตอบสนองต่อการทำงานของเอสโตรเจนในการสร้างความจำ ได้แก่ activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc), postsynaptic density-95 (PSD-95) และ synaptophysin (Chamniansawat & Chongthammakun, 2009, 2010)

2.1.2 Hippocampal estrogen

ภายหลังจากการค้นพบว่าการสังเคราะห์เอสโตรเจนขึ้นภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในช่วงปี 1980 ทำให้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงบทบาทและหน้าที่ของ hippocampal estrogen และพบว่าหากมีการยับยั้งการสังเคราะห์ hippocampal estrogen โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aromatase ในฮิปโปแคมปัสโดยการให้ตัวยับยั้ง หรือ การทำให้สัตว์ทดลองไม่มียีน aromatase มีผลยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity และลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ synaptic plasticity ลดจำนวน synapse ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Zhou *et al.*, 2010) นอกจากนี้หากให้เอสโตรเจนแก่เซลล์ประสาทที่ทำการยับยั้งการสังเคราะห์ hippocampal estrogen

ด้วยการยับยั้งการทำงานของ aromatase พบว่าเอสโตรเจนไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ได้ (Kretz *et al.*, 2004) บ่งชี้ว่า การส่งเสริมกลไกการเรียนรู้และการสร้างความจำโดย gonadal estrogen นั้นต้องการ hippocampal estrogen แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานดังกล่าวก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ต่อมา Chamniansawat และ Chongthammakun (2012) แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ hippocampal estrogen มีผลลดการแสดงออกของ ER β ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ gonadal estrogen จะไม่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างความจำในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเมื่อมีการยับยั้งการสังเคราะห์ hippocampal estrogen (Chamniansawat & Chongthammakun, 2012) แสดงให้เห็นว่า hippocampal estrogen มีบทบาทสำคัญต่อการเตรียมตัวและการปรับตัวของเซลล์ประสาทในการตอบสนองต่อ gonadal estrogen ผ่านการควบคุมการแสดงออกและการทำงานของ ER β

2.2 อิทธิพลของเอสโตรเจนต่อการปกป้องเซลล์ประสาท

2.2.1 Gonadal estrogen

ได้มีการรายงานถึงผลของเอสโตรเจนในการปกป้องเซลล์ประสาทมาเป็นเวลานาน โดยงานวิจัยแรกๆ รายงานว่า เพศหญิงมีอัตราการตายของเซลล์ประสาทหลังจากเกิดภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemia) น้อยกว่าเพศชาย (Simpkins *et al.*, 1997) การศึกษาต่อมาพบว่าระดับความรุนแรงของการบาดเจ็บจากภาวะสมองขาดเลือดจะมีความสัมพันธ์กับระดับของเอสโตรเจนในกระแสเลือดของสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าความรุนแรงดังกล่าวน้อยที่สุดในระยะ proestrous cycle ซึ่งเป็นระยะที่มีระดับของเอสโตรเจนสูงที่สุด (Carswell *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การขาดเอสโตรเจนเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพิ่มขึ้น (Meng *et al.*, 2010) การปกป้องเซลล์ประสาทของเอสโตรเจนอาศัยการกระตุ้นตัวรับเอสโตรเจน โดยเฉพาะ ER β กล่าวคือ เมื่อให้ diethylstilbestrol (DES) ซึ่งมีฤทธิ์จำเพาะในการกระตุ้นการทำงานของ ER β สามารถลดระดับความรุนแรงจากภาวะขาดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ ER α ไม่มีผลปกป้องเซลล์ประสาทในภาวะดังกล่าวได้ (Carswell *et al.*, 2004) แสดงให้เห็นว่า gonadal estrogen มีบทบาทในการปกป้องเซลล์ประสาทผ่านการกระตุ้น ER β

2.2.2 Hippocampal estrogen

นอกจาก gonadal estrogen จะมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท hippocampal estrogen ก็มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้เช่นกัน ในปี 2003 McCullough และคณะรายงานว่าสัตว์ทดลองที่ไม่มียีน aromatase ซึ่งเป็นการยับยั้งการสังเคราะห์ hippocampal estrogen แต่ยังมี gonadal estrogen จะนำไปสู่การเพิ่มความรุนแรงของการบาดเจ็บของสมองจากภาวะสมองขาดเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ถูกตัดรังไข่ซึ่งไม่มี gonadal estrogen (McCullough *et al.*, 2003) บ่งชี้ว่า hippocampal estrogen มีอิทธิพลมากกว่า gonadal estrogen ในการปกป้องเซลล์ประสาท สอดคล้องกับการทดลองของ Chamniansawat และ Chongthammakun (2012) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสได้รับสารพิษ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ในภาวะที่มีการยับยั้งการสังเคราะห์ hippocampal estrogen มีผลลดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยง และลดระดับการแสดงออกของ anti-apoptotic protein (BCL₂) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H₂O₂ อย่างเดียว

สรุป

หลักฐานการศึกษาวิจัยจนถึงปัจจุบันบ่งชี้ว่า การคงอยู่ของ hippocampal estrogen มีบทบาทสำคัญต่อการเตรียมตัวและการปรับตัวของเซลล์ประสาท โดยการเพิ่มการแสดงออกของ ER β เพื่อรองรับการกระตุ้นจาก gonadal estrogen ในการกระตุ้นกลไกการสร้างความจำ และการปกป้องเซลล์ประสาท หากไม่มี hippocampal estrogen จะส่งผลลดจำนวน ER β ซึ่งเป็น receptor หลักในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และการสร้างความจำ จึงทำให้เซลล์ประสาทเสื่อม และไม่เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในระดับเซลล์ จึงควรมีการศึกษาต่อเนื่องในสัตว์ทดลองและศึกษาเชิงพฤติกรรมเพื่อนำไปสู่การนำไปใช้ในการป้องกันและส่งเสริมการทำงานของระบบประสาทต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (No. MRG5480211) และทุนจากสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา ปีงบประมาณ 2554 (No. 44496)

- Carswell, H.V., Dominiczak, A.F., & Macrae, I.M. (2000). Estrogen status affects sensitivity to focal cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 278, H290-H294.
- Carswell, H.V., Macrae, I.M., Gallagher, L., Harrop, E., & Horsburgh, K.J. (2004). Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287, H1501-H154.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2009). Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 452, 130-135.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2010). Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 470, 49-54.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2012). A priming role of local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Experimental and Molecular Medicine* 44, 403-411.
- Do Rego, J.L., Seong, J.Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon, M.C., Pelletier, G., Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 259-301.
- Fang, H., Tong, W., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S., Xie, Q., Dial, S.L., Moland, C.L., & Sheehan, D.M. (2001). Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 280-294.
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., & Rune, G.M. (2011). Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 345, 285-294.
- Henderson, V.W. (2010). Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800, 1077-1083.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson J.A., & Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 15677-15682.
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., & Rune, G.M. (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Neuroscience*, 24, 5913-5921.
- McCullough, L.D., Blizzard, K., Simpson, E.R., Oz, O.K., & Hurn, P.D. (2003). Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *Journal of Neuroscience*, 23, 8701-8705.
- McEwen, B.S., & Alves, S.E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews*, 20, 279-307.
- Meng, Y., Wang, R., Yang, F., Ji, Z.J., Fang, L., & Sheng, S.L. (2010). Amyloid precursor protein 17-mer peptide ameliorates hippocampal neurodegeneration in ovariectomized rats. *Neuroscience Letters*, 468, 173-177.
- Miller, K.L. (1996). Hormone replacement therapy in the elderly. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 39, 912-932.
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., & Rune, G.M. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13, 226-234.
- Purohit, A., & Reed, M.J. (2002). Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids*, 67, 979-983.

- Raz, L., Khan, M.M., Mahesh, V.B., Vadlamudi, R.K., & Brann, D.W. (2008). Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 16, 140–153.
- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Taylor, J.A., & Lubahn, D.B. (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Hormones and Behavior*, 31, 232–243.
- Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simon, H., & Baulieu, E.E. (1995). Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 355–360.
- Saldanha, C.J., Duncan, K.A., & Walters, B.J. (2009). Neuroprotective actions of brain aromatase. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 106–118.
- Sherwin, B.B. (1994). Estrogenic effects on memory in women. *New York Academy of Sciences*, 743, 213–230.
- Shughrue, P.J., Scrimo, P.J., & Merchenthaler, I. (2000). Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ERalpha and ERbeta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*, 96, 41–49.
- Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J., Bodor, N., & Day, A.L. (1997). Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *Journal of Neurosurgery*, 87, 724–730.
- Smith, C.C., Vedder, L.C., & McMahon, L.L. (2009). Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (Suppl 1), S130–42.
- Ter Horst, G.J. (2010). Estrogen in the limbic system. *Vitamins & Hormones*, 82, 319–338.
- Vegeto, E., Benedusi, V., & Maggi, A. (2008). Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 507–519.
- Wehrenberg, U., Prange-Kiel, J., Rune, G.M. (2001). Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1879–1886.
- Yague, J.G., Azcoitia, I., DeFelipe, J., Garcia-Segura, L.M., & Muñoz, A. (2010). Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Research*, 1315, 41–52.
- Zhou, L., Fester, L., von Blittersdorff, B., Hassu, B., Nogens, H., Prange-Kiel, J., Jarry, H., Wegscheider, K., & Rune, G.M. (2010). Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology*, 151, 1153–1160.

Title: Activated microglia inhibits hippocampal estrogen-mediated memory formation

Siriporn Chamniansawat^{1*} and Sukumal Chongthammakun²

¹Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Rd., Saensook, Muang, Chonburi 20131, Thailand

²Department of Anatomy and Center for Neuroscience, Faculty of Science, Mahidol University, 272 Rama VI Rd., Ratchathewi District, Bangkok 10400, Thailand

*Correspondence:

Siriporn Chamniansawat

Faculty of Allied Health Sciences

Burapha University

169 Long-Hard Bangsaen Road, SaenSook Sub-district, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand

Siripornc@buu.ac.th

Abstract

Aging is a main cause of neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Microglia are key mediators of the mechanism of disease. Activated microglia in aging produces a number of factors that could affect neuron function and survival. Importantly, in the present study we demonstrate that lipopolysaccharide (LPS)-activated microglia is necessary and sufficient to inhibit the processes of memory formation in hippocampal neurons in vitro. Furthermore, we demonstrate that microglia-derived factors induce neuron apoptosis via a mitochondrial pathway regulated by the Bcl-2 family protein. Estrogen-derived hippocampal neuron are known to play a key role in regulation of memory processes and we demonstrated that LPS-activated microglia decrease the number of synaptic protein density, PSD-95, via inhibition of hippocampal estrogen production. Specifically, we show that ER α and ER β are also decreased in H19-7 hippocampal neuron cultured with activated microglia. In summary, we have identified a novel mechanism that age-related microglia activation inhibits synaptic plasticity on hippocampal neuron in vitro that could be targeted to recover memory function in diverse age-related neurological conditions.

Keywords

Aging; Synaptic plasticity; Hippocampal estrogen; Apoptosis

Introduction

Aging has been causally linked to the development of several neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Several lines of evidence have indicated that microglia play an important role in the diseases pathogenesis (Aisen and Davis 1994; Wong 2013). In aging human brain, microglial morphology exhibits an activation state, which increased expression of activated microglia markers including major histocompatibility complex II (MHC-II), CD11b, and ionized calcium-binding adapter

molecule 1 (Iba1) (Miller and Streit 2007). These molecular markers are also increase in aging microglia in the absent of injury or diseases (Frank et al. 2006). Consistent with these markers, aged microglia are found to express increased level of inflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-6), which indicated that microglia-mediated inflammation is a one of age-related factor (Lee et al. 2013). In histopathological study, aging microglial morphologies exhibit a perinuclear cytoplasm hypertrophy and retracted processes, which is a character of an activated microglia (Miller and Streit, 2007). These findings strongly suggested that aging microglia has a similar phenotype with an activated microglia.

In addition, memory loss is another one of the most featured consequences of aging. It has become clear that memory loss in aging results of the failure of estrogen synthesis in the gonads (Adams et al., 2001a). However, estrogen has also been shown to be synthesized by hippocampal neurons (Fester et al., 2011; Chamniansawat and Chongthammakun, 2012). Hippocampal-derived estrogen rapidly regulated all processes of memory formation (Prange-Kiel and Rune, 2006). It also functions for neuronal preparation in responsible to exogenous estrogen functions (Chamniansawat and Chongthammakun, 2012). However, hippocampal estrogen functions are still largely unknown. Interestingly, elevated levels of estrogen in experimental replacement are unable to increase the number of spine density in aged female rat (Adams et al., 2001; 2002). Furthermore, the number of synaptic density was significantly lower in aged ovariectomized (OVX) rat than young OVX rat (Adams et al., 2002). In the past few years, it has become explore that young OVX monkeys has a normal working memory while aged OVX monkeys display significant working memory impairment (Bailey et al., 2011). These findings have exhibited that there are other factors that also play a role in age-related memory impairment. Therefore, the present study aims to demonstrate another effect of aging, age-related microglia activation, on memory formation in hippocampal neuron.

Methods

Cell culture

HAPI microglial cells were generously provided by Prof. James R. Conner (Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; PAA, Laboratories, Morningside, Queensland) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 33 °C as described previously (Thampithak et al., 2009). The cells were plated in 6-well plate and transwell plate for normal culture and co-culture experiments, respectively (Fig 1).

H19-7 cells of hippocampal origin (H19-7 hippocampal cells; ATCC[®] Number, CRL-2526[™]) were grown on poly-L-lysine-coated dishes, in Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 33 °C as described previously (Chamniansawat and Chongthammakun, 2012). Hippocampal H19-7 cells are transformed with a temperature-sensitive mutant of simian virus 40 T antigen and are conditionally differentiated. For differentiation, cells were incubated in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 39 °C in DMEM and N₂ supplements (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the process was accelerated by adding 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To evaluate secreted E2 IL-6 or IL-10 levels in culture media, colorimetric ELISA kits (TSZ ELISA; Framingham, MA, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, culture medium were pipetted into micro-assay well which had been precoated with monoclonal antibody against E2 IL-6 or IL-10 followed by incubation at 37°C for 30 min. And then washing buffer was added to wash an excess binding before added HRP-conjugated reagent to each well. To develop the reaction, chromogen substrate was 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 was read at 540 nm on a microplate reader (Bio-Tek). Samples were quantified by interpolation with standard curve.

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, hippocampal H19-7 cells were seeded on 12-mm glass coverslips at a density of 10,000 cells/coverslip and cultured overnight as previously described (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). At the end of all treatments, cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde at 4 °C, followed by permeabilization in 0.2 M glycine. After blocking of nonspecific binding, cells were incubated overnight at 4 °C with 1:100 mouse anti-Arc, PSD-95, and SYP antibodies (Abcam, Cambridge, UK). After washing away excess primary antibody, cells were then incubated with 1:1000 fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-mouse IgG secondary antibody (Zymed), and subsequently stained for nuclei with 1:500 TROPO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). We used a confocal laser-scanning microscope (model FV 1000; Olympus, Tokyo, Japan) to analyze the fluorescent signals.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). H19-7 hippocampal cells were lysed with RIPA buffer. Equal amounts of protein were separated on 10% SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with 1:1000 mouse anti-ER α , ER β , Arc, SYP, IL-6, iNOS, and IL-10 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), rabbit anti-PSD-95 (Abcam), or -Bcl2 (Abcam) antibodies, and then incubated with a HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA). The signal was detected with ECL Western blotting substrate (Pierce, Rockford, IL) and captured on HyperfilmTM (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Quantitative real time-PCR (qRT-PCR)

To determine mRNA levels of target genes cells, total RNA was extracted by using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol as previously described (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). A 2µg total RNA was converted to cDNA with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on the Applied Biosystems PRISM 7700 Sequence Detection System using TaqMan-Gene Expression Assays with FAMTM dye-labeled TaqMan[®] MGB probes, which contained customized primer design according to the manufacturer's protocol. The positive endogenous control was GAPDH and the negative control was water. The relative expression of mRNA was calculated using the comparative Ct method by using SDS software v.1.3.1 (Applied Biosystems). All data were normalized with the endogenous reference gene GAPDH expression (Applied Biosystems).

Hoechst 33258 Staining

Apoptotic morphological changes in the nuclear chromatin were examined using Hoechst 33258 staining. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with Hoechst 33258 (5 mg/L) for 10 min and examined by fluorescence microscopy to analyze cell chromatin condensation.

Measurement of NO₂ production

For nitrate assays, cells were seeded in 96-well plates (2×10⁵ cells/well), the compounds to be tested were added with LPS (100 ng/ml), and incubation continued for 21–24 h. All of the compounds were dissolved in DMSO, and the final concentration of DMSO in assays was 0.5%. At the end of incubation, 100 µl of conditioned medium was mixed with 100 µl of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine, dihydrochloride, and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid). After 10-min reaction at room temperature, A₅₄₀ was measured with a

plate reader. NO concentration was calculated according to a standard curve of sodium nitrite. l-N-5-(1-Iminoethyl) ornithine hydrochloride (NIO) was used as a reference inhibitor.

Results

LPS activates microglial HAPI cells

We evaluated the effect of LPS induced microglial HAPI cell activation initially by phase-contrast microscopy (Fig. 1A-C). More round or shrunken cells appeared in the culture, when exposed to 100 ng/ml LPS over times (1, 3, and 6 d). Results of quantitative RT-PCR further demonstrate LPS-induced microglia activation by up-regulation of microglia activation markers mRNA, MHC II, CD11b, and Iba1 (Fig. 1C-F). These mRNA levels were markedly induced by LPS treatment compare with untreated microglia (0 d). These results indicate that 100 ng/ml LPS induce microglial HAPI cell transformation from resting to activated states.

LPS induces inflammatory cytokines expression in microglial HAPI cells

To test whether LPS is induced inflammatory response of microglial HAPI cells, we examined the effect of LPS on soluble factors including nitrogen species and both pro- and anti-inflammatory cytokines release from the microglial culture. Microglial HAPI cells were incubated with LPS in the culture medium for 6 d. Medium was collected every 1 day and analyzed for nitric oxide and cytokines release into the medium by nitric oxide assay and ELISA, respectively. As shown in Fig. 2, treatment of microglial HAPI cells with 100 ng/ml LPS significantly ($p < 0.01$) increased IL-6, IL-10, and NO_2^- release by 1 d and persistent for 6 d. LPS-induced IL-10 release was then attenuated during the next 2 d as well as slightly lower than that of the vehicle (0.01% DMSO)-treated control (Fig. 2B). LPS-induced increase in IL-6 and NO_2^- release was dose-dependent (Fig. 2A and C). In addition, a significant increase in IL-6 and iNOS expression after LPS treatment was determined by Western blotting (Fig 3). The expression appears to be correlated with the time of LPS incubation. While IL-10 significantly increased in first 3 days of experiment and then return to baseline. These results

indicate that LPS-activated microglial HAPI cell induces inflammatory response through increased expression of pro-inflammatory cytokine (IL-6 and NO₂) and decreased anti-inflammatory (IL-10).

LPS-activated microglial HAPI cell induces apoptosis of H19-7 hippocampal neurons

To investigate the effect of activated microglia on hippocampal neuron apoptosis, the H19-7 hippocampal neurons were co-culture with LPS-activated microglia in transwell and the pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, an essential regulators of mitochondrial mediated apoptotic pathways, was determined. As shown in Fig. 4, culture of H19-7 hippocampal cells in normal condition profoundly increased Bcl2 expression by 2 d and increased 5-folds by 6 d. In contrast, hippocampal neuron cultured with LPS-activated microglia showed a significantly decreased of Bcl2 at 2 d and remained unchanged until the end of incubation period.

However, LPS has no effect on the hippocampal neuron (result not shown). Consistent with Bcl2 expression, the fraction of apoptotic cells was assessed by Hoechst 33342 staining. As shown in Figures 4C and D, the fraction of apoptotic cells was found in hippocampal neuron cultured with LPS-activated microglia for 6 d but not in the same day of the normal culture. These results suggest that releasing factors-derived microglia activation induces H19-7 hippocampal neuron apoptosis primarily through a mitochondrial-dependent pathway regulated by the Bcl-2 protein family.

Activated microglia inhibit the expression of synaptic marker protein in H19-7 hippocampal neuron

Hippocampal neuronal plasticity is main molecular mechanism of memory formation. Therefore, we next examined whether mechanism of memory loss is associated with the activation of microglia. As shown in figure, the expression of PSD-95 was decreased in H19-7 hippocampal neuron cultured with activated microglia. Moreover, neuronal processes were also decreased in the co-culture. PSD-95 plays an essential role in regulating hippocampal

synaptic transmission, synaptic plasticity, and hippocampus-dependent behaviour (Nagura, 2012), indicating that activated microglia-derived cytokines may have a physiological role in the inhibition of memory formation.

Activated microglia inhibits hippocampal estrogen synthesis

Since we have already shown that estrogen synthesizes in normal culture of H19-7 hippocampal cells (Chamniansawat and Chongthammakun, 2012), we next examined whether estrogen-derived hippocampal neuron is necessary for activated microglia inhibit synaptic plasticity in H19-7 hippocampal neuron. To address this, we compared amount of secreted estrogen in culture media of H19-7 hippocampal neuron derived from normal culture and co-culture using ELISA kit. Time-course experiments showed that secreted estrogen levels were significantly ($p<0.05$) elevated for 3 d to 40% of control value and progressively increased over time. At the end of the experiment (6 day after cultured with activated microglia), secreted estrogen levels were increased up to 100% of control value. Furthermore, we also analyzed the long-term effect of LPS-activated microglia on hippocampal estrogen secretion. Interestingly, the level of estrogen still significantly increased in the H19-7 hippocampal cells cultured with activated microglia for 3 d but the amount of secreted estrogen significantly lower than that of normal. In co culture, secreted estrogen returned to the control level by 4 day then progressively decreased through the end of incubation period. This rapid decrease of estrogen secretion (3-6 d) was related with level of cytokine expression, which rapid increased in 6 d. Time-course experiments showed that secreted estrogen levels in co-culture were significantly lower than that of the normal from 3 d and until the end of the experiment.

Activated microglia suppress ER α and ER β expression in H19-7 hippocampal neuron

To investigate the mechanism by which activated microglia cells suppress hippocampal synaptic plasticity, the expression of two ER subtypes, ER α and ER β , were measured by western blot analysis. Significant increase in both ER α and ER β expression was found in

H19-7 hippocampal cells cultured in the normal condition. Moreover, two-fold increase of ER α expression was observed at 2nd d while ER β reach to two-fold at 3rd d of experiment. Time-course experiments of co-culture with activated microglia showed significant decrease in ER α and ER β expression within 2nd and 4th d, respectively. This result suggested that activated microglia cells suppress hippocampal synaptic plasticity via inhibition of ER α and ER β expression.

Discussion

It is increasingly evident that microglial aging is implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders like AD. There are a large number of reports on the aging phenotype of microglia, shared same typical characteristic with an activated microglia. Furthermore, previous evidence has demonstrated aged mice showed increases in microglial activation, NADPH oxidase expression, and ROS production similar with LPS-induced in young mice (Qui et al., 2013). It strongly reported that CD11b and MHC II are typical age-induced-microglial markers (Bilbo, 2010). Our observation was subsequently confirmed by a study the effect of LPS on morphological microglial activation and activation marker expression. Earlier, we showed that LPS induced morphological changes and increase mRNA of activation marker proteins including MHCII, CD11b, and Iba1. Furthermore, we also showed that LPS induces inflammatory response similar to present in aging microglia. LPS increased IL-6 and nitric oxide release and decreased IL-10, indicating that LPS induced inflammation. Similar to previously, LPS upregulated the expression of TLR4, phospho-JNK (pJNK) and phospho-NF- κ B (pNF- κ B), TNF α and IL-1 β , and iNOS in HAPI microglial cells (Shih et al., 2009; Thampithak et al., 2009; Richwine et al., 2008).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund and Higher Education Commission (No. MRG5480211) and Higher Education Commission (No. 44496) to S. Chamniansawat. We also thanks Dr. Narongrit Thongon for a kind technical assistance.

References

- Aisen P.S, Davis K.L., 1994. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: implication therapy. *Am J Psychiatry*. 151, 1105-1113.
- Wong W.T., 2013. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci*. 7, 1-13.
- Miller K.R, Streit W.J., 2007. The effects of aging, injury and disease on microglial function: a case for cellular senescence. *Neuron Glia Biol*. 3, 245-253.
- Frank M.G., Barrientos R.M., Biedenkapp J.C., Rudy J.W., Watkins L.R., Maier S.F., 2006. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging*. 27, 717-722.
- Lee D.H., Ahn J.H., Park J.H., Yan B.C., Cho J.H., Kim I.H., Lee J.C., Jang S.H., Lee M.H., Hwang I.K., Moon S.M., Lee B., Cho J.H., Shin H.C., Kim J.S., Won M.H., 2013. Comparison of expression of inflammatory cytokines in the spinal cord between young adult and aged beagle dogs. *Cell Mol Neurobiol*. (in press)
- Njie E.G., Boelen E., Stassen F.R., Steinbusch H.W., Borchelt D.R., Streit W.J., 2012. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*. 33, 195.e1-195.e12.
- Adams M.M., Morrison J.H., Gore A.C., 2001. N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels change during reproductive senescence in the hippocampus of female rats. *Exp Neurol*. 170, 171-179.
- McEwen B.S., Alves S.E., 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*. 20, 279-307.

- Gorenstein C., Rennó J. Jr, Vieira Filho A.H., Gianfaldoni A., Gonçalves M.A., Halbe H.W., Fernandes C.E., Demétrio F.N., 2011. Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: a randomized trial. *Arch Womens Ment Health*. 14, 367-373.
- Lee S.J., Romeo R.D., Svenningsson P., Campomanes C.R., Allen P.B., Greengard P., McEwen B.S., 2004. Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females. *Neuroscience*. 127, 983-988.
- Adams M.M., Fink S.E., Shah R.A., Janssen W.G., Hayashi S., Milner T.A., McEwen B.S., Morrison J.H., 2002. Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats. *J Neurosci*. 22, 3608-3614.
- Nagura H., Ishikawa Y., Kobayashi K., Takao K., Tanaka T., Nishikawa K., Tamura H., Shiosaka S., Suzuki H., Miyakawa T., Fujiyoshi Y., Doi T., 2012. Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice. *Mol Brain*. 26, 5-43.
- Guadagno J., Xu X., Karajgikar M., Brown A., Cregan S.P., 2013. Microglia-derived TNF α induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. *Cell Death Dis*. 14;4:e538.
- Richwine AF, Parkin AO, Buchanan JB, Chen J, Markham JA, Juraska JM, Johnson RW. Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Nov;33(10):1369-77.
- Thampithak A, Jaisin Y, Meesarapee B, Chongthammakun S, Piyachaturawat P, Govitrapong P, Supavilai P, Sanvarinda Y. Transcriptional regulation of iNOS and COX-2 by a novel compound from *Curcuma comosa* in lipopolysaccharide-induced microglial activation. *Neurosci Lett*. 2009 Sep 22;462(2):171-175.

Shih YT, Hsu YY, Chang FR, Wu YC, Lo YC. 6-Hydroxycleroda-3,13-dien-15,16-olide protects neuronal cells from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through the inhibition of microglia-mediated inflammation. *Planta Med.* 2010 Feb;76(2):120-7.

Bilbo SD. Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline. *Neurobiol Learn Mem.* 2010 Jul;94(1):57-64.

Figure

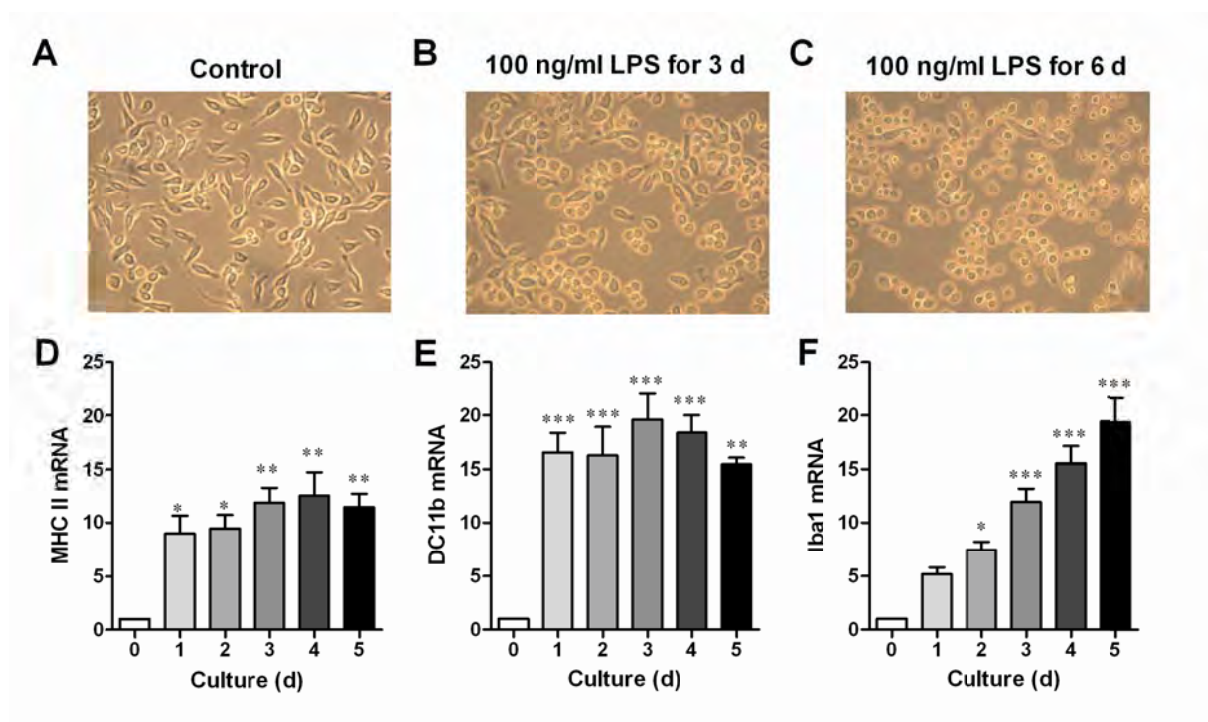


Figure 1

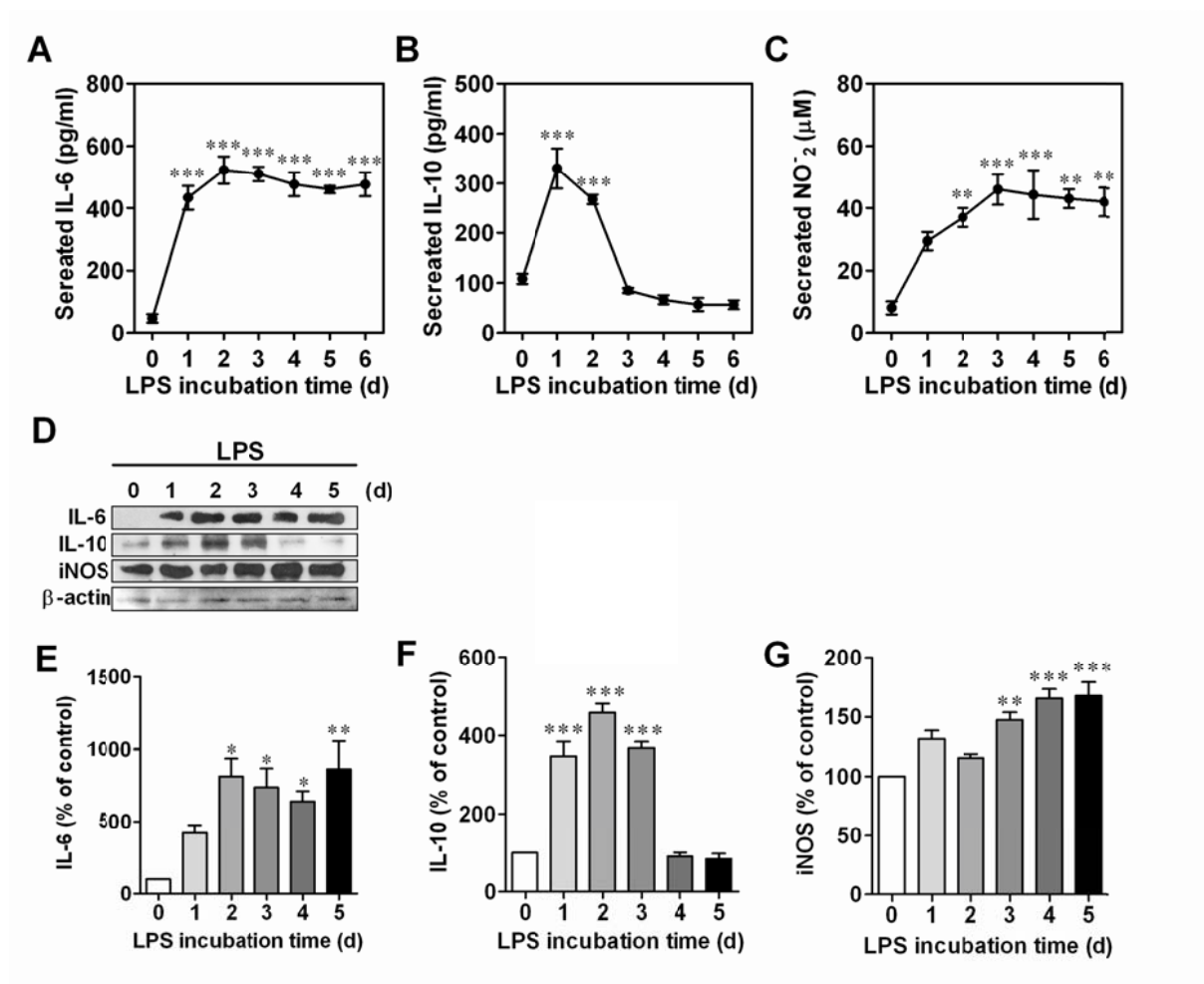


Figure 2

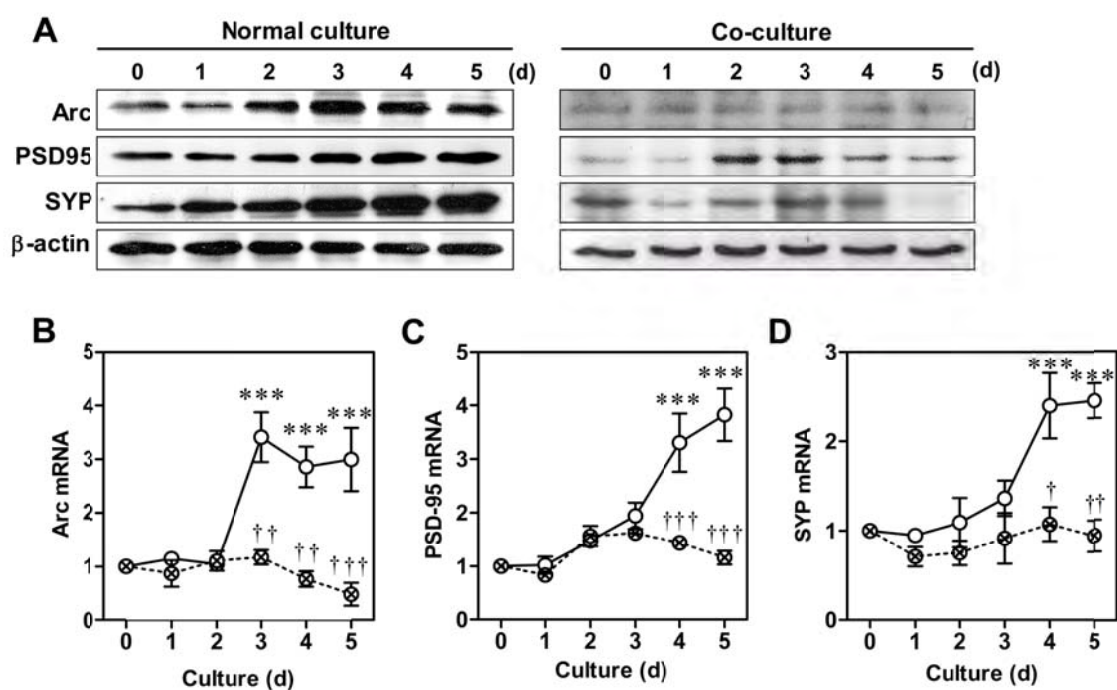


Figure 3

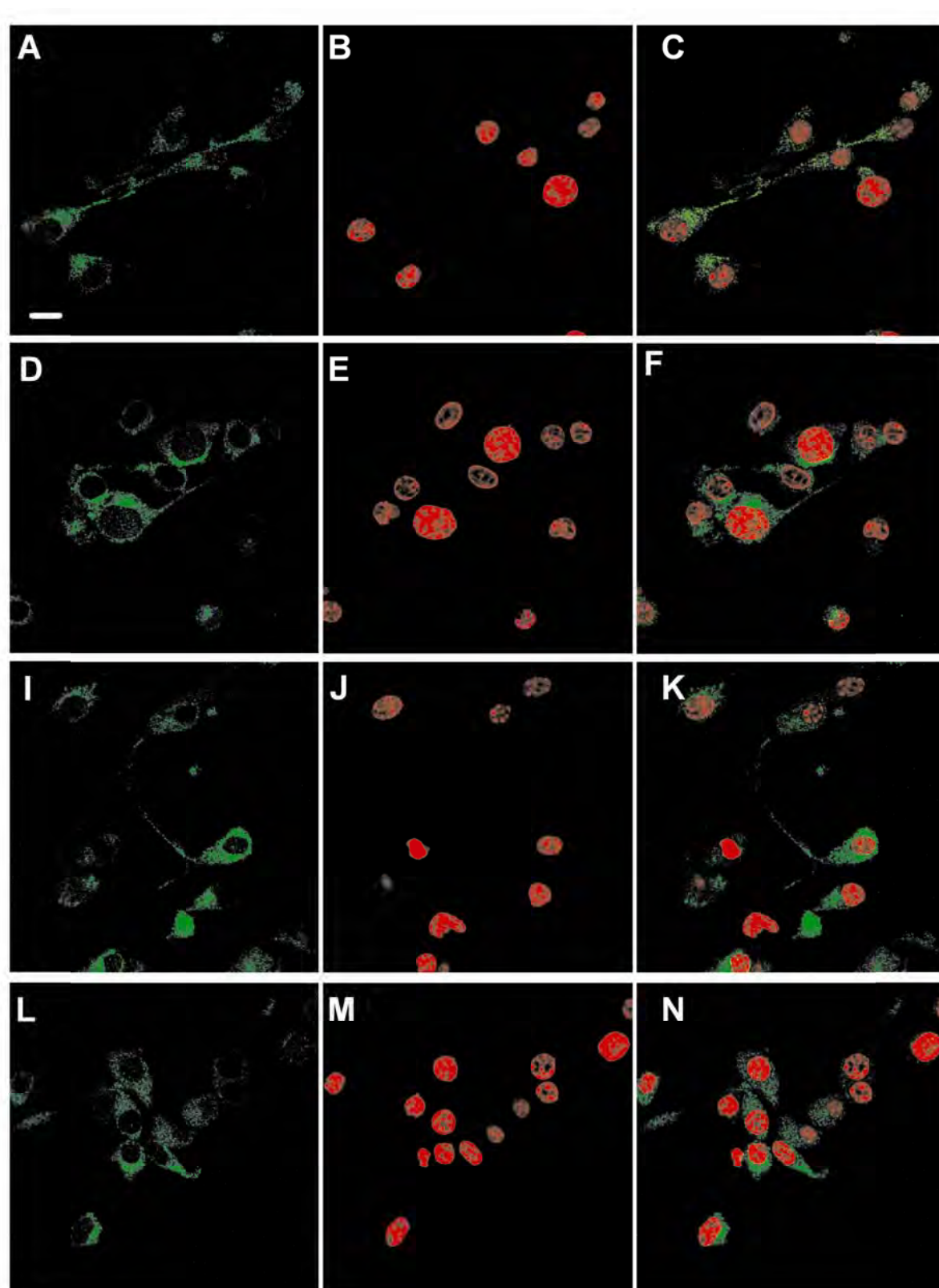


Figure 4

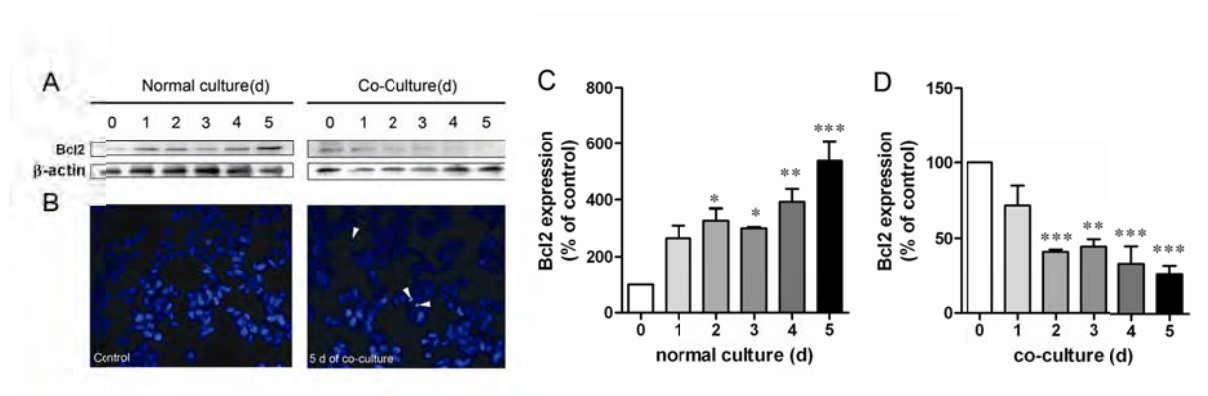


Figure 5

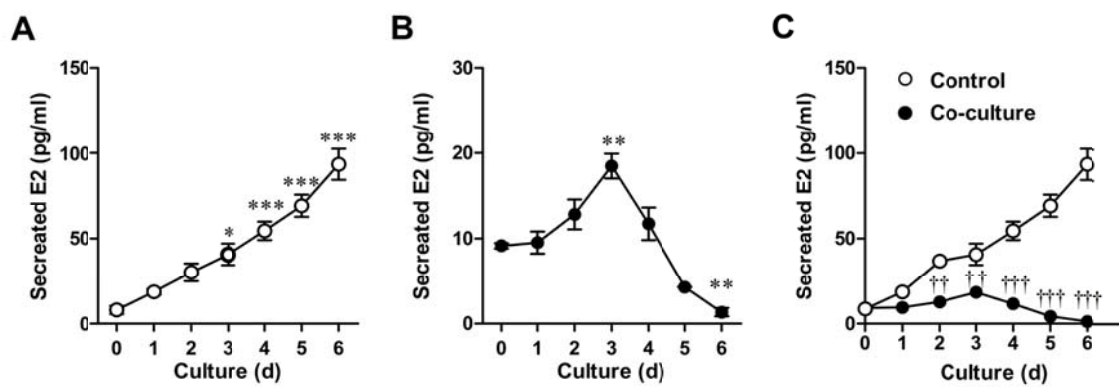


Figure 6

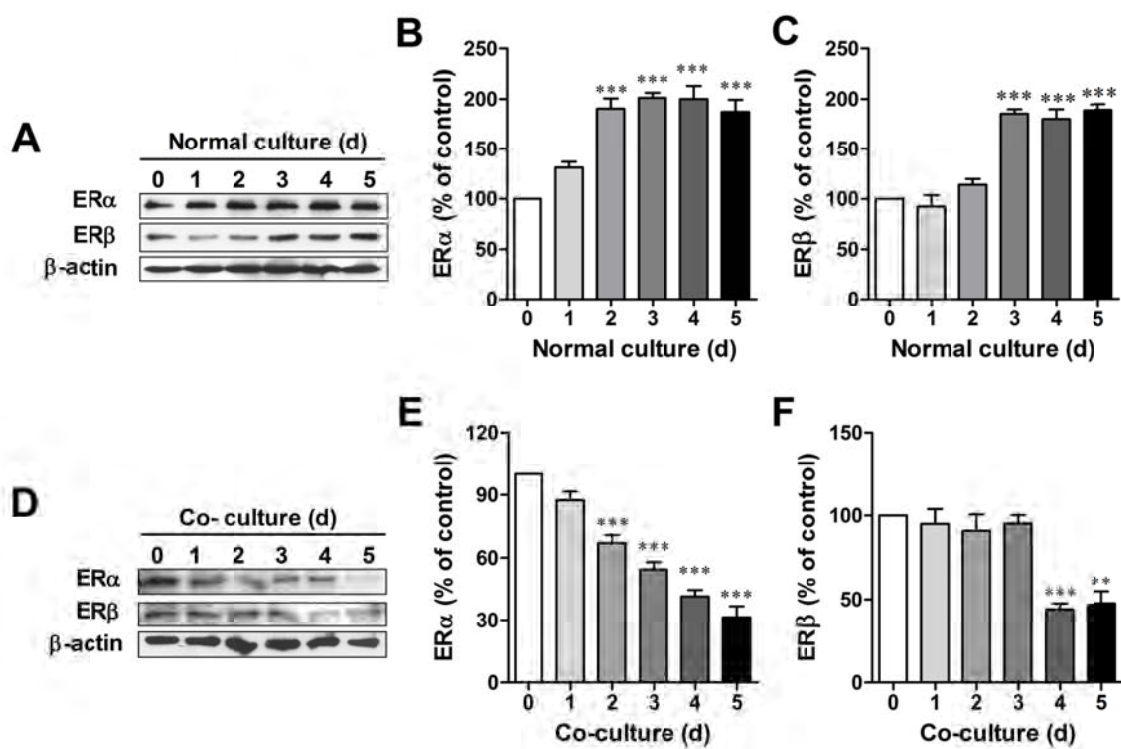


Figure 7