

Abstract 1

Project Code: RMU4980018

Project Title: Role of Metabolic Acidosis on Adipocyte Lipolysis and Metabolism

Investigator: Sinee Disthabanchong, M.D.¹

Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine,
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400,
Thailand

E-mail Address: sineemd@hotmail.com, tesdb@mahidol.ac.th

Project Period: July 2006 – July 2009

Keywords: acidosis, adipocyte, lipolysis, adiponectin, mesenchymal stem cell, stromal cell

Metabolic acidosis adversely affects musculoskeletal and endocrine systems as well as protein and lipid metabolism. Excess energy is stored as triglyceride in adipose tissue. During period of increased metabolic demand, free-fatty acid (FFA) and glycerol are released in response to catecholamine, a process called lipolysis. Catecholamine stimulates lipolysis through cAMP/protein kinase A pathway resulting in phosphorylation of hormone sensitive lipase (HSL) and perilipin (PLIN), which then cleaves triglyceride into FFA and glycerol. In vivo studies in humans and animals demonstrated decreased FFA availability in acute metabolic acidosis. The present study investigates the mechanism underlying the anti-lipolytic effect of metabolic acidosis in vitro. Mature adipocytes in culture were differentiated from human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow. Concentrated HCl was added to lower the medium pH. Basal and isoproterenol-induced lipolysis was determined based on the amount of FFA and glycerol release into the culture medium corrected by protein content. Lowering pH from 7.4 to 6.9 suppressed basal lipolysis by upto 30% and isoproterenol-induced lipolysis by upto 70%. Manipulating cAMP/PKA system was unable to restore lipolysis. The role of serine/threonine protein phosphatase (PP) that dephosphorylates HSL and PLIN was next examined. Tautomycin and okadaic acid, PP1 and PP2A inhibitors were able to overcome the anti-lipolysis suggesting the involvement of HSL and/or PLIN phosphorylation. In conclusion, metabolic acidosis inhibits adipocyte lipolysis through attenuation of phosphorylated HSL and/or PLIN.

Abstract 2

Project Code: RMU4980018

Project Title: Role of Metabolic Acidosis on Adipocyte Lipolysis and Metabolism

Investigator: Sinee Disthabanchong, M.D.¹

Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine,
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400,
Thailand

E-mail Address: sineemd@hotmail.com, tesdb@mahidol.ac.th

Project Period: July 2006 – July 2009

Keywords: acidosis, adipocyte, lipolysis, adiponectin, mesenchymal stem cell, stromal cell

Metabolic acidosis adversely affects protein and lipid metabolism as well as endocrine function. Adipose tissue, a site where excess energy is stored as triglyceride, communicates with the rest of the body through synthesis and release adipokines such as leptin, adiponectin and TNF-alpha. Metabolic acidosis suppresses leptin in animals and cultured adipocytes. Adiponectin is known to enhance insulin sensitivity, improve endothelial function and possess anti-atherogenic and anti-inflammatory properties. Serum adiponectin is negatively correlated with cardiovascular outcome. The present study investigated the effect of metabolic acidosis on adiponectin mRNA expression and protein secretion. Adipocytes were differentiated from human mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow in the presence of PPAR-gamma agonist, dexamethasone and insulin. In order to reduce bicarbonate concentration, concentrated HCl was added to the culture medium lowering bicarbonate concentration from 24 to 12 mmol/L and pH from 7.4 to 6.9. Adiponectin mRNA and protein was determined at 48 and 96 hours by real time RT-PCR and ELISA respectively. Our MSCs were able to differentiate into mature adipocytes demonstrated by the morphological changes and the presence of GPDH enzyme activity. Metabolic acidosis significantly suppressed adiponectin mRNA by 40% ($p < 0.005$) at 96 hours despite the slight increase in triglyceride accumulation. In conclusion, metabolic acidosis inhibits adiponectin gene transcription and protein secretion from adipocytes.

บทคัดย่อ 1

รหัสโครงการ: RMU4980018

ชื่อโครงการ: ผลของภาวะความเป็นกรดต่อการสลายตัวและเมตาบอลิซึมของเซลล์ไขมัน

ชื่อนักวิจัย: ผ.ศ.พ.ญ. สินี ดิษฐบรรจง

หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์พร.รามารบิต

มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address: sineemd@hotmail.com, tesdb@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม 2549 – กรกฎาคม 2552

คำหลัก: ภาวะกรด, เซลล์ไขมัน, การสลายตัวของไขมัน, adiponectin, เซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal

ภาวะกรดในเลือดส่งผลร้ายต่อระบบกล้ามเนื้อ กระดูก ต่อมไร้ท่อ และเมตาบอลิซึมของโปรตีน และ ไขมัน พลังงานส่วนเกินที่ร่างกายได้รับจะถูกเก็บไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ในไขมัน เวลาที่ร่างกายจำเป็นต้องใช้พลังงาน catecholamine จะไปกระตุ้นให้เซลล์ไขมันปลดปล่อย free fatty acid และ glycerol ผ่านกระบวนการที่เรียกว่า lipolysis ซึ่งอาศัยการทำงานของ cAMP/PKA ในการกระตุ้นให้เกิด phosphorylation ของ hormone sensitive lipase (HSL) และ PLIN ทำให้มีการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์ไปเป็น free fatty acid จากการศึกษาในมนุษย์และสัตว์ทดลอง พบว่าระดับของ free fatty acid ในเลือดลดลงในภาวะกรด ดังนั้นเราจึงทำการวิจัยเพื่อศึกษากลไกการยับยั้ง lipolysis in vitro โดยอาศัยเซลล์ไขมันซึ่งถูกกระตุ้นให้เจริญเติบโตมาจากเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal ที่ได้มาจากไขกระดูกในห้องทดลอง การสร้างภาวะกรดให้เกิดขึ้นในสารน้ำที่ใช้เลี้ยงเซลล์นั้นอาศัยการเติมกรด HCl เพื่อลดความเข้มข้นของ HCO_3^- และ pH จาก 7.4 เป็น 6.9 จากนั้นวัด basal และ catecholamine-induced lipolysis จากปริมาณ glycerol ที่หลั่งออกมาในสารน้ำเลี้ยงเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่าภาวะกรดยับยั้ง basal lipolysis 30% และ catecholamine-induced lipolysis 70% การทดสอบ cAMP/PKA pathway พบว่าไม่เกี่ยวข้องกับการลดลงของ lipolysis สมมุติฐานอื่นที่เป็นไปได้ คือ การลดลงของ HSL และ PLIN phosphorylation ดังนั้นเราจึงศึกษาความผิดปกติของ serine/threonine protein phosphatase (PP) ซึ่งมีหน้าที่ในการ dephosphorylation ของ HSL และ PLIN ผลการทดลองพบว่า tautomycin และ okadaic acid ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PP1 และ PP2A สามารถเพิ่ม lipolysis ให้เท่ากับในสภาวะปกติได้ แสดงให้เห็นว่าการลดลงของ HSL และ/หรือ PLIN นั้นมีส่วนร่วมในการยับยั้ง lipolysis ในภาวะกรด สรุปได้ว่าภาวะกรดยับยั้ง lipolysis โดยทำให้มีการลดลงของปริมาณ phosphorylated HSL และ PLIN

บทคัดย่อ 2

รหัสโครงการ: RMU4980018

ชื่อโครงการ: ผลของภาวะความเป็นกรดต่อการสลายตัวและเมตาบอลิซึมของเซลล์ไขมัน

ชื่อนักวิจัย: ผ.ศ.พ.ญ. สินี ดิษฐบรรจง

หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์รพ.รามธิบดี

มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address: sineemd@hotmail.com, tesdb@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม 2549 – กรกฎาคม 2552

คำหลัก: ภาวะกรด, เซลล์ไขมัน, การสลายตัวของไขมัน, adiponectin, เซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal

ภาวะกรดในเลือดส่งผลกระทบต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ เมตาบอลิซึมของไขมัน และโปรตีนไขมันนั้นนอกจากจะเป็นแหล่งสะสมพลังงานส่วนเกินแล้ว ยังผลิตโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น leptin, adiponectin และ TNF-alpha เพื่อควบคุมการทำงานของส่วนต่างๆ ของร่างกาย จากการศึกษาในอดีตพบว่าภาวะกรดสามารถยับยั้งการสร้างและหลั่ง leptin จากเซลล์ไขมัน สำหรับ adiponectin นั้นยังไม่มีใครทำการศึกษา adiponectin มีคุณสมบัติในการเพิ่ม insulin sensitivity ช่วยการทำงานของเซลล์ endothelium ดีขึ้น ป้องกันการเกิด atherosclerosis และ ลด inflammation ระดับของ serum adiponectin แปรผกผันกับ cardiovascular outcome การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลกระทบของภาวะกรดต่อการสร้างและหลั่ง adiponectin จากเซลล์ไขมันที่เจริญเติบโตมาจากเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal ของมนุษย์ (MSCs) ที่ได้จากไขกระดูกในห้องทดลอง การเลี้ยง MSCs ในสารน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบไปด้วย PPAR gamma agonist, dexamethasone และ insulin สามารถทำให้ MSCs เจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ไขมันได้ การสร้างภาวะกรดให้เกิดขึ้นในสารน้ำที่ใช้เลี้ยงเซลล์นั้นอาศัยการเติมกรด HCl เพื่อลดความเข้มข้นของ HCO_3 จาก 24 เป็น 12 และ pH จาก 7.4 เป็น 6.9 จากนั้นวัดระดับ adiponectin mRNA ที่ 48 และ 96 ชั่วโมงโดยวิธี real-time RT PCR และ วัดปริมาณ adiponectin protein โดยวิธี ELISA ผลการศึกษาพบว่า MSCs สามารถเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ไขมันได้เป็นอย่างดี โดยจะเห็นได้จากรูปร่างและปริมาณของ GPDH enzyme ภาวะกรดนั้นทำให้มีการลดลงของ adiponectin mRNA ประมาณ 40% ที่ 96 ชั่วโมง ($P < 0.005$) และ adiponectin protein ที่หลั่งออกมาในสารน้ำเลี้ยงเซลล์ลดลงประมาณ 20% ในขณะที่มีปริมาณของ triglyceride เพิ่มขึ้น สรุปได้ว่าภาวะกรดยับยั้งการสร้าง adiponectin mRNA และ การหลั่ง adiponectin โปรตีนจากเซลล์ไขมัน