

ABSTRACT

Project Code : RMU4980026

Project Title : Role of estrogen and phytoestrogen in regulation of transport properties and mucosal host defense mechanism in endometrial epithelial cells

Investigator : Chatsri Deachapunya and Sutthasinee Poonyachoti

E-mail Address : chatsri@swu.ac.th

Project Period : 19 July 2006 – 20 July 2009

The present study was aimed to examine the effects of phytoestrogens on 1) the ion transport functions and mechanism of acute and long term response, 2) the expression ratio of estrogen receptor subtypes, ER- α and ER- β , and 3) the expression of secretory component (SC) protein, in primary cultured endometrial epithelial cells. The endometrial glands were isolated from immature pig uterus and cultured in the standard medium and then switched to the estrogen-free medium or in the presence of 17 β -estradiol (E_2), genistein or daidzein. Experiments using Ussing apparatus to measure bioelectrical parameters revealed that acute exposure of 17 β -estradiol (10^{-9} - 10^{-7} M) had no effect on I_{sc} whereas genistein (10^{-6} - 10^{-4} M) increased short circuit current (I_{sc}). High concentration of genistein (10^{-4} M) produced a biphasic response in which the I_{sc} rapidly increased followed by a sustained decrease in I_{sc} below the baseline level, corresponding to an initial activation of Cl^- secretion and subsequently K^+ secretion in the apical membrane. Genistein also activated barium-sensitive basolateral K^+ current. Genistein-regulated Cl^- and K^+ channels were partially Ca^{2+} dependence as the genistein-activated I_{sc} was partially blocked by BAPTA-AM (5×10^{-5} M). In contrast, daidzein (10^{-6} - 10^{-4} M) produced a concentration dependent decrease in I_{sc} which was due to an inhibition of apical Cl^- current with no change in basolateral K^+ current. RT-PCR experiment demonstrated the expression of mRNA for the small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (SK)1, SK3 and less SK2 channels. Treatment of monolayers with E_2 (10^{-9} M), genistein (10^{-5} M) or daidzein (10^{-5} M) for 2 days did not affect SK1 mRNA expression whereas only E_2 decreased SK2, and genistein and daidzein increased SK3 mRNA expression. The results indicate that Cl^- and K^+ transport activities are regulated by genistein via an increase in intracellular Ca^{2+} , and the SK3 mRNA expression is subject to long term genistein regulation. Cells grown in estrogen-free media for 7 days significantly reduced the transepithelial resistance to 19% and the potential difference to 39% of the baseline level on day 0. Long-term exposure to E_2 (10^{-9} M), genistein (10^{-6} M) or daidzein (10^{-6} M) for 7 days did not significantly affect these bioelectrical parameters.

Semi-quantitative Western blot analysis showed that the expression of ER- α (53 kD) was 3 fold higher than ER- β (66 kD) with reference to β -actin. Treatment with E_2 , genistein or daidzein at 10^{-9} M and 10^{-4} M for 72 hrs had no significant changes in the normalized ER

expression and the ER β /ER α ratio. The blots also revealed the expression of 100 and 200 kD bands of SC protein in cells grown in serum-containing medium, but less in estrogen-free medium. Treatment with daidzein (10^{-6} M) for 48 hrs increased the intensity of these two proteins while E $_2$ (10^{-9} M) increased only 100 kD band intensity. In contrast, genistein (10^{-6} M) treatment decreased all protein intensities.

Taken together, our findings demonstrated the phytoestrogens genistein and daidzein modulation of the secretory functions and the expression of SC protein in primary porcine cultured endometrial epithelial cells without aberration of ER expression. These findings suggest an important role of phytoestrogens in controlling the intrauterine composition and volume as well as the expression and secretion of proteins involved in mucosal immunity. The impact of the ER- β to ER- α ratio in response to phytoestrogens compared to E $_2$ may provide evidence for clinical application for using phytoestrogens in hormone replacement therapy.

Keywords : 17 β -estradiol, genistein, daidzein, Cl $^-$ secretion, K $^+$ secretion, estrogen receptor, secretory component, endometrial epithelium, SK channel

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU4980026

ชื่อโครงการ : บทบาทของเอสโตรเจนและสารไฟโตเอสโตรเจนในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการขนส่งสารน้ำและอิเล็กโทรไลต์และระบบป้องกันเยื่อเมือกของเซลล์เยื่อบุมดลูก

ชื่อนักวิจัย : จัตุศรี เตชะปัญญา และ สุทธาสินี ปุญญโชติ

E-mail Address : chatsri@swu.ac.th

ระยะเวลาของโครงการ : 19 กรกฎาคม 2549 – 20 กรกฎาคม 2552

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของไฟโตเอสโตรเจนต่อ 1) การขนส่งไอออนและกลไกการออกฤทธิ์แบบเย็บปล้นและระยะยาว 2) การแสดงออกของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา (ER- α) และเบต้า (ER- β) และ 3) การแสดงออกของโปรตีน secretory component (SC) ของเซลล์เยื่อบุมดลูกปฏิกิริยา โดยแยกเซลล์เยื่อบุมดลูกจากปีกมดลูกหมูวัยแรกรุ่นแล้วนำมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ปกติและเปลี่ยนเป็นน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเอสโตรเจนทั้งที่ไม่มีและมีเอสตราไดออล (E_2) เจนีสทีอิน หรือ ไดแอตซินผสมอยู่ การทดลองโดยใช้เครื่องมือ Ussing เพื่อวัดค่าทางไฟฟ้า พบว่า E_2 (10^{-9} - 10^{-7} M) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า short circuit current (Isc) ในขณะที่เจนีสทีอิน (10^{-6} - 10^{-4} M) เพิ่มค่า Isc อย่างไรก็ดีตามการให้เจนีสทีอินความเข้มข้นสูง (10^{-4} M) มีผลเพิ่ม Isc อย่างรวดเร็วตามด้วยการลด Isc อย่างช้าๆ ซึ่งเป็นผลของการกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ตามด้วยการหลั่งไปแทสเซียมทางด้าน apical membrane เจนีสทีอินยังมีผลกระตุ้น barium-sensitive K^+ channel ผ่านทาง basolateral membrane เจนีสทีอินกระตุ้นการหลั่งไอออนโดยผ่านการเพิ่มแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งเห็นได้จากผลของเจนีสทีอินที่ถูกยับยั้งเป็นบางส่วนโดย BAPTA-AM (5×10^{-5} M) ในทางตรงข้ามไดแอตซินยับยั้งการหลั่งคลอไรด์ทางด้าน apical โดยไม่มีผลต่อ basolateral membrane ผล RT-PCR พบการแสดงออกของ small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (SK)1, SK3 และ SK2 channel mRNA การให้เอสโตรเจน เจนีสทีอิน หรือ ไดแอตซินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ SK1 mRNA ในขณะที่ E_2 ลดการแสดงออกของ SK2 และ เจนีสทีอิน หรือ ไดแอตซินเพิ่มการแสดงออกของ SK3 mRNA โดยไม่เปลี่ยนแปลง GAPDH mRNA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเจนีสทีอินอาจควบคุมการขนส่งคลอไรด์และไปแทสเซียมโดยผ่านทาง การเพิ่มแคลเซียมภายในเซลล์และการแสดงออกของ SK3 channel การศึกษาผลระยะยาวโดยเปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเอสโตรเจนเป็นเวลา 7 วันพบค่าความต้านทานลดลงเหลือ 19% และความต่างศักย์ลดลงเหลือ 39% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความคุมที่ day 0 การให้ E_2 (10^{-9} M) เจนีสทีอิน หรือ ไดแอตซิน (10^{-6} M) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วันไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าทางไฟฟ้าดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาด้วยเทคนิค semi-quantitative Western blot พบเซลล์เยื่อบุมดลูกมีการแสดงออกของโปรตีน ER- α (53 kD) มากกว่า ER- β (66 kD) 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนเบต้าแอคติน ผลการแสดงออกของโปรตีน ER- α , ER- β และอัตราส่วน ER- β /ER- α ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อให้เอสโตรเจน เจนีสทีอิน หรือ ไดแอตซินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของโปรตีน secretory component proteins ขนาด 100 kD และ 200 kD ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ปกติและลดลงอย่างมากในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเอสโตรเจน การให้ไดแอตซินในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเอสโตรเจนเป็น

เวลา 48 ชั่วโมง มีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่เอสโตรเจนเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน 100 kD ส่วนเจนิสทีอินลดการแสดงออกของโปรตีน

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารไฟโตเอสโตรเจนควบคุมการขนส่งไอออนในเซลล์เยื่อบุมดลูกและการแสดงออกของ SC ซึ่งแสดงให้เห็นความสำคัญของสารไฟโตเอสโตรเจนต่อการควบคุมส่วนประกอบและปริมาณของของเหลวในโพรงมดลูกตลอดจนการหลั่งสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ mucosal immunity อีกด้วย นอกจากนี้การที่สารไฟโตเอสโตรเจนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนยังเป็นหลักฐานที่สามารถนำสารไฟโตเอสโตรเจนไปประยุกต์ใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน

คำหลัก ไฟโตเอสโตรเจน, เจนิสทีอิน, ไดแอตซิน, การหลั่งคลอไรด์, การขนส่งโปแตสเซียม, ตัวรับเอสโตรเจน, เซลล์เยื่อบุมดลูก, 17β -estradiol, genistein, daidzein, secretory component, endometrial epithelium, SK channel