



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทในการต้านอนุมูลอิสระของเมลาโทนินและผลของเมลาโทนินในการ
ป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

**The antioxidative role of melatonin: The protective
effects of melatonin
in the process of neurodegeneration.**

โดย รองศาสตราจารย์บัณฑิต เจตน์สว่าง

สิงหาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทในการต้านอนุมูลอิสระของเมลาโท닌และผลของเมลาโท닌ในการ
ป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

The antioxidative role of melatonin: The protective
effects of melatonin
in the process of neurodegeneration.

ผู้วิจัยสังกัด

โครงการวิจัยชีววิทยาระบบประสาทและพฤติกรรม
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ. นครปฐม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

อาจจะเป็นเพราะความบังเอิญบวกกับความสนใจส่วนตัวที่สนใจงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการทำให้เซลล์ประสาทเกิดการตายและเสื่อมสลาย การเข้ามาทำวิจัยในด้านนี้เริ่มต้นมาจากตอนทำวิจัยของวิทยานิพนธ์ปริญญาโทซึ่งในตอนนั้นท่านอาจารย์ที่ปรึกษาที่มีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการใช้เซลล์จากต่อมหมวกไตชั้นในมาเป็นต้นแบบของการศึกษาสาเหตุและวิธีป้องกันการเกิดโรคพาร์กินสัน แต่ตอนทำวิจัยของวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาเอกก็ได้เปลี่ยนแนวไปศึกษากลไกในระดับชีวโมเลกุลของการควบคุมการสร้างฮอร์โมนเมลาโท닌ในต่อมไพเนียล ซึ่งก็ไม่ได้คาดคิดมาก่อนว่าจะได้นำความรู้และเทคนิคการทำวิจัยต่างๆเหล่านี้มาใช้ร่วมกันให้เกิดประโยชน์ตอนทำวิจัยหลังปริญญาเอกที่ได้สนใจศึกษาวิจัยถึงปัจจัยหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดการตายและเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยอนุมูลอิสระ ประกอบกับในช่วงเวลานั้นเริ่มมีรายงานผลการวิจัยถึงผลของเมลาโท닌ในการเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระออกมา ทำให้เกิดความคิดและสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยอนุมูลอิสระในเชิงที่เกี่ยวข้องกับ **death signaling pathway** รวมทั้งผลของเมลาโท닌ในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นและด้วยความอนุเคราะห์ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้เห็นความสำคัญของงานวิจัยพื้นฐานด้านประสาทวิทยาศาสตร์จึงได้มอบทุนสนับสนุนการวิจัย (ทุนเมธีวิจัย) ให้กับโครงการวิจัยนี้ การทำวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดีแม้จะมีปัญหาและอุปสรรคบ้างแต่ก็ผ่านพ้นไปได้เนื่องจากได้รับความเมตตาจากหัวหน้าหน่วยงานที่โครงการวิจัยชีววิทยาระบบประสาทและพฤติกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้อิสระในการจัดสรรเวลาในการทำงานประจำและทำวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากหัวหน้าหน่วยวิจัยประสาทวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุญาตให้ใช้พื้นที่ห้องวิจัยและเครื่องมือในการทำวิจัยรวมทั้งได้รับความร่วมมือร่วมใจและการตั้งใจทำงานเป็นอย่างดีจากผู้ร่วมวิจัยทั้งในระดับอาจารย์ นักวิจัยและนักศึกษา ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ได้ผลงานวิจัยและผลงานตามเป้าหมายที่ตั้งไว้และคาดหวังว่าผลงานวิจัยที่ได้รับในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในเชิงวิชาการในสาขาประสาทวิทยาศาสตร์และสาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป ในนามหัวหน้าโครงการวิจัยนี้จึงขอขอบคุณทุกหน่วยงานและทุกๆท่านที่กล่าวมาข้างต้นเป็นอย่างยิ่ง

รองศาสตราจารย์บัณฑิต เจตน์สว่าง
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA4780018

ชื่อโครงการ: บทบาทในการต้านอนุมูลอิสระของเมลานินและผลของเมลานินในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

ชื่อนักวิจัยและสถานที่ทำงาน: รองศาสตราจารย์บัณฑิต เจตน์สว่าง

โครงการวิจัยชีววิทยาระบบประสาทและพฤติกรรม สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ. นครปฐม 73170

E-mail Address: grbcs@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (31 สิงหาคม 2547 - 30 สิงหาคม 2550)

การศึกษานี้ต้องการที่จะศึกษาหาสาเหตุและกลไกในระดับเซลล์และโมเลกุลที่อนุมูลอิสระก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทและเส้นเลือดสมอง รวมทั้งผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเมลานินในการป้องกันการเสื่อมสลายนดังกล่าว ผลจากการทดลองพบว่า hydrogen peroxide สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนชนิด SH-SY5Y มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ NF-kB phosphorylation (pNF-kB) อย่างมีนัยสำคัญและเหนี่ยวนำให้มีการ translocation ของ pNF-kB จาก cytoplasm เข้าไปที่บริเวณรอบๆนิวเคลียสและในนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีกด้วยโดยผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยเมลานิน นอกจากนี้ hydrogen peroxide ยังมีผลในการเพิ่มปริมาณของโปรตีน Bax และ Bcl-2 โดยเซลล์ที่ได้รับ hydrogen peroxide อย่างเดียวมีอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์สูงการเพิ่มขึ้นของ Bax จะมากกว่า Bcl-2 แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์ที่ได้รับ hydrogen peroxide และเมลานินด้วยเซลล์มีอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ลดลงมีการลดลงของปริมาณของ Bax แต่ยังคงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Bcl-2 และในการศึกษานี้ก็ได้ทำการทดสอบและพบว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของ caspase enzyme สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดย hydrogen peroxide ได้ เมื่อทำการศึกษาผลของสารพิษ MPP⁺ พบว่า MPP⁺ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนชนิด SK-N-SH ได้และยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ c-Jun phosphorylation เพิ่มการทำงานของ caspase enzyme และมีการย่อยสลาย DNA fragmentation 45 เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย ซึ่งผลดังกล่าวข้างต้นของ MPP⁺ สามารถยับยั้งได้ด้วยเมลานิน เมื่อทำการศึกษาผลของเมลานินในการป้องกันการเสื่อมสลายของเส้นเลือดสมองจากสภาวะ oxidative stress พบว่าเมลานินสามารถลดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase และลดการเพิ่มขึ้นของ calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation ในเส้นเลือดสมองวัวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ oxidative stress จาก hydrogen peroxide ผลจากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการเป็นสารป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทและเส้นเลือดสมองจากสภาวะ oxidative stress ของเมลานินซึ่งสภาวะดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้มีการกระตุ้นการทำงานของ NF-kB, c-Jun-N-terminal kinases, CaMKII และ caspase-

dependent signaling ข้อมูลและความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเมลานินกับสภาวะ oxidative stress และการตายของเซลล์ประสาทได้ต่อไปในอนาคต

คำหลัก: เมลานิน, hydrogen peroxide, MPP^+ , เซลล์ประสาท, เส้นเลือดสมอง

Abstract

Project Code: RSA4780018

Project Title: The antioxidative role of melatonin: The protective effects of melatonin in the process of neurodegeneration

Investigator: Associate Professor Banthit Chetsawang
Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170

E-mail Address: grbcs@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (31 August 2004 - 30 August 2007)

Neurodegenerative diseases are illnesses associated with high morbidity and mortality with few, or no effective, options available for their treatment. The direct cause of neuronal cell loss has not been clearly understood. In addition, the neuroprotective effect of melatonin has been observed both in vivo and in vitro. The objective of this research, therefore, was to better understand the cellular mechanisms of neuronal cell degeneration induced via oxidative stress and neurotoxin. Taken together, the protective roles of melatonin on this cell death have also been studied. In the present study, the effect of melatonin on hydrogen peroxide (H_2O_2) and 1-methyl, 4-phenyl, pyridinium ion (MPP^+) induced neuronal cell degeneration in human dopaminergic neuroblastoma cultured cells were investigated. The results showed that H_2O_2 significantly decreased cell viability and melatonin reversed the toxic effects of H_2O_2 . An inhibition of caspase enzyme activity by Ac-DEVD-CHO, a caspase-3 inhibitor, significantly increased cell viability in H_2O_2 -treated cells. The phosphorylation of transcription factors, nuclear factor kappa B (NF- κ B) was increased in H_2O_2 -treated cells and this effect was abolished by melatonin. Translocation of phosphorylated NF- κ B to perinuclear and nuclear sites, estimated using immunofluorescence, occurred to a greater extent in H_2O_2 -treated cells than in untreated control cells and again this effect was abolished by melatonin. In addition, induction of Bcl-2 and Bax proteins was demonstrated in SH-SY5Y cultured cells treated with H_2O_2 , whereas the induction of Bax but not Bcl-2 was diminished by melatonin. Accordingly, MPP^+ significantly decreased cell viability. By contrast, an induction of phosphorylation of c-Jun, activation of caspase-3 enzyme activity, cleavage of DNA fragmentation factors 45 and DNA fragmentation were observed in MPP^+ -treated SK-N-SH cultured cells. In order to elaborate the functional significance of

melatonin in cerebral blood vessels, H₂O₂-induced induction in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein level and phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) were demonstrated in the bovine isolated cerebral arteries with these effect being abolished by melatonin. These results demonstrate the cellular mechanisms of neuronal degeneration induced via NF- κ B, c-Jun-N-terminal kinases, CaMKII and caspase-dependent signaling, and the potential role of melatonin on protection of neuronal cell death induced by oxidative stress and neurotoxin. Furthermore, the regulatory role of melatonin in physiology of the cerebral vessels was also demonstrated. In light of these finding, it is possible that the neuroprotective effect of melatonin, may offer a means of treating neuronal degeneration and disease.

Keywords: Melatonin, Hydrogen peroxide, MPP⁺, Neuronal cells and Cerebral blood vessels

บทนำ

การเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในสมองนั้นสามารถก่อให้เกิดโรคหรือกลุ่มอาการของโรคทางระบบประสาทได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคทางระบบประสาทชนิดที่มีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท (Neurodegeneration) เช่นโรค Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) และ Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Evans et al 1989, Tanner and Langston 1990) เป็นต้น นอกจากนั้นการได้รับสารเคมีบางอย่างเป็นเวลานานๆ หรือได้รับในปริมาณที่สูง เช่น สารเสพติดพวก Alcohol (Zharkovsky et al 2003) และ Metamphetamine (Davidson et al 2001) ก็พบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในสมองได้

ได้มีการศึกษาถึงสาเหตุหรือปัจจัยตลอดจนกลไก (Mechanism) ที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท และพอจะสรุปได้ว่าการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอาจจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆ เหล่านี้คือ 1). สารเคมีบางอย่างได้แก่ เหล็ก (iron) (Thompson et al 2001, Dal-Pizzol et al 2001), มังกานีส (manganese) (Robb-Gaspers and Connor 1997), สารเสพติด (Davidson et al 2001) และสารจำพวก Neurotoxin ได้แก่ 1-methyl-4-phenyl, 1-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) และ 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Choi et al 1999, Vaudano et al 2001) 2). การได้รับแรงกระแทกที่สมอง (Brain Trauma) (Sahuquillo et al 2001) 3). ภาวะสมองขาดเลือด (Cerebral ischemia) (Reiter et al 2003) 4). ความผิดปกติของยีนบางชนิด เช่น Parkin gene, α -synuclein gene (Xu et al 2002) และที่สำคัญคือ 5). Oxidative stress ซึ่งก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยสารเคมีในกลุ่มที่เรียกว่าอนุมูลอิสระ “Free radicals” (Droge 2002)

อนุมูลอิสระนั้นพบได้มากในอวัยวะที่มีการใช้พลังงานในปริมาณสูง เช่น ไต หัวใจ และสมอง ในสภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีขบวนการกำจัดอนุมูลอิสระออกไปจากเซลล์และอวัยวะต่างๆ เหล่านี้ เพื่อไม่ให้มีการสะสมของอนุมูลอิสระ ซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ และก่อให้เกิดการเสื่อมสลายหรือตายได้ แต่ในบางสภาวะเช่น ร่างกายเกิดความเครียด หรือภาวะที่มีการติดเชื้อ เช่น ติดเชื้อจากไวรัส HIV (Shor-Posner et al 2002, Hulgán et al 2003) จะเกิดการขาดภาวะสมดุลย์ของร่างกายและเหนี่ยวนำให้กระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระเสียไป ก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ (Droge 2002)

ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงสาเหตุที่แท้จริงของการเสื่อมสลายของเซลล์รวมทั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดการบกพร่องของขบวนการกำจัดอนุมูลอิสระ แต่ก็ได้มีการมีความพยายามค้นคว้า

ทดลองหาหาหรือสารเคมีที่จะช่วยลดการสร้างหรือเพิ่มการกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อลดการสะสมของอนุมูลอิสระออกไปจากเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ประสาทในสมอง เนื่องจากระบบประสาทโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมองเป็นอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายระบบปิดที่มี Blood Brain Barrier คอยควบคุมการผ่านเข้าออกของยาและสารต่างๆสู่สมอง ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะได้ศึกษาหาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants หรือ free radical scarvenger) และมีคุณสมบัติที่สามารถผ่านเข้าไปในสมองได้และที่สำคัญคือไม่มีพิษหรืออันตรายต่อสมองมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระแก่เซลล์ประสาท (Reiter et al 2002)

เมลาโทนิเป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจากต่อมไร้ท่อที่มีชื่อว่า ต่อมไพเนียล (Pineal gland) ซึ่งเป็นต่อมที่ขึ้นมาจากสมองส่วน epithalamus โดยทั่วไปแล้วเมลาโทนิจะมีหน้าที่ในการควบคุมระบบการทำงานของร่างกายต่างๆ เช่น ระบบสืบพันธุ์ การนอนหลับ ความชราภาพ ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Simonneaux and Ribelayga 2003) แต่จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ทำให้ทราบว่าเมลาโทนิมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม คือสามารถที่จะจับตัวกับสารพิษได้โดยตรงหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในขบวนการกำจัดอนุมูลอิสระ (Shaikh et al 1997, Shida et al 1994, Tan et al 1998, Tan et al 2001, Tan et al 2003) รวมทั้งมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์ในการรักษาของยาหลายชนิด เช่น ยาในกลุ่ม Antibiotics หรือ Chemotherapeutic agents (Reiter et al 2002, Antolin et al. 2002) จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะได้มีการศึกษาถึงผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเมลาโทนิโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลที่มีต่อเซลล์ประสาท รวมทั้งจะได้ทำการวิจัยศึกษาถึงกลไกภายในเซลล์ที่ทำให้อนุมูลอิสระหรือ neurotoxin เหนี่ยวนำให้เกิดการตายหรือเสื่อมสลายต่อเซลล์ประสาท รวมทั้งการค้นคว้าวิจัยในอันที่จะได้มาซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น อันจะเป็นแนวทางในการป้องกัน วินิจฉัย หรือรักษาโรคทางระบบประสาทต่อไปในอนาคต ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการที่จะศึกษาหาสาเหตุและกลไกในระดับเซลล์และโมเลกุลที่อนุมูลอิสระก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทรวมทั้งผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเมลาโทนิในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

วิธีการทดลอง

การศึกษาอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยอนุมูลอิสระ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y หรือ SK-N-SH ซึ่งเป็น dopaminergic cell line ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นทำการกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress โดยใส่ H₂O₂ หรือ MPP⁺ ในความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ในเซลล์บางกลุ่มจะไม่ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่ม

ควบคุม (Control group) หลังจากนั้นทำการวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay โดยใช้สารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ออกมาจากตู้บ่ม เติมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป แล้วเติมสารละลายส่วนผสมของ isopropanol และ HCl ลงไปเพื่อทำละลาย dark blue formazan crystal แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 560 nm. นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบระหว่างอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์กับปริมาณความเข้มข้นของ H_2O_2 หรือ MPP^+ ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของอนุมูลอิสระกับอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

การศึกษา Caspase enzyme กับกลไกในการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

ทำการยับยั้ง Activity ของ caspase-3 enzyme ซึ่งเป็น Cysteine-dependent aspartate direct protease enzyme ใน common pathway ของการเสื่อมสลายของเซลล์โดยใช้ Ac-DEVD-CHO ซึ่งเป็น cell permeable และ irreversible inhibition ของ caspase-3 แล้วทำการวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 และ 95% air หลังจากนั้นทำการกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress โดยใช้ H_2O_2 ลงไปในเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ในเซลล์บางกลุ่มจะใส่ Ac- DEVD-CHO ร่วมกับ H_2O_2 หรือใส่เฉพาะ Ac-DEVD-CHO ลงไป เซลล์บางกลุ่มจะไม่ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม ทิ้งเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมงก่อนจะนำมาวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยวิธี MTT assay

การศึกษายบทบาทของ Dopamine uptake site กับขบวนการเกิด Oxidative stress ในเซลล์ ประสาท

เพื่อศึกษาว่า Oxidative stress ที่เกิดจากอนุมูลอิสระนั้นผ่านมาทาง uptake site บนเซลล์ประสาทหรือไม่ โดยใช้ desipramine ซึ่งเป็น monoamine uptake blocker แล้วทำการวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 และ 95% air หลังจากนั้นทำการกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress โดยใช้ H_2O_2 ลงไปในเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ในเซลล์บางกลุ่มจะใส่ desipramine ร่วมกับ H_2O_2 หรือใส่เฉพาะ desipramine ลงไป เซลล์บางกลุ่มจะไม่ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม ทิ้งเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยวิธี MTT assay

การศึกษาผลของอนุมูลอิสระกับการ **translocation** ของ **pro-apoptotic gene transcription factors**.

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture slide ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่ H₂O₂ ลงไปเพื่อกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress ในเซลล์บางกลุ่มจะไม่ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม (Control group) ทิ้งเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาทำ immunocytochemical staining ของ Nuclear factor-kappa B (NF-κB) โดยทำการ fix cell ด้วย 4% paraformaldehyde แล้วล้างออกด้วย PBS หลังจากนั้นนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อลด endogenous peroxidase จากนั้นนำเซลล์มา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS + 1% BSA + 0.3% Triton X-100) เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อลด non-specific binding แล้วจึงนำชิ้นเนื้อมา incubate กับ specific rabbit anti-NF-κB p65 antiserum ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (12 ชั่วโมง) เพื่อให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ anti-NF-κB antibody จากนั้นนำเซลล์ที่ทำปฏิกิริยาขึ้นต้นแล้วมาล้างด้วย PBS-B (PBS + 0.25% BSA + 0.1% Triton X-100) 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยาขั้นที่สองกับ FITC-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG ใน PBS-B เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย PBS นำเซลล์ไปปิดด้วย cove slip นำ slide ที่ได้มาดูโดยใช้ confocal laser scanning microscopy เซลล์ที่มี NF-κB positive immunostaining จะเรืองแสงสีเขียวเมื่อสังเกตเซลล์ภายใต้กล้อง

การศึกษาผลของเมลานินในการยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยอนุมูลอิสระ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y หรือ SK-N-SH ซึ่งเป็น dopaminergic cell line ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่ H₂O₂ หรือ MPP⁺ ลงไปเพื่อกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress ในเซลล์บางกลุ่มจะใส่สารละลายเมลานินลงไป 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress และเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม (Control group) ทิ้งเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่เกิด oxidative stress และได้รับเมลานินกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเมลานิน

การศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเพิ่มขึ้นของ **caspase enzyme activity** โดยเมลานิน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SK-N-SH ซึ่งเป็น dopaminergic cell line ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน multiwell plate (96 wells plate) ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่ MPP⁺ ลงไปเพื่อกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress ในเซลล์บางกลุ่มจะใส่สารละลายเมลานินลงไป 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress และเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุมทั้งเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดส่วนที่เป็นน้ำทิ้งไปแล้วใส่ Lysis buffer 1 ลงไป หลังจากนั้นใส่สารละลาย substrate ลงไปทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะใส่ lysis buffer 2 ลงไป นำ plate วางบนน้ำแข็งแล้วนำไปวัดค่า O.D. โดยเครื่อง Fluoro Counter ซึ่งผลการทดลองจะทำให้ทราบว่า caspase enzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cystein protease enzyme และถูกกระตุ้นได้ด้วยอนุมูลอิสระนั้นสามารถยับยั้งได้ด้วยเมลานินหรือไม่

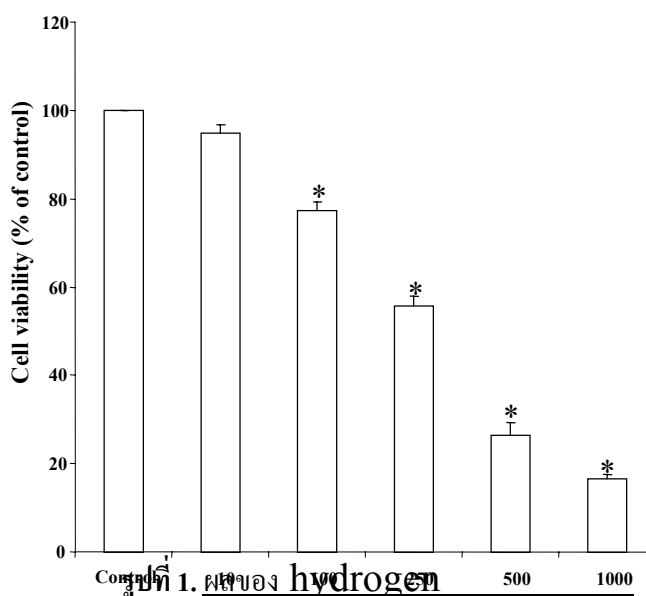
การศึกษาผลของเมลานินต่อสภาวะ **oxidative stress** ที่มีต่อโปรตีนต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y หรือ SK-N-SH ซึ่งเป็น dopaminergic cell line และเส้นเลือดสมองของวัวในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่ H₂O₂ หรือ MPP⁺ ลงไปเพื่อกระตุ้นให้เซลล์และเส้นเลือดสมองของวัวอยู่ในสภาวะ Oxidative stress ในเซลล์หรือเส้นเลือดบางกลุ่มจะใส่สารละลายเมลานินลงไป 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress และเซลล์หรือเส้นเลือดที่ไม่ได้ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุมทั้งเซลล์หรือเส้นเลือดไว้ 24 ชั่วโมง ทำการ harvested cell โดยใส่ SDS sample buffer ลงไปแล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Sonicator แล้วปั่นแยกที่ 14,000 rpm นาน 10 นาที เก็บแยกเฉพาะส่วน supernatant ไว้เพื่อนำไปแยกหาแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis หลังจากนั้น Transfer แถบโปรตีนลงบน Nitrocellulose membrane แล้วนำไป incubate กับ primary antibody ที่ against ต่อโปรตีนต่างๆที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน (12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำมา incubate กับ HRP-conjugated secondary antibody นาน 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยากับ ECL plus reagent แล้วนำไปตรวจสอบหาการเรืองแสงของแถบโปรตีนที่เฉพาะเจาะจงต่อโปรตีนนั้นๆ โดยนำแผ่น Nitrocellulose ไปประกบกับแผ่น Film หลังจากนั้นนำแผ่น Film ไปวัดค่าความเข้มของแถบโปรตีนโดยใช้เครื่อง Densitometer เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนต่างๆ ระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับเมลานิน

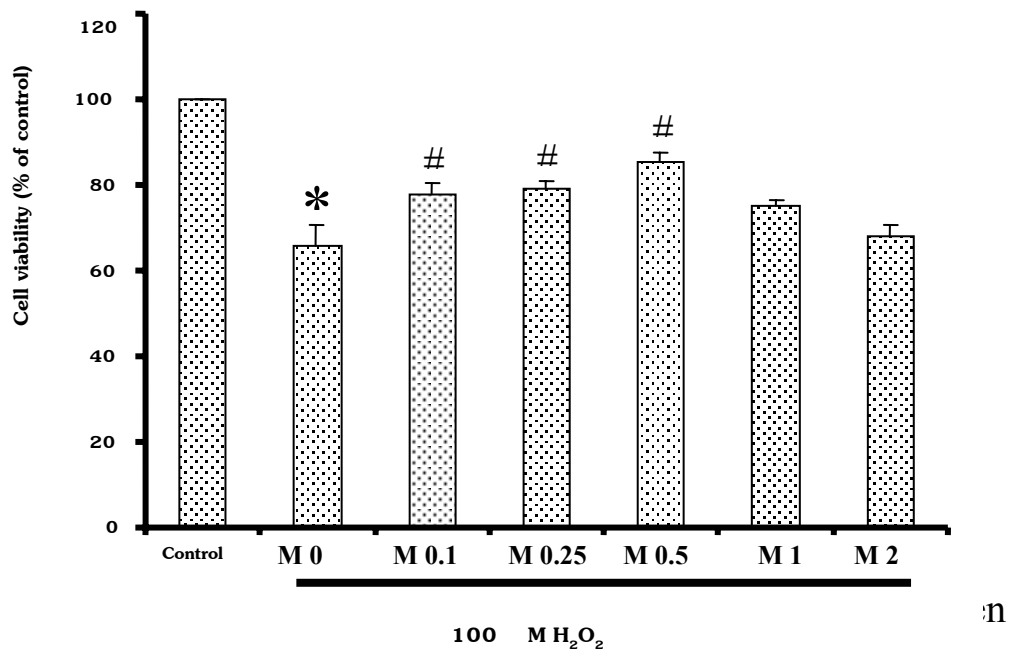
ผลการทดลอง

ผลของ **hydrogen peroxide** ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม **(Reactive oxygen species) ROS** และเมลานินที่มีต่ออัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

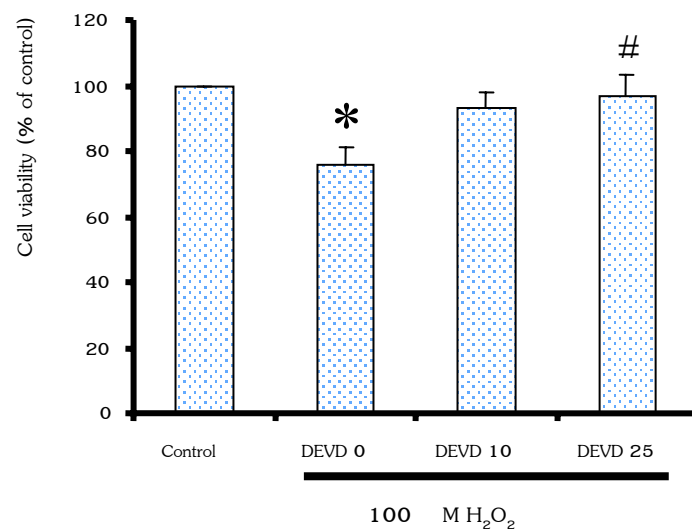
เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโคปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 μM นาน 24 ชั่วโมงมีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ hydrogen peroxide (รูปที่ 1) และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโคปามีน SH-SY5Y ได้รับเมลานินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่าเมลานินที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01-0.5 mM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก hydrogen peroxide ได้โดยผลในการลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ได้ผลสูงสุดที่ 0.5 mM และผลในการลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยเมลานินจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเมลานินมากกว่า 1.0 mM ขึ้นไป (รูปที่ 2)



รูปที่ 1. ผลของ hydrogen peroxide ที่มีต่ออัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท



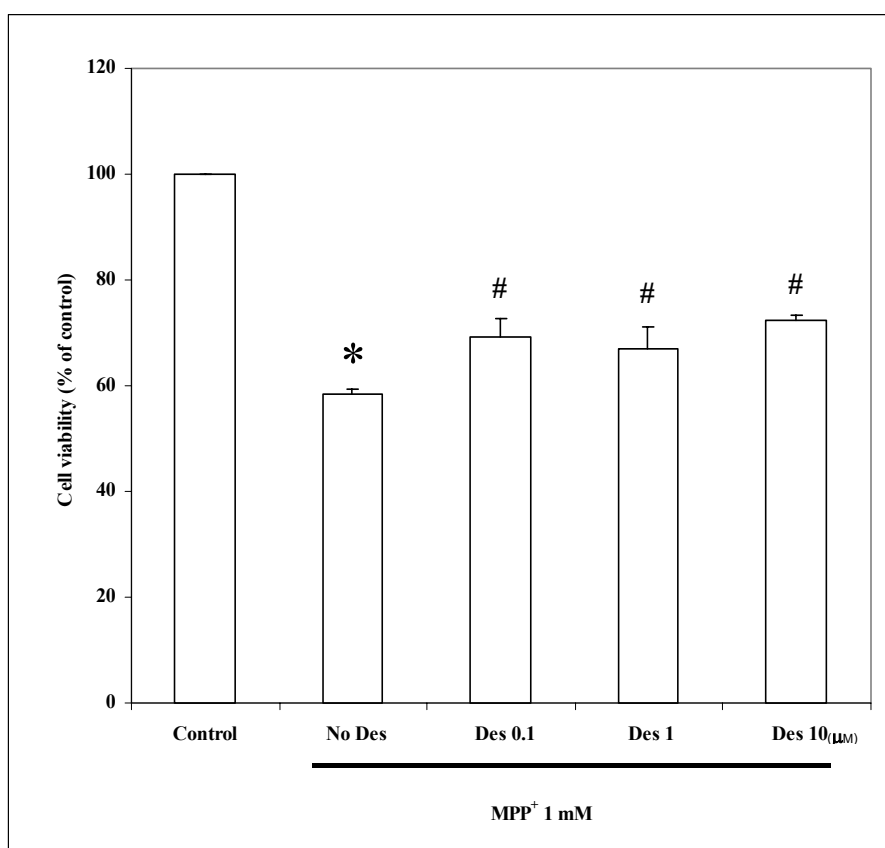
* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม Hydrogen
 ผลของ **caspase enzyme inhibitor** ที่มีต่ออัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท
 เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ caspase enzyme inhibitor (DEVD) ที่ความเข้มข้น 10.0 และ 25.0 μM นาน 8 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมง พบว่า caspase enzyme inhibitor ที่ความเข้มข้น 25 μM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก hydrogen peroxide ได้ (รูปที่ 3)



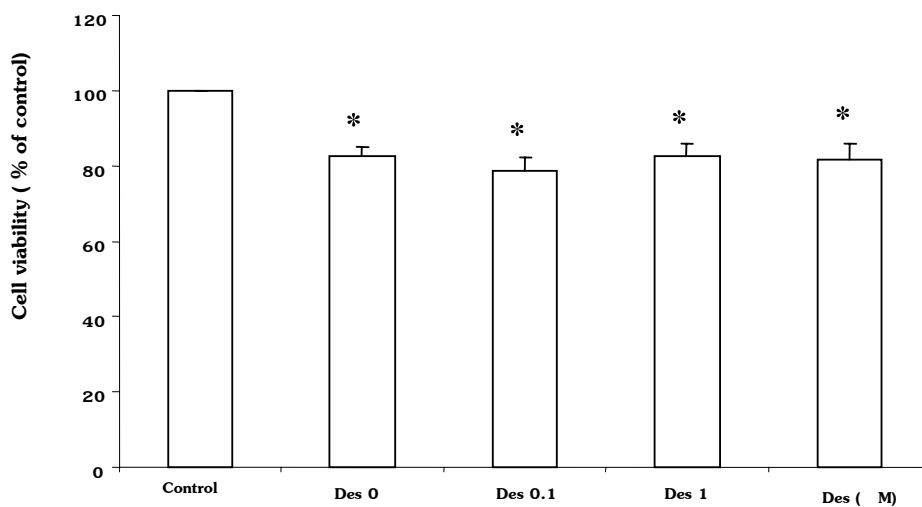
รูปที่ 3.
 ผลของ DEVD
 ของเซลล์ประสาท

อัตราการเสื่อมสลาย
 ของเซลล์ประสาท

เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ monoamine uptake blocker ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10.0 μM นาน 15 นาทีก่อนที่จะได้รับ MPP^+ ที่ความเข้มข้น 1 mM นานต่อไปอีก 72 ชั่วโมง พบว่า monoamine uptake blocker ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10.0 μM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก MPP^+ ได้ (รูปที่ 4) แต่เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ monoamine uptake blocker ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10.0 μM นาน 15 นาทีก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมง พบว่า monoamine uptake blocker ไม่สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก hydrogen peroxide ได้ (รูปที่ 5)



* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม MPP^+

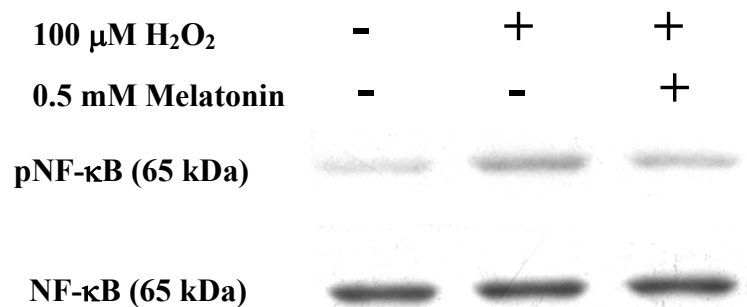


รูปที่ 5. ผลของ monoamine uptake blocker ในการยับยั้งผลของ hydrogen peroxide ที่มีต่อการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท * $p < 0.05$

ผลของ hydrogen peroxide และเมลลาโทนินที่มีต่อการ phosphorylation และ translocation ของโปรตีน nuclear factor kappa B (NF-kB)

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 uM นาน 10 นาทีมีการ phosphorylation ของโปรตีน nuclear factor kappa B (NF-kB) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ hydrogen peroxide และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ได้รับเมลลาโทนินที่ความเข้มข้น 0.5 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 uM นานต่อไปอีก 10 นาทีพบว่าเมลลาโทนินสามารถลดการ phosphorylation ของโปรตีน NF-kB ของเซลล์ SH-SY5Y จาก hydrogen peroxide ได้ (รูปที่ 6)

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 uM นาน 10 นาทีมีการ translocation ของ phosphorylated-nuclear factor kappa B (pNF-kB) เข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ hydrogen peroxide และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ได้รับเมลลาโทนินที่ความเข้มข้น 0.5 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 uM นานต่อไปอีก 10 นาทีพบว่าเมลลาโทนินสามารถลดการ translocation ของ pNF-kB ได้ (รูปที่ 7)



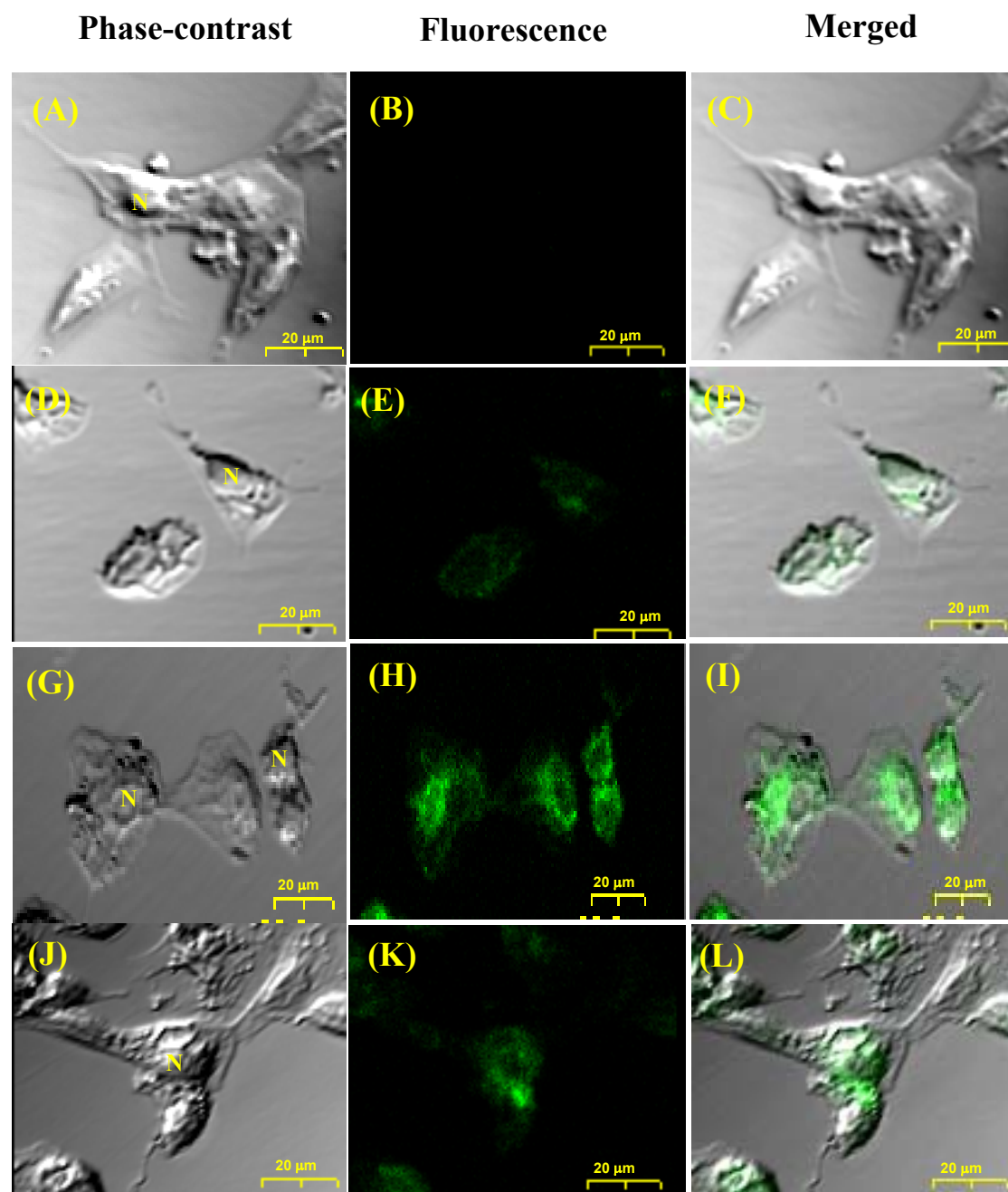
ผลของ hydrogen peroxide และเมลาโทนินที่มีต่อการ expression ของโปรตีน Bax และ Bcl-2

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μ M นาน 24 ชั่วโมงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Bax และ Bcl-2 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ hydrogen peroxide และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ได้รับเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 0.5 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μ M นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่าเมลาโทนินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bax แต่ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bcl-2 ของเซลล์ SH-SY5Y จาก hydrogen peroxide ได้ (รูปที่ 8)

บทบาทของ Ras protein กับกลไกในการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดย hydrogen peroxide

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μ M นาน 24 ชั่วโมงมีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ hydrogen peroxide และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ได้รับ FTase (farnesyltransferase) inhibitor (FTase เป็นเอนไซม์ที่ช่วย catalyze Ras protein) ที่ความเข้มข้น 2.0, 5.0 และ 10.0 μ M ก่อนที่จะได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 μ M นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่า FTase

inhibitor ที่ความเข้มข้นระหว่าง 2.0-10.0 μM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก hydrogen peroxide ได้ (รูปที่ 9)



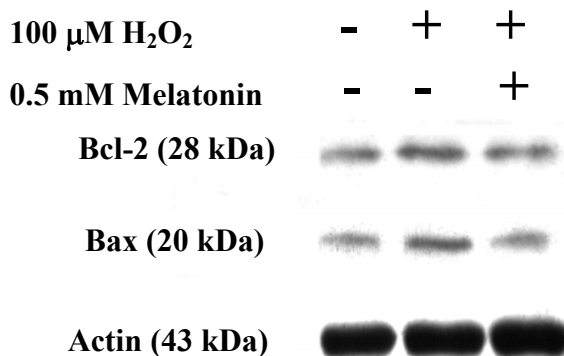
รูปที่ 7. ผลของ hydrogen peroxide และเมลานินที่มีต่อการ translocation ของ phosphorylated-nuclear factor kappa B (pNF-kB) แสดงด้วย สัญญาณ fluorescence สีเขียว

A, B และ C = non-staining (negative control) cells

D, E และ F = Control-untreated cells

G, H และ I = Hydrogen-treated cells

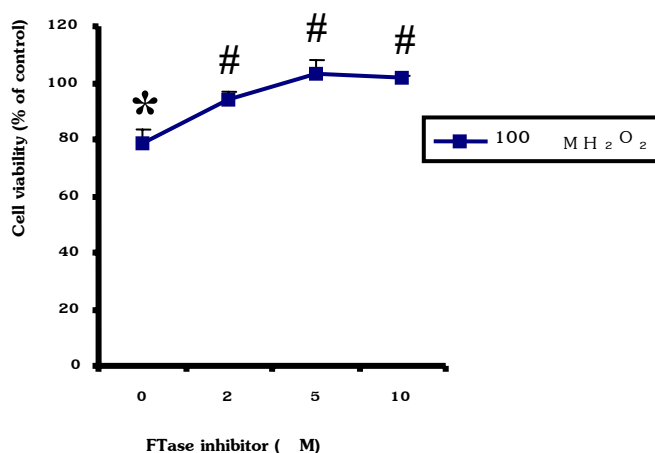
J, K และ L = Hydrogen peroxide plus melatonin-treated cells



รูปที่ 8. ผลของ hydrogen peroxide และเมลาโทนินที่มีต่อการ expression ของโปรตีน Bax และ Bcl-2

ผลของ MPP^+ ซึ่งเป็น **active metabolite** ของ neurotoxin MPTP และเมลาโทนินที่มีต่ออัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ที่ได้รับ MPP^+ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ MPP^+ และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ได้รับเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ MPP^+ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่าเมลาโทนินที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5-2.0 mM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SK-N-SH จาก MPP^+ ได้โดยผลในการลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ได้ผลสูงสุดที่ 1.0 mM และผลในการลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยเมลาโทนินจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเมลาโทนินมากกว่า 2.0 mM ขึ้นไป (รูปที่ 10)



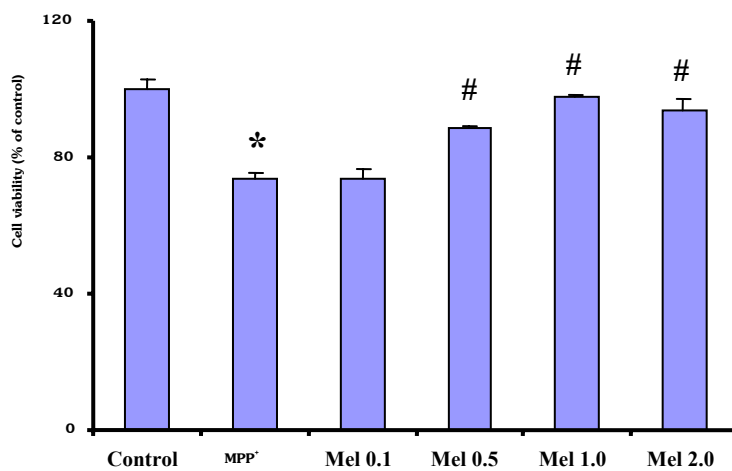
รูปที่ 9. f

FTase inhibitor (M)

1

peroxide ที่มีต่อการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม

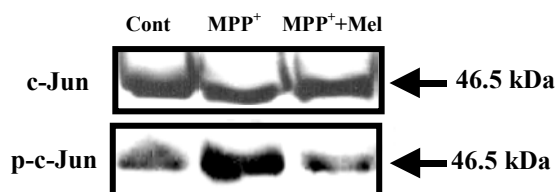


รูปที่ 10. ผลของเมลานโทนินในการป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาทโดย MPP⁺
*p < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม
p < 0.05 เทียบกับกลุ่ม MPP⁺

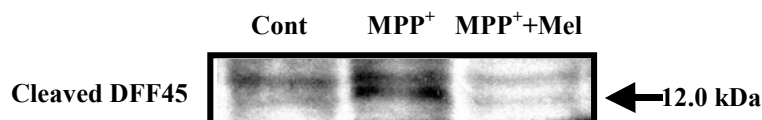
ผลของ MPP⁺ และเมลานโทนินที่มีต่อการ phosphorylation ของโปรตีน c-Jun และ cleavage ของ DFF45

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ที่ได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการ phosphorylation ของโปรตีน c-Jun เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ MPP⁺ และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ได้รับเมลานโทนินที่ความเข้มข้น 1.0 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่าเมลานโทนินสามารถลดการ phosphorylation ของโปรตีน c-Jun ของเซลล์ SK-N-SH จาก MPP⁺ ได้ (รูปที่ 11)

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ที่ได้รับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการ cleavage ของ DFF45 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ MPP⁺ และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ได้รับเมลานโทนินที่ความเข้มข้น 1.0 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่าเมลานโทนินสามารถลดการ cleavage ของ DFF45 ได้ (รูปที่ 12)



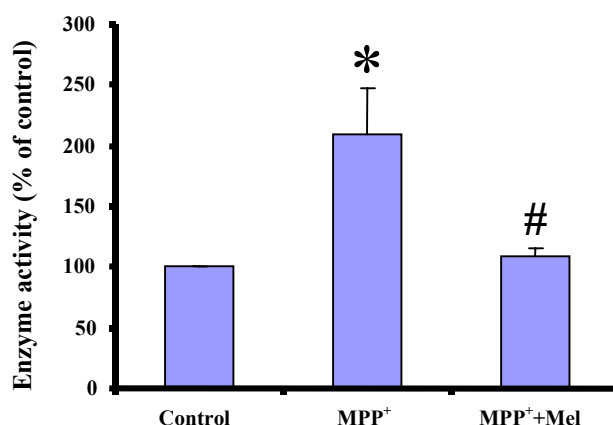
รูปที่ 11. ผลของ MPP⁺ และเมลานโทนินที่มีต่อการ phosphorylation ของ



รูปที่ 12. ผลของ MPP⁺ และเมลานินที่มีต่อการ cleavage ของ

ผลเมลานินที่มีต่อการเพิ่มขึ้นของ caspase enzyme activity โดย MPP⁺

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ที่ได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการเพิ่มขึ้นของ caspase enzyme activity อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ MPP⁺ และเมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ได้รับเมลานินที่ความเข้มข้น 1.0 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 0.1 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมงพบว่าเมลานินสามารถลดการเพิ่มขึ้นของ caspase enzyme activity จาก MPP⁺ ได้ (รูป



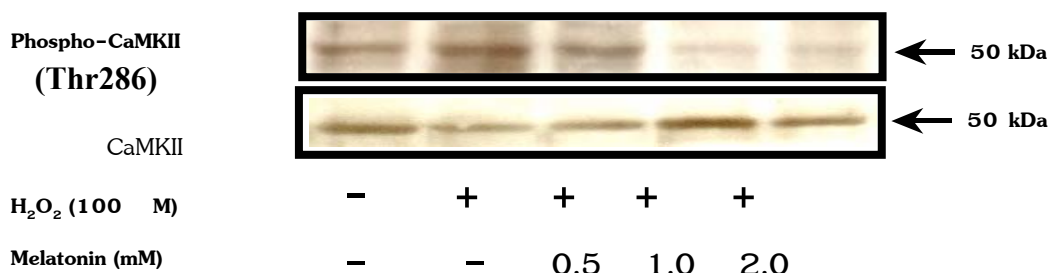
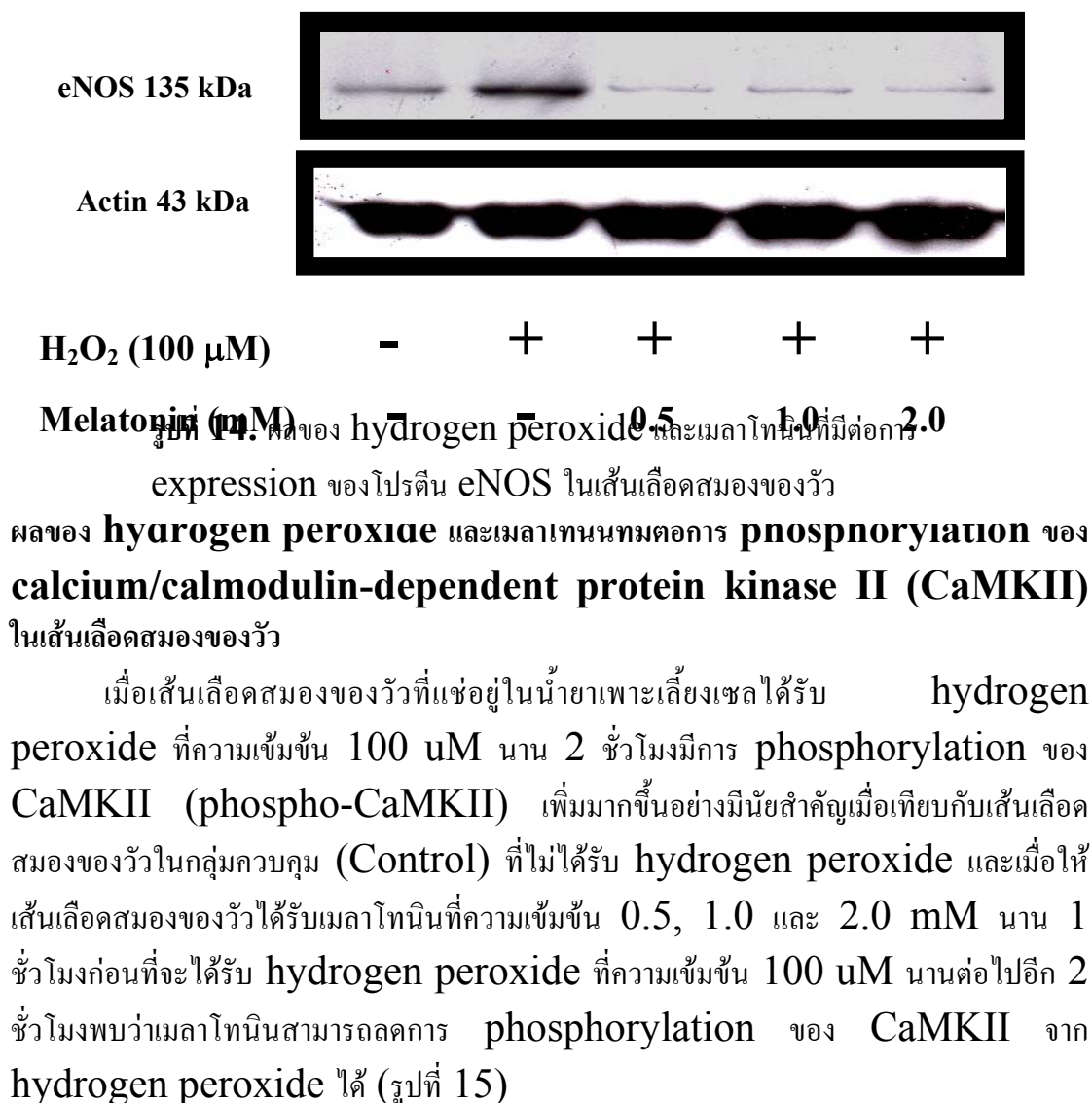
ที่ 13)

ผลของ hydrogen peroxide และเมลานินที่มีต่อการ expression ของโปรตีน endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ในเส้นเลือดสมองของวัว

เมื่อเส้นเลือดสมองของวัวที่แช่อยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 uM นาน 2 ชั่วโมงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน eNOS มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ hydrogen peroxide และเมื่อให้เส้นเลือดสมองของวัวได้รับเมลานินที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่

รูปที่ 13. ผลของ MPP⁺ และเมลานินที่มีต่อ caspase enzyme activity

ชั่วโมงพบว่าเมลานินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีน eNOS จาก hydrogen peroxide ได้ (รูปที่ 14)



รูปที่ 15. ผลของ hydrogen peroxide และเมลานินที่มีต่อการ phosphorylation ของ CaMKII ในเส้นเลือดสมองของวัว

บทวิจารณ์

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ที่พอจะสรุปได้ว่า hydrogen peroxide สามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท และทราบถึงกลไกในระดับโมเลกุลบางส่วนที่น่าจะเกี่ยวข้องในการเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะที่นำมาซึ่งการเสื่อมสลายของเซลล์คือ hydrogen peroxide จากภายนอกเซลล์น้ำที่จะซึมผ่าน (Diffuse) เยื่อหุ้มเซลล์โดยตรงเข้าไปที่ cytosol (Rhee 2006) เพราะจากผลการทดลองของเราพบว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของ uptake site ไม่สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ที่เกิดจาก hydrogen peroxide ได้ เมื่ออยู่ในเซลล์และมีปริมาณมากเกินไปที่ระบบกำจัด oxidizing agents ของเซลล์จะรองรับได้ hydrogen peroxide นำที่จะไปมีผลในการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้มีการทำงานของ cell death signaling cascades เพิ่มมากขึ้น โดยโมเลกุลเป้าหมายที่สำคัญของ hydrogen peroxide ที่น่าจะเป็นตัวการสำคัญหลักในการก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำให้มีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนก็คือ Ras protein และ protein kinase ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ NF- κ B เนื่องจากผลการทดลองของเราพบว่า FTI-277 ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ Ras protein (Lerner et al 1995) สามารถที่จะยับยั้งผลในการก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนโดย hydrogen peroxide ได้ ส่วนกระบวนการที่ hydrogen peroxide ก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนโดยผ่านมาทาง NF- κ B นั้นน่าที่จะเกี่ยวข้องกับการ phosphorylation และ translocation ของ NF- κ B การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน Bax และ Bcl-2 และการทำงานของ caspase enzyme ซึ่งเรามักเรียกโดยรวมว่าเป็น Caspase dependent pathway (Li et al 1997) โดยจากผลการทดลองของเราในครั้งนี้พบว่า hydrogen peroxide สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ NF- κ B phosphorylation (pNF- κ B) อย่างมีนัยสำคัญนอกจากนี้ยังมีการ translocation ของ pNF- κ B จาก cytoplasm เข้าไปที่บริเวณรอบๆนิวเคลียสและในนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย เมื่อผ่านเข้าไปในนิวเคลียสแล้ว pNF- κ B คงจะทำหน้าที่เป็น transcriptional factor (Baldwin 1996) และเหนี่ยวนำให้มีการ expression ของยีนต่างๆเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนของโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 family เป็นที่ทราบกันดีว่า Bax และ Bcl-2 เป็นโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 family ที่ทำหน้าที่ต่างกันคือ Bax ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม apoptotic-agonist เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายหรือการตายของเซลล์ (cell death) ส่วน Bcl-2 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม apoptotic-antagonist เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) (Reed 1998, Korsmeyer 1999) ข้อมูลจากผลการทดลองที่ผ่านมาส่วนใหญ่ มักพบว่า oxidative stress จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Bax แต่มีผลทำให้ปริมาณโปรตีน Bcl-2 ลดลง (Culmsee and Mattson 2005, Jang et al 2005) แต่ผลจากการศึกษาของเราในครั้งนี้กลับพบว่า hydrogen peroxide มีผลในการเพิ่มปริมาณของทั้ง Bax และ Bcl-2 แต่สัดส่วนในการเพิ่มขึ้นของโปรตีนทั้งสองชนิดนั้นแตกต่างกันในแต่ละสภาวะของเซลล์

กล่าวคือในเซลล์ที่ได้รับ hydrogen peroxide อย่างเดียวเซลล์มีอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์สูงการเพิ่มขึ้นของ Bax จะมากกว่า Bcl-2 แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์ที่ได้รับ hydrogen peroxide และเมลลาโทนินด้วยเซลล์มีอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ลดลงมีการลดลงของปริมาณของ Bax แต่ยังคงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Bcl-2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสื่อมสลายของเซลล์จาก oxidative stress น่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Bax ที่เพิ่มขึ้นจากปกติอย่างมากไม่ได้เกิดมาจากการลดต่ำลงของปริมาณ Bcl-2 หรืออาจกล่าวได้ว่าอัตราส่วนของปริมาณ Bax/Bcl-2 นั้นมีผลต่อการอยู่รอดหรือการตายของเซลล์กล่าวคือถ้าอัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 ใกล้เคียงกันเซลล์จะดำรงสภาวะสมดุลและมีชีวิตรอดแต่เมื่อใดที่ อัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเซลล์จะเสียสภาวะสมดุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีการกระตุ้นให้การทำงานของ caspase dependent pathway เพิ่มขึ้นซึ่งสุดท้ายแล้วจะก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทตามมา และในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ก็ได้ทำการทดสอบและพบว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของ caspase enzyme สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดย hydrogen peroxide ได้ และที่สำคัญคือการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยฮอร์โมนเมลลาโทนิน และผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้บ่งชี้ว่าเมลลาโทนินสามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยปามินที่เกิดจาก hydrogen peroxide ได้โดยเมลลาโทนินสามารถที่จะ ลดการเพิ่มขึ้นของการ phosphorylation และ ยับยั้งการtranslocation ของ pNF-kB ที่มีผลมาจาก hydrogen peroxide ได้ นอกจากนี้เรายังศึกษาพบว่าเมลลาโทนินมีผลในการลดการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 โดย hydrogen peroxide ได้อีกด้วย

ต่อข้อสงสัยที่ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน Bax และ Bcl-2 และมีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 โดย hydrogen peroxide นั้นส่งผลต่อเนื่องให้มีการกระตุ้นการทำงานของ caspase dependent pathway เพิ่มขึ้นได้อย่างไร คำอธิบายในส่วนนี้น่าจะมาจากการศึกษาและพบว่าโดยปกติแล้ว Bcl-2 สามารถที่จะจับตัวอยู่กับ pro-apoptotic protein เช่น Bax หรือ Bad แบบ heterodimerization (Korsmeyer 1999) แต่เมื่อใดก็ตามที่เซลล์ตกอยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้าง Bax มากกว่าปกติแต่การสร้าง Bcl-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จะทำให้มีปริมาณของ Bax ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ผลที่ตามมาก็คือ Bax สามารถจับตัวกันเองแบบ Homodimerization (Reed 1998) และทำหน้าที่เป็น channel บน plasma membrane ของไมโทคอนเดรีย ทำให้มีการรั่วไหลของ cytochrome c จากภายในไมโทคอนเดรียออกมาสู่ cytoplasm และ cytochrome c นี้เองที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการทำงานของ caspase dependent pathway เพิ่มขึ้น (Li et al 1997)

ในส่วนของการศึกษา MPP⁺ ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยปามินได้นั้น จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า uptake site น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการที่ก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยปามิน เนื่องจากผลการทดลองพบว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของ uptake site สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ที่เกิดจาก MPP⁺ ได้ โดยโมเลกุลเป้าหมายที่

สำคัญของ MPP^+ ที่น่าจะเป็นตัวการสำคัญหลักในการก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำให้มีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนก็คือ protein kinase ในกลุ่มที่เรียกว่า c-Jun-N-terminal kinase (JNK) หรือ stress-activated protein kinase (SAPK) (Xia et al 2001) เพราะผลการทดลองพบว่า MPP^+ สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ c-Jun phosphorylation (p-c-Jun) อย่างมีนัยสำคัญ ต่อข้อสงสัยที่ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ p-c-Jun แล้วส่งผลต่อเนื่องให้มีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทได้อย่างไรนั้น คำอธิบายในส่วนนี้น่าจะมาจากการศึกษาและพบว่าสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของ JNK เช่น JNK-interacting protein-1 (JIP-1) สามารถยับยั้งผลของ MPP^+ ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทได้และยังลดการเพิ่มขึ้นของ cleaved caspase 9 และ cleaved caspase 3 จาก MPP^+ ได้อีกด้วย (Xia et al 2001) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยหลายอันที่พบว่าเมื่อ JNK ถูกกระตุ้นจะมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c จากไมโทคอนเดรียออกมาสู่ cytoplasm มากขึ้นและส่งผลต่อเนื่องให้มีการกระตุ้น caspase-mediated death pathway ตามมา (Tournier et al 2000) ซึ่งผลการวิจัยของเราในครั้งนี้ก็สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ผ่านมา โดยเราศึกษาพบว่า MPP^+ มีผลในการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และส่งผลต่อเนื่องให้มีการย่อยสลาย DNA fragmentation 45 (DFF45) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ 40-kDa endonuclease หรือ DNA fragmentation 40 (DFF40) เมื่อใดก็ตามที่ DFF 40 ถูกกระตุ้นมันจะส่งผลให้มีการตัด DNA เป็นเส้นสั้นๆ (DNA fragmentation) และส่งผลให้มีการเสียสมดุลการทำงานของเซลล์และเซลล์ก็จะตายในที่สุด (Sakahira et al 1998) ในทำนองเดียวกันการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยฮอร์โมนเมลาโทนิน และผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้บ่งชี้ว่าเมลาโทนินสามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนที่เกิดจาก MPP^+ ได้โดยเมลาโทนินสามารถที่จะ ลดการเพิ่มขึ้นของการ phosphorylation ของ c-Jun (p-c-Jun) การกระตุ้น caspase-3 activity และ การย่อยสลาย DFF45 (Cleaved DFF45) โดย MPP^+ ได้อีกด้วย

นอกจาก oxidative stress จะสามารถก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทแล้วยังมีผลทำให้เกิดโรคเส้นเลือดสมอง (cerebrovascular diseases) ได้อีกด้วย (Zhao et al 1994) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง oxidative stress ที่เหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการสร้าง oxidizing agents กลุ่ม Reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide (NO) การเพิ่มมากขึ้นของ NO สามารถก่อให้เกิด oxidative injury ของ endothelial cell ของเส้นเลือดสมองได้ (Shaikh et al 1997, Choi et al 2004) ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าเมลาโทนินสามารถลดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ในเส้นเลือดสมองวัวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress จาก hydrogen peroxide ได้ เนื่องจาก eNOS เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้าง NO โดยการทำงานของ eNOS ต้องอาศัย calcium/calmodulin เป็นตัวร่วมโดยผ่านทาง

calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (Szabo 1996, Yun et al 1996, Iadecola and Ross 1997) ซึ่งเราก็ได้ศึกษาพบอีกว่าเมลาโท닌สามารถลดการเพิ่มขึ้นของ CaMKII phosphorylation (phospho-CaMKII) ในเส้นเลือดสมองว่าที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ oxidative stress จาก hydrogen peroxide ได้ด้วย

จากผลการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการเป็นสารที่สามารถลดหรือป้องกันการเสื่อมสลายหรือการตายของเซลล์ประสาท (Chetsawang et al 2006, Chetsawang et al 2007) และเส้นเลือดสมอง (Chucharoen et al 2007) ของเมลาโท닌ได้เป็นอย่างดี โดยผลของการวิจัยชี้ให้เห็นถึงกระบวนการในระดับเซลล์และโมเลกุลที่เมลาโท닌เข้าไปยับยั้งการกระตุ้น cell death signaling จากสภาวะ oxidative stress ได้ ในส่วนของการนำเมลาโท닌มาใช้ในผู้ป่วยในอนาคตนั้นคงยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพสูงสุดและปลอดภัยต่อผู้ป่วยมากที่สุด นอกจากนี้ผลการวิจัยในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงกระบวนการในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายหรือเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทและเส้นเลือดสมอง อันจะเป็นข้อมูลและความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะ oxidative stress และการตายของเซลล์ได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of parkinson's disease. *Brain Res.* 2002; 943: 163-173.
- Baldwin AS Jr. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 649-681.
- Chetsawang B, Putthaprasart C, Phansuwan-Pujito P, et al. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *J. Pineal Res.* 2006; 41: 116-123.
- Chetsawang J, Govitrapong P, Chetsawang B. Melatonin inhibits MPP⁺-induced caspase-mediated death pathway and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cultured cells. *J. Pineal Res.* 2007; 43: 115-120.
- Choi WS, Yoon SY, Oh TH, et al. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspase, ROS and JNK. *J. Neurosci. Res.* 1999; 57: 86-94.

- Choi YJ, Lee MK, Lee YJ, et al. Inhibition of hydrogen peroxide-induced endothelial apoptosis by 2',4',7'-trihydroxyflavanone, a flavonoid form. *J. Med. Food* 2004; 7: 408-416.
- Chucharoen P, Chetsawang B, Putthaprasart C, et al. The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels. *J. Pineal Res.* 2007; 43: 35-41.
- Culmsee C, attson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 761-777.
- Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota Jr MLC, et al. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult wistar rat. *Develop. Brain Res.* 2001; 130: 109-114.
- Davidson C, Gow AJ, Lee TH, et al. Metamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res. Rev.* 2001; 36: 1-22.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47-80.
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 1989; 262: 2551-2556.
- Hulgan T, Morrow J, D'Aquila RT, et al. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 1711-1717.
- Iadecola C, Ross ME. Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997; 835: 203-217.
- Jang MH, Jung SB, Lee MH, et al. Melatonin attenuates amyloid beta-25-35-induced apoptosis in mouse microglia BV2 cells. *Neurosci. Lett.* 2005; 380: 26-31.
- Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res. Suppl.* 1999; 59: 1693-1700.

- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236.
- Reiter RJ, Tan D, Sainz RM, et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *JPP*. 2002; 54: 1299-1321.
- Reiter RJ, Sainz RM, Lopez-Burillo S, et al. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental model of stroke. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 993: 35-47.
- Sahuquillo J, Poca MA, Amoros S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr. Phar. Des.* 2001; 7: 1475-1503.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99.
- Shaikh AY, Xu J, Wu Y, et al. Melatonin protects bovine cerebral endothelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and death. *Neurosci. Lett.* 1997; 229: 193-197.
- Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous media. *J. Pineal. Res.* 1994; 16: 198-201.
- Shor-Posner G, Lecusay R, Morales G, et al. Neuroprotection in HIV-positive drug users: implications for antioxidant therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2002; 31 (Suppl. 2): S84-S88.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 325-395.
- Szabo C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 1996; 41: 131-141.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of

- melatonin interaction with hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 253: 614-620.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 2001; 15: 2294-2296.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J. Pineal Res.* 2003; 34: 249-259.
- Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 1990; 40: 17-30.
- Thompson KJ, Shoham S, Connor JR. Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Bull.* 2001; 55: 155-164.
- Tournier C, Hess P, Yang DD, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; 288: 870-874.
- Vaudano E, Rosenblad C, Bjorklund A. Injury induced c-Jun expression and phosphorylation in the dopaminergic nigral neurons of the rats: correlation with neuronal death and modulation by glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 13: 1-14.
- Xia XG, Harding T, Weller M, et al. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 10433-10438.
- Xu J, Kao SY, Lee FJS, et al. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in parkinson disease. *Nature Med.* 2002; 8: 600-606.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1996; 10: 291-316.
- Zharkovsky T, Kaasik A, Jaako K, et al. Neurodegeneration and production of the new cells in the dentate gyrus of juvenile

rat hippocampus after a single administration of ethanol. *Brain Res.* 2003; 978: 115-123.

Zhao Q, Palmark K, Smith ML, et al. Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta. Physiol. Scand.* 1994; 152: 349-350.

ผลงานและประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 Chetsawang B, Putthaprasart C, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *J. Pineal Res.* 2006; 41: 116-123. (impact factor = 5.025)
- 1.2 Chetsawang J, Govitrapong P, Chetsawang B. Melatonin inhibits MPP⁺-induced caspase-mediated death pathway and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cultured cells. *J. Pineal Res.* 2007; 43: 115-120. (impact factor = 5.025)
- 1.3 Chucharoen P, Chetsawang B, Putthaprasart C, Srikiatkachorn A, Govitrapong P. The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels. *J. Pineal Res.* 2007; 43: 35-41. (impact factor = 5.025)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

- 2.1 ผลิตภัณฑ์คิดประดิษฐ์โทสาขาประสาทวิทยาศาสตร์ 1 คน

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- 3.1 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “The neuroprotective effects of melatonin against hydrogen peroxide induced common oxidative stress mechanism in cultured SH-SY5Y cells” ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 13-15 ตุลาคม 2548
- 3.2 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “The neuroprotective effects of melatonin against a common oxidative stress mechanism in dopaminergic SH-SY5Y cells in culture” ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31 วันที่ 18-20 ตุลาคม 2548

- 3.3 เสนอผลงานแบบบรรยายเรื่อง “Protective effect of melatonin against hydrogen peroxide inducing cell death signaling: an involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2 in SH-SY5Y cultured cells” ในการประชุม “7th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry” ณ. ประเทศสิงคโปร์ วันที่ 2-5 กรกฎาคม 2549
- 3.4 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “The neuroprotective effects of melatonin and desipramine on SH-SY5Y dopamine cell line” ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32 วันที่ 10-12 ตุลาคม 2549
- 3.5 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “Protective effect of melatonin against exogenous reactive oxygen species inducing cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells” ในการประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 12-14 ตุลาคม 2549
- 3.6 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “Involvement of Ras-dependent signaling pathway in hydrogen peroxide and melatonin-treated SH-SY5Y cultured cells” ในการประชุม “7th IBRO World Congress of Neuroscience” ณ. เมือง Melbourne ประเทศออสเตรเลีย วันที่ 12-17 กรกฎาคม 2550

Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2

Abstract: Oxidative stress is defined as a disturbance in the prooxidant–antioxidant balance, leading to potential cell damage. Reactive oxygen species such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide may act also as secondary intermediaries in intracellular signaling leading to cell death. The neuroprotective effect of melatonin has been observed both in vivo and in vitro. The objective of this research, therefore, was to better understand the cellular mechanisms of neuronal cell degeneration induced via oxidative stress and the protective roles of melatonin on this cell death. In the present study, the effects of melatonin on H₂O₂-induced neuronal cell degeneration in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells were investigated. The results showed that H₂O₂ significantly decreased cell viability and melatonin reversed the toxic effects of H₂O₂. An inhibition of caspase enzyme activity by Ac-DEVD-CHO, a caspase-3 inhibitor, significantly increased cell viability in H₂O₂-treated cells. The phosphorylation of transcription factors, nuclear factor kappa B (NF-κB) was increased in H₂O₂-treated cells and this effect was abolished by melatonin. Translocation of phosphorylated NF-κB to perinuclear and nuclear sites, estimated using immunofluorescence, occurred to a greater extent in H₂O₂-treated cells than in untreated control cells and again this effect was abolished by melatonin. In addition, induction of Bcl-2 and Bax proteins was demonstrated in SH-SY5Y cultured cells treated with H₂O₂, whereas the induction of Bax but not Bcl-2 was diminished by melatonin. In light of these finding, it is possible that the antioxidative stress effect of melatonin associated with inhibition of Bax expression, may offer a means of treating neuronal degeneration and disease.

Banthit Chetsawang¹, Chorkaew Putthaprasart¹, Pansiri Phansuwan-Pujito² and Piyarat Govitrapong^{1,3}

¹Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom; ²Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok; ³Center for Neuroscience and Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Key words: Bax, cell death, hydrogen peroxide, melatonin, NF-κB, oxidative stress, SH-SY5Y Cells

Address reprint requests to Banthit Chetsawang, Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom 73170, Thailand.
E-mail: grbcs@mahidol.ac.th

Received February 13, 2006;
accepted March 31, 2006.

Introduction

Oxygen is vital for life; all parts of the body use oxygen to produce the energy, especially the brain. The brain uses much of the energy in the form of adenosine triphosphate, which is generated by oxygen and glucose. However, oxygen is also potentially dangerous in the form of oxidative stress, when the cell is subject to an imbalanced state of the prooxidant and antioxidant factors. This imbalance leads to the generation of reactive species during events such as trauma, ischemia, and aging. Damaging agents, such as reactive oxygen species (ROS), which includes the hydroxyl radical, superoxide anion and hydrogen peroxide may damage DNA, proteins and lipids, provoking disturbances in cell membranes, calcium influx, the cytoskeleton and a cascade of events leading to cell death [1]. Oxidative stress has been implicated in a number of human degenerative disorders of the central nervous system, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's disease (AD), and Parkinson's disease (PD) [2].

Melatonin, the secretory products synthesized in the pineal gland, has a variety of functions. In animals,

melatonin has been reported to play a role in circadian rhythms, seasonal rhythms, reproductive effects, learning and memory [3, 4]. Moreover, many studies have demonstrated that melatonin is a direct free radical scavenger and has indirect antioxidant properties in all organs investigated [5, 6]. The neuroprotective effect of melatonin has been reported both in vivo and in vitro. Several studies have shown that melatonin has high potency in preventing astrocyte and neuronal cell death in various parts of the brain as well as PD induced by neurotoxins such as 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) [7, 8].

Recently, it has been reported that overproduction of ROS occurs within minutes after brain injury and mediates both necrotic and apoptotic cell death [9, 10]. In addition, H₂O₂ production leads to the activation of protein tyrosine-kinases followed by the stimulation of downstream signaling pathways including mitogen-activated protein kinases and phospholipase C [11, 12]. These reactions, in concert, result in the activation of redox oxidation transcription

factors, including nuclear factor kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 [13]. NF- κ B regulates the expression of several genes encoding acute-phase proteins, cell adhesion molecules, cell surface receptors, cytokines, and antioxidant enzymes [14, 15]. It has been reported that NF- κ B also activates expression of the anti-apoptotic, Bcl-2 gene [16]. Bcl-2 belongs to a regulatory protein family called Bcl-2. Its members include proapoptotic proteins (Bad, Bid, Bax, Bak, etc.) as well as anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL, etc.) [17]. Of the Bcl-2 family proteins, Bax expression is also found to be activated by NF- κ B [18]. Despite the apparent link between NF- κ B and apoptosis, the evidence associated with both its anti-apoptotic (cell survival) and pro-apoptotic (cell death) effects has been controversial. In light of this controversy, the present study was designed to investigate the cell death signaling cascades induced by H₂O₂, a reactive oxidizing agent, and to test the protective effects of melatonin on oxidative stress-induced neuronal cell degeneration.

Materials and methods

Reagents

Minimum essential medium (MEM), Ham's F-12 medium, fetal bovine serum, penicillin and streptomycin were purchased from Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Melatonin was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). H₂O₂ was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ac-DEVD-CHO [caspase-3 inhibitor (aldehyde); Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO] was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). The rabbit polyclonal anti-phosphorylated and total NF- κ B, the rabbit monoclonal anti-Bax, the mouse monoclonal anti-Bcl-2, and the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG antibodies were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). ECL Plus Western Blotting Reagent was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Nunclon™ culture flasks and Corning culture plates were obtained from Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark) and Corning Incorporated (Acton, MA, USA), respectively. Human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line was provided from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All other chemicals used in this study were analytical grade and obtained essentially either from Sigma Aldrich or Lab-Scan Analytical Science (Dublin, Ireland).

SH-SY5Y cell cultures

SH-SY5Y cells were grown in complete media, which was made with 45% MEM, 45% Ham's F-12, 10% inactivated fetal bovine serum, and 100 U/mL penicillin/streptomycin. The cells were maintained at 37°C under a 5% CO₂/95% humidified air incubator for the indicated time.

Assay of cell viability

SH-SY5Y cells were re-suspended in complete media. The cells were placed into 96-well culture plates, and were

incubated at 37°C under a 5% CO₂/95% humidified air incubator for 24 hr. Cells were then incubated with H₂O₂ for 24 hr. Some cells were incubated with melatonin for 1 hr prior to treatment with H₂O₂ for another 24 hr without changing the culture medium. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 24 hr. Methylthiazolyltetrazolium bromide (MTT) in 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 was added to each well and incubated at 37°C for 4 hr. The extraction buffer (0.04 N HCl in isopropanol) was added. The optical densities were measured at 570 nm spectral wavelength using a microtiter plate reader.

Western immunoblotting

The cells were grown to subconfluent stage in six-well plates for 24–48 hr. The culture medium was removed and the monolayer was washed with complete media. Cells were then exposed to H₂O₂ for 24 hr. In some experiments melatonin was added to the medium 1 hr prior to incubation with H₂O₂ for another 24 hr without changing the culture medium. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 24 hr. After incubation, the cells were lysed by adding lysis buffer (Ripa buffer), sonicated for 10 s and centrifuged for 15 min at 10,000 g. The supernatants were collected and subjected to sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein bands were electroblotted to nitrocellulose membrane using 50 mA current strength for 1.5 hr at 4°C. The transfer efficiency was detected by Ponceau-S red solution. The nitrocellulose membranes were washed with TBS (Tris-buffered saline) for 5 min, incubated in Blocking Buffer (1X TBS, 0.1% Tween-20 and 5% nonfat dried milk) for 1 hr, washed three times for 5 min each with TBST (0.1% Tween-TBS) and incubated in primary antibodies at 4°C overnight. After incubation, they were washed three times for 5 min each with TBST, incubated in HRP-conjugated secondary antibody for 1 hr followed by washing three times for 5 min each with TBST. The blots were developed with Chemiluminescent ECL Plus Western Blotting detection reagents (Amersham Biosciences). The immunoblots were quantified by measuring the density of each band using densitometry with Scion image program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Re-probing of the same blot with actin or another antibody was performed to normalize for protein loading or to determine other proteins, respectively. The antibody against specific target protein was discarded by stripping buffer (100 mM beta-mercaptoethanol, 2% SDS, and 50 mM Tris-HCl pH 6.8). The stripping buffer was heated to 50°C in water bath and then incubated with nitrocellulose membrane for 15 min at 50°C with shaking. The membrane was washed two times for 20 min each with TBST and then returned to the normal process as indicated above.

Immunocytochemistry analysis

The immunofluorescence method was used to demonstrate phosphorylated nuclear factor kappa B (pNF- κ B) immunoreactivities. SH-SY5Y cells were grown in 96-well plates for 24 hr. Cells were then incubated with H₂O₂ for 10 min.

Some cells were incubated with 0.5 mM melatonin for 1 hr prior to incubation with 100 μ M H₂O₂ for another 10 min without changing the culture medium. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 10 min. Cells were washed twice with 0.1 M ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and then fixed in 4% paraformaldehyde (w/v in PBS) for 2 hr at 4°C. The fixed cells were washed as above and then permeabilized in chilled PBS containing 10% donkey serum, 0.1% Triton-X 100, 5% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at room temperature. Cells were incubated with a rabbit polyclonal antibody against phospho-NF- κ B-p65 (Ser 536) in 5% BSA in PBS for 48 hr at 4°C followed by incubation in fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated with donkey anti-rabbit IgG for 2 hr at 4°C. After being washed twice with PBS, cells were examined under a confocal laser scanning microscopy.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer test using the scientific statistic software SigmaStat version 2.03 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Probability (*P*) values of <0.05 were considered significant.

Results

SH-SY5Y cells were treated with H₂O₂ at 10, 100, 250, 500, and 1000 μ M for 24 hr. Cell viability was determined using MTT assay. The viability of cells incubated with H₂O₂ at 10, 100, 250, 500, and 1000 μ M for 24 hr were $94.9 \pm 1.8\%$, $77.5 \pm 1.7\%$, $55.7 \pm 2.1\%$, $26.4 \pm 2.8\%$, and $16.6 \pm 0.9\%$ of the control values, respectively. The results showed that H₂O₂ at 10–1000 μ M gradually decreased cell viability with significant decreases at concentrations higher than 100 μ M, when compared with control untreated cells. The higher the concentration of H₂O₂, the greater the decrease in cell viability. H₂O₂ at 100 μ M was chosen to study time-course effects of H₂O₂ on cell viability. The viability of cells incubated with 100 μ M H₂O₂ for 2, 4, 6, 12, 18 and 24 hr were $91.1 \pm 1.9\%$, $91.2 \pm 0.6\%$, $90.6 \pm 0.9\%$, $91.3 \pm 1.2\%$, $84.7 \pm 3\%$, and $75.9 \pm 2.7\%$ of the control values, respectively. The results show that H₂O₂ at 100 μ M for 2–24 hr significantly decreased cell viability. The longer the exposure time to H₂O₂, the greater the reduction in cell viability, is observed after 12 hr of incubation.

The viability of cells incubated with 100 μ M H₂O₂ for 24 hr was $75.5 \pm 5.7\%$ of the control value. The viability of cells incubated with Ac-DEVD-CHO at 10 and 25 μ M for 8 hr prior to treatment with 100 μ M H₂O₂ for an additional 24 hr was $93.5 \pm 4.5\%$ and $96.8 \pm 6.3\%$ of the control values, respectively. H₂O₂ at 100 μ M for 24 hr significantly reduced cell viability in SH-SY5Y cells when compared with control untreated cells. Preincubation of SH-SY5Y cells with 25 μ M Ac-DEVD-CHO, a caspase-3 inhibitor, for 8 hr prior to treatment with 100 μ M H₂O₂ for an additional 24 hr significantly increased cell viability when compared with H₂O₂-treated cells (Fig. 1).

SH-SY5Y cells were treated with H₂O₂ and with or without melatonin. Control cultured cells were treated with

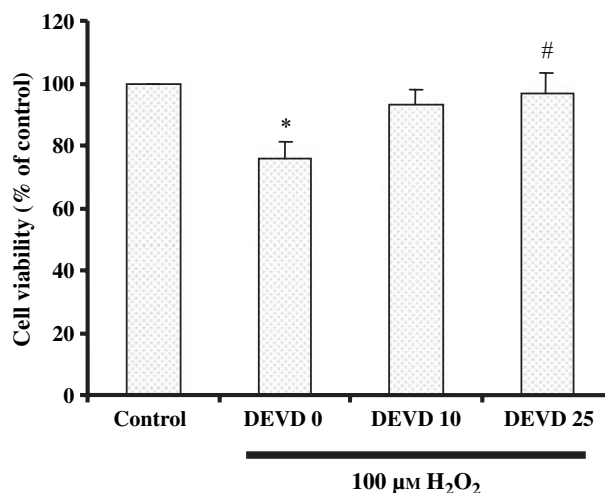


Fig. 1. The effect of Ac-DEVD-CHO (a caspase-3 inhibitor) on H₂O₂-induced reduction in cell viability. SH-SY5Y cells were treated with H₂O₂ at 100 μ M for 24 hr. Some cells were incubated with DEVD for 8 hr prior to incubation with H₂O₂ for another 24 hr without changing the culture medium. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 24 hr. Cell viability was measured using MTT assay. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M of four independent experiments. The ANOVA was performed for statistical analysis. **P* < 0.01 compared with control and #*P* < 0.05 compared with H₂O₂-treated cells. DEVD 0, 10 and 25 is Ac-DEVD-CHO at 0, 10 and 25 μ M, respectively.

cultured media. The viability of cells incubated with 100 μ M H₂O₂ for 24 hr was $65.9 \pm 4.6\%$ of the control value. The viability of cells incubated with melatonin at 0.1, 0.25, 0.5, 1, and 2 mM for 1 hr prior to treatment with 100 μ M H₂O₂ for an additional 24 hr was $77.6 \pm 2.9\%$, $79.0 \pm 1.8\%$, $85.1 \pm 2.3\%$, $75.3 \pm 1.2\%$, and $68.0 \pm 2.8\%$ of the control values, respectively. The results show that H₂O₂ at 100 μ M for 24 hr significantly decreased cell viability when compared with untreated control cells. Pretreating the cells with melatonin at 0.1, 0.25 and 0.5 mM but not at 1.0 and 2.0 mM for 1 hr prior to incubation with 100 μ M H₂O₂ for 24 hr significantly increased cell viability when compared with H₂O₂-treated cells (Fig. 2). Morphological determination of SH-SY5Y cells was visualized under the phase contrast microscope (data not shown). The results showed that control and 0.5 mM melatonin-treated cells were grown as a mixture of floating and adherent cells. The cells were grown as monolayer of neuroblastic cells with multiple, short, fine cell processes (neurites). A decrease of cell confluence and disruption of cell monolayer in H₂O₂-treated cells was observed when compared with control cells. An increase in cell confluence in melatonin plus H₂O₂-treated cells was observed when compared with H₂O₂-treated cells.

The amount of phosphorylated NF- κ B (pNF- κ B) and the total level of NF- κ B (tNF- κ B) was determined using Western blot analysis. SH-SY5Y cells were exposed to 100 μ M H₂O₂ for various times (0, 5, 10, 15 and 30 min). The relative levels of pNF- κ B/tNF- κ B increased at 10 min and declined after 15 min of incubation when compared with control or H₂O₂-treated cells that were not incubated (0 min) (Fig. 3). H₂O₂ at 100 μ M for 10 min was used to study the effect of H₂O₂ and melatonin on phosphorylation

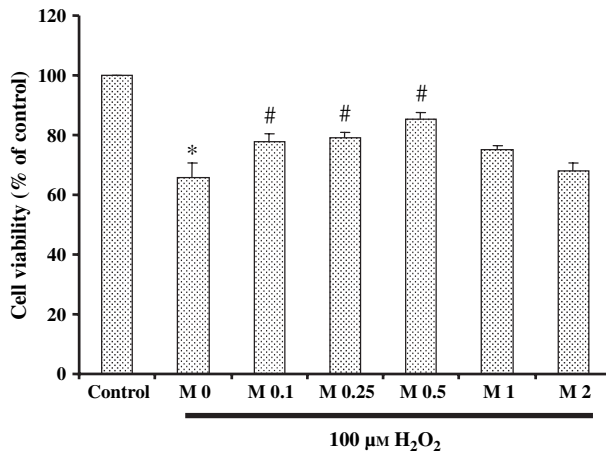


Fig. 2. Protective effect of melatonin against H_2O_2 -induced reduction in cell viability. SH-SY5Y cells were treated with $100 \mu M$ H_2O_2 for 24 hr. Some cells were pretreated with 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2 mM melatonin for 1 hr prior to incubation with $100 \mu M$ H_2O_2 for an additional 24 hr. Control cells were incubated with culture medium for 24 hr. Cell viability was measured using MTT assay. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M of five independent experiments. The ANOVA was performed for statistical analysis. * $P < 0.001$ compared with control, # $P < 0.05$ compared with H_2O_2 -treated cells without melatonin. M 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 is melatonin at 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mM, respectively.

and translocation of NF- κ B. H_2O_2 at $100 \mu M$ for 10 min significantly increased the amount of pNF- κ B/tNF- κ B ($246.9 \pm 2.7\%$ of the control) when compared with control untreated cells. Preincubation with melatonin at 0.5 mM for 1 hr prior to treatment with $100 \mu M$ H_2O_2 significantly reduced the amount of pNF- κ B/tNF- κ B ($191.4 \pm 16.9\%$ of the control) in SH-SY5Y cells when compared with H_2O_2 -treated cells without melatonin (Fig. 4). Fluorescence imaging microscope studies were conducted to correlate and confirm the altered neurochemical data of pNF- κ B observed by Western blot analysis. The green color indicated pNF- κ B-positive immunostaining in SH-SY5Y cells (Fig. 5). H_2O_2 at $100 \mu M$ for 10 min induced NF- κ B phosphorylation and its translocation into the perinuclear

and endonuclear regions (Fig. 5H,I) when compared with control cells (Fig. 5E,F). Some cells were incubated with 0.5 mM melatonin for 1 hr prior to treatment with $100 \mu M$ H_2O_2 for an additional 10 min. These cells showed a decrease in the NF- κ B phosphorylation and pNF- κ B translocation (Fig. 5K,L) when compared with H_2O_2 -treated cells without melatonin (Fig. 5H,I).

H_2O_2 at $100 \mu M$ for 24 hr significantly increased Bax ($221 \pm 8.2\%$ of the control) and Bcl-2 ($155.5 \pm 11.8\%$ of the control) protein levels in SH-SY5Y cells when compared with control cells. The expression of Bax induced by $100 \mu M$ H_2O_2 was higher than that of Bcl-2 proteins (Fig. 6). Although, SH-SY5Y cells pretreated with 0.5 mM melatonin for 1 hr prior to treatment with $100 \mu M$ H_2O_2 reduced induction of Bax ($167.6 \pm 13.6\%$ of control) expression when compared with H_2O_2 -treated cells, the treatments had very little effect on induction of Bcl-2 ($145.9 \pm 16.9\%$ of control) expression (Fig. 6).

Discussion

Oxidative stress is the imbalance between the rate of oxidant production and the levels of antioxidants [19]. The oxidant production consists of radicals and nonradicals, which are known as ROS [20]. The increasing of ROS leads to failure of cellular homeostasis and activation a cascade of events leading to cell death [1]. The oxidative stress is believed to induce cell death in several neurodegenerative diseases such as AD, ALS, and PD. The evidence shows oxidation and nitration of protein, DNA, and lipids are the markers of neurodegeneration [21].

H_2O_2 is an oxidizing compound, which is generated from superoxide [22]. It has been demonstrated that exogenously applied H_2O_2 in rat brain astrocytes induced mitochondrial swelling, plasma membrane blebs and loss of retained mitochondria function, resulting in cell death [18]. Induction of apoptosis concomitantly with H_2O_2 generation and activation of NF- κ B, p53, c-Jun and caspase-3 was found in lymphocytes treated with monoamine neurotoxins [23]. In the present study, a trend of decreasing viability with increasing H_2O_2 concentrations and incubation period was observed in SH-SY5Y cells.

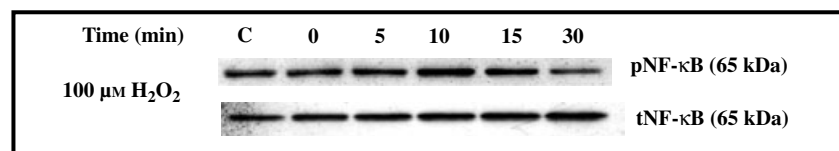
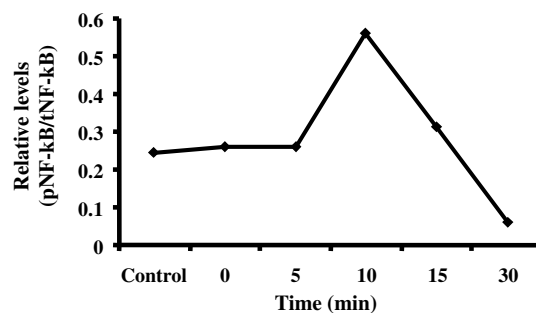


Fig. 3. Effect of time-course on H_2O_2 -induced induction in phosphorylation of NF- κ B (pNF- κ B) in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with $100 \mu M$ H_2O_2 for the indicated times. Control cells (C) were not incubated with H_2O_2 . The alteration of the amount of pNF- κ B and total level of NF- κ B (tNF- κ B) were determined using Western blot analysis. The picture represents one of the three independent experiments. The pNF- κ B and tNF- κ B bands were quantified by densitometry and the changes are represented in the graph.



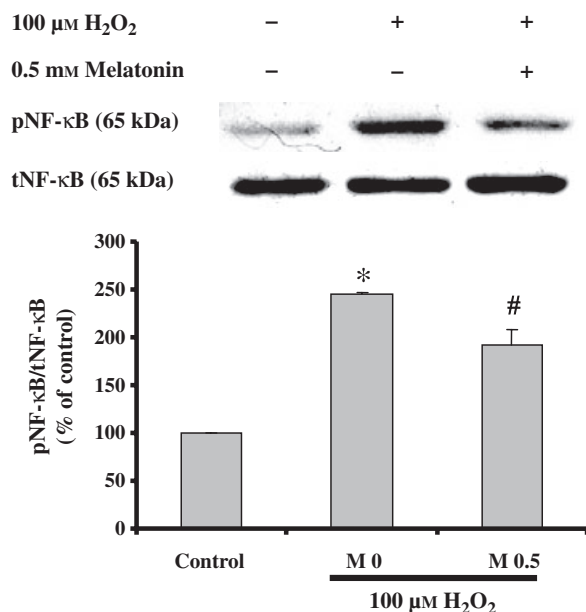


Fig. 4. The effect of melatonin on H_2O_2 -induced induction in phosphorylation of NF- κB (pNF- κB). SH-SY5Y cells were treated with 100 μM H_2O_2 without melatonin (M 0) for 10 min. Some cells were preincubated with 0.5 mM melatonin (M 0.5) for 1 hr prior to incubation with 100 μM H_2O_2 for an additional 10 min. Control cells were incubated in a culture medium for 10 min. The alteration of the amount of pNF- κB and the total level of NF- κB (tNF- κB) was determined using Western blot analysis. Protein bands were quantified by densitometry and the changes are represented in the graph. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M of four independent experiments. The ANOVA was performed for statistical analysis. * $P < 0.001$ compared with control and # $P < 0.01$ compared with H_2O_2 -treated group.

The protective effect of melatonin on H_2O_2 -reduced cell viability was determined in SH-SY5Y cultured cells. The results showed that the higher the melatonin concentration, the greater the decrease in toxic effect of H_2O_2 . Cell viability was significantly increased at 0.01–0.5 mM melatonin. However, melatonin at 1.0 mM had less protective effect on H_2O_2 -treated cells than at 0.5 mM. It seems that the protective effect of melatonin on cell viability in these cultured cells is a biphasic response. Osseni et al. [24], who studied the antioxidant effect of melatonin on human liver cell line HepG2, found that melatonin at low concentrations induced an antioxidant effect and improved cell viability whereas at higher concentrations it led to glutathione depletion, and decreased cell viability. Recently, melatonin has been reported to possess an efficient antioxidant capacity. It is able to directly scavenge a variety of ROS, including hydroxyl radical, singlet oxygen, superoxide anion, peroxy radicals and H_2O_2 [25]. Also, it was found to enhance the activity of antioxidative enzymes such as glutathione peroxidase, superoxide dismutase and glutathione S-transferase [26, 27]. When compared with conventional antioxidants such as vitamins C and E, melatonin is more efficient in scavenging hydroxyl and peroxy radicals in vitro. In addition, melatonin can stabilize cellular membranes, which may help them resist oxidative injury [28]. Melatonin is both lipophilic and

hydrophilic, and easily crosses the plasma membrane entering all parts of cell [29]. Not only melatonin has a direct free radical scavenging properties. It has been demonstrated that melatonin catabolites, N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N -acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), are also effective free radical scavengers. Therefore, some of the protective actions of melatonin could have been a consequence of AFMK and AMK [30–32].

In the present study, the results showed that H_2O_2 -induced induction in phosphorylation of NF- κB at p65 in SH-SY5Y cells was observed within 10 min after treatment. NF- κB is a family of proto-oncogene products. Predominant members of the NF- κB family are RelA (p65) and NF- κB 1 (p50). Although homodimers and heterodimers of other members of the NF- κB family are transcriptionally active, heterodimer formation between p65 and p50 is presumed to be the major biologically active form. NF- κB was initially considered as a proapoptotic factor because of its rapid activation in cells in response to apoptotic signals and its involvement in the expression of some apoptotic genes, including tumor necrosis factor alpha and Fas ligand [33, 34]. Some reports revealed that an anti-apoptotic effect of NF- κB directly counteracts the function of p53 through either competing with co-activator CREB (cyclic AMP responsive element-binding) -binding protein or sequestering p53-binding protein [16]. The regulation of the trans-activation of NF- κB represents another level of control for this transcription factor. Several studies have focused on p65 and its phosphorylation sites. The phosphorylation of these sites is associated with an increase in the transcriptional activity of p65 [35]. In the present study, we examine the molecular mechanism underlying the protective effect of melatonin against H_2O_2 -induced reduction in cell viability by determining the alteration of the amount of NF- κB phosphorylation (pNF- κB) and translocation of pNF- κB using immunoblotting and immunocytochemistry, respectively. Treatment of SH-SY5Y cells with H_2O_2 caused an increase in phosphorylation of NF- κB . On the other hand, this increase was inhibited by melatonin. The results of the histological studies showed that melatonin inhibits H_2O_2 -induced translocation of pNF- κB to perinuclear and endonuclear regions in SH-SY5Y cells.

The activation of NF- κB has been associated with oxidative stress such as ROS including H_2O_2 and its activation is inhibited by a variety of antioxidants [36]. Moreover, it was found that pergolide (a dopamine D1/D2 receptor agonist used in the clinical therapy of PD) can prevent H_2O_2 -induced apoptosis by inhibiting NF- κB nuclear translocation and activation of the p53 signaling pathway [37]. In the inflammatory reaction, it has been demonstrated that NF- κB is activated by cyclo-oxygenase-2 (COX-2). The evidence of inhibition of COX-2 by melatonin could reduce NF- κB activity has also been reported [38]. The activation of NF- κB was also investigated in dimethyl sulfoxide-treated human pre-T cells. The results showed that NF- κB activation is associated with upregulation of nitric oxide synthase (NOS) activity and induction of apoptosis [39]. Bruck et al. [40] studied the protective effect of melatonin against thioacetamide-induced liver damage in rat. Their results showed that melatonin

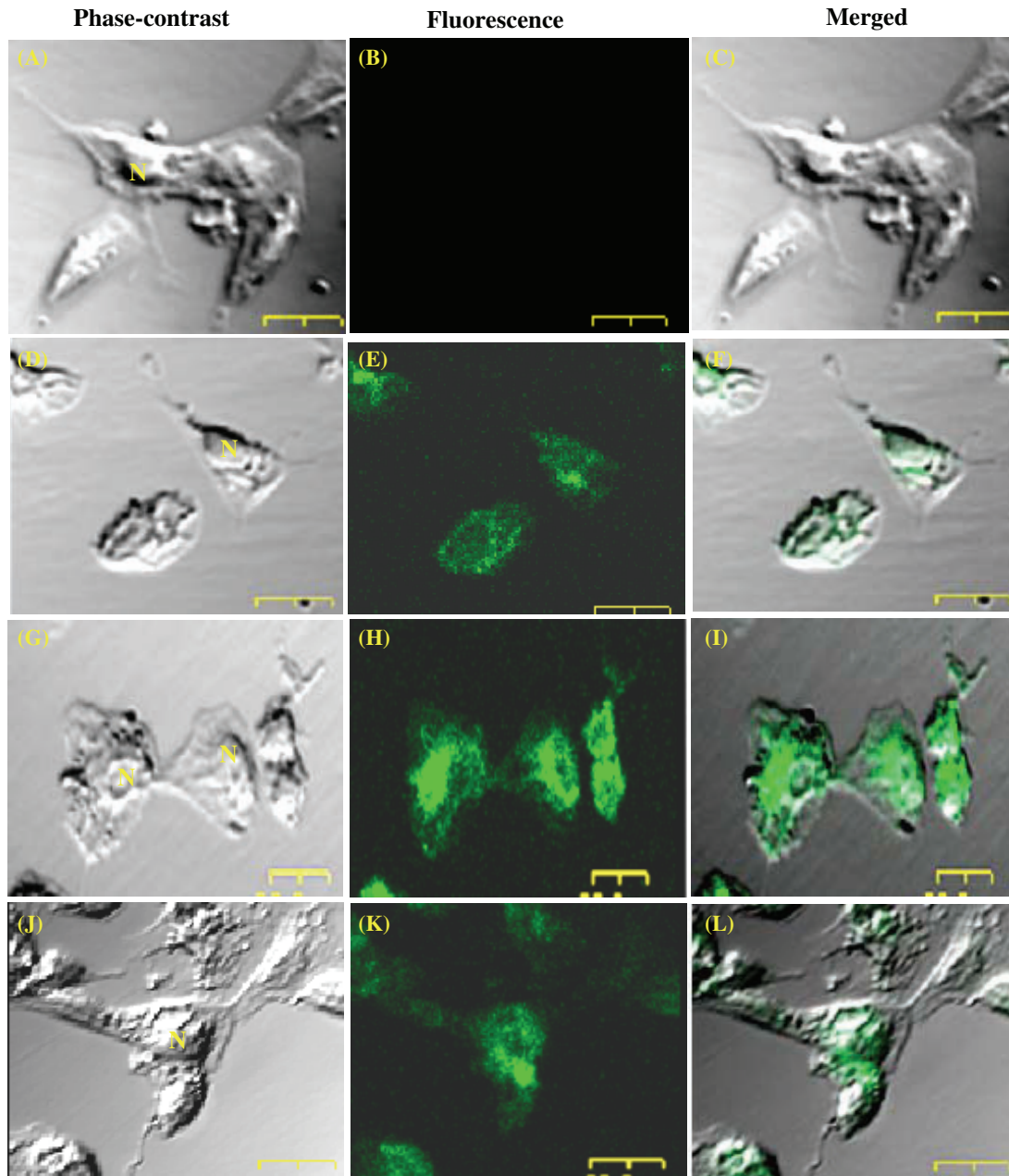


Fig. 5. Imaging microscopic analysis of dopaminergic neurons (SH-SY5Y) demonstrating the effect of melatonin on H_2O_2 -induced induction in pNF- κ B and translocation of pNF- κ B. Phase-contrast and fluorescence images were obtained using confocal microscopy. The unstained or negative-control cell (A–C) was prepared by omitting the primary antibody. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 10 min (D–F). SH-SY5Y cells were treated with H_2O_2 at $100\ \mu\text{M}$ for 10 min (G–I). Some cells were incubated with melatonin for 1 hr prior to incubation with H_2O_2 for another 10 min without changing the culture medium (J–L). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with rabbit polyclonal antibody against pNF- κ B. Green color indicated pNF- κ B-positive immunostaining using FITC-conjugated mouse anti-rabbit IgG. Panels A, D, G and J are phase-contrast images, whereas B, E, H and K are fluorescent images; C, F, I and L are merged phase-contrast and fluorescent images. Scale bars = $20\ \mu\text{M}$, N = nucleus.

improves survival and reduces liver damage, oxidative stress, NF- κ B activation and inducible NOS expression.

Members of the Bcl-2 family of proteins are characterized by their ability to form a complex combination of heterodimers with Bax and homodimers with itself [17]. When Bax, a proapoptotic homologous, is overexpressed in cells, apoptotic death in response to death signals is accelerated. When Bcl-2 is overexpressed, on the other

hand, it heterodimerizes with Bax, and cell death is repressed [41]. In the present study, H_2O_2 treatment resulted in an increase in Bax and Bcl-2 expression of 221% and 155.5%, respectively, when compared with untreated control cells. Whereas, a significant reduction in the increase in Bax (167% of control), but not Bcl-2 (146% of control) level was observed in cells pretreated with melatonin when compared with untreated control cells. It

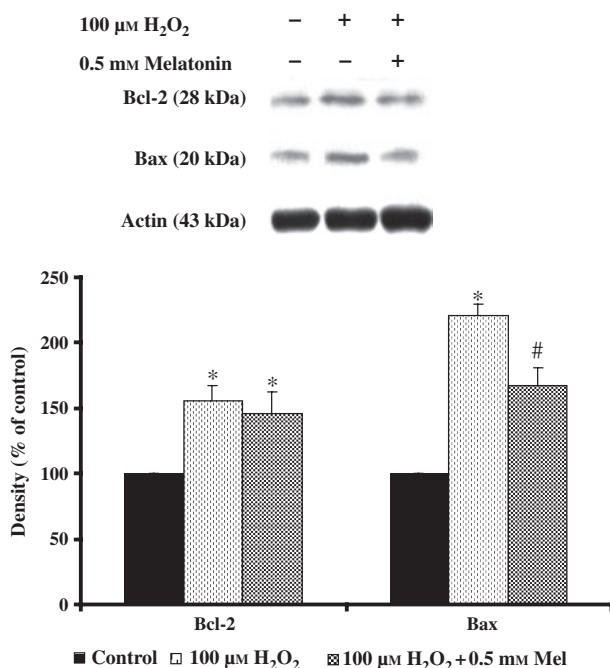


Fig. 6. The effect of H₂O₂ and melatonin on Bcl-2 and Bax expression in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with H₂O₂ at 100 μM for 24 hr. Some cells were incubated with melatonin (Mel) for 1 hr prior to incubation with H₂O₂ for another 24 hr without changing the culture medium. The control-cultured cells were incubated in a culture medium for 24 hr. The alterations of Bcl-2 and Bax proteins expression were determined using Western blot analysis. Protein bands were quantified by densitometry and the changes are represented in the graph. The results are expressed as mean ± S.E.M of five independent experiments. The ANOVA was performed for statistical analysis. **P* < 0.05 compared with control and #*P* < 0.01 compared with H₂O₂-treated cells.

seems that the extreme increase of Bax expression during oxidative stress triggers or activates the death signal. Melatonin protects the cell from oxidative stress by a significant reversal of the induction of Bax expression.

NF-κB has been recognized as an anti-apoptotic transcription factor. It has been shown that NF-κB activates expression of anti-apoptotic Bcl-2 gene [16]. Recently, the activation of NF-κB and increase in the levels of Bax mRNA has been demonstrated in amyloid beta (Aβ)-induced oxidative stress in microglial cells [42]. In addition, it has been reported that melatonin inhibits H₂O₂-induced Bax expression and caspase-3 activation in cultured rat astrocytes [18]. It has been suggested that, under oxidative stress, Bax translocation to the mitochondria may be one of the initiating events in the apoptotic mitochondrial pathway. The apoptotic actions of Bax consist of anchoring to the outer membrane of mitochondria, opening of the mitochondrial permeability transition pore and the release of cytochrome C, which then activates caspase-3 by the apoptosome cytochrome C-dependent complex [43].

The cysteine protease, caspases are considered to play a central role in the apoptotic processes and to trigger the apoptotic cascade of proteolytic cleavage event in mammalian cells [17]. The most widely studied member of the caspase

family, caspase-3, is one of the key executioners of apoptosis that is responsible for the partial or total proteolytic cleavage of many proteins. Recently, Lopez and Ferrer [44] found that the activity of caspase-3 was increased to a high level at 8 hr and peaked at 12 hr after treatment with the protein kinase inhibitors staurosporine and 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine. An increase in the activity of caspase-3 for three- to fivefold after exposure to H₂O₂ has been observed in rat brain astrocytes [18, 45]. The present study also demonstrated that the caspase-3 inhibitor (Ac-DEVD-DHO) reversed the effect of H₂O₂-induced reduction in cell viability in SH-SY5Y cultured cells.

From the results of the present study, we conclude that inducing oxidative stress in SH-SY5Y cells by H₂O₂ may activate intracellular messenger cascades. This activation may affect the induction of phosphorylation of NF-κB. The phosphorylation of NF-κB is associated with an increase in the transcription activity of NF-κB and results in the induction of gene expression (such as Bax and Bcl-2). Extremely high expression of Bax might cause activation of cell death signaling cascade under cytochrome C-caspase mediation. Based on the present results, H₂O₂ appears to activate specific intracellular death-related pathways and the melatonin protects SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced cell damage and death. However, the precise mechanisms leading to the protective effect of melatonin against this oxidative stress-induced neuronal cell degeneration via NF-κB remain to be established.

Acknowledgment

This work was supported by a research grant from the Thailand Research Fund (RSA 4780018).

References

- CASSARINO DS, BENNETT JP, Jr. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative disease: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear response, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 1999; **29**:1–25.
- FRIEDLANDER RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; **348**:1365–1375.
- NISHIDA S, SATO R, MURAI I et al. Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. *J Pineal Res* 2003; **35**:251–256.
- PAGE-MCCAW PS, CHUNG SC, MUTO A et al. Retinal network adaptation to bright light requires tyrosinase. *Nat Neurosci* 2004; **7**:1329–1336.
- TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
- MEKI AR, ESMAIL EEL D, HUSSEIN AA et al. Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. *Toxicol* 2004; **43**:93–100.
- CHEN LJ, GAO YQ, LI XJ et al. Melatonin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. *J Pineal Res* 2005; **39**:34–42.
- BLUM D, TORCH S, LAMBENG N et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; **65**:135–172.

9. FISKUM G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma* 2000; **17**:843–855.
10. CHAN PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**:2–14.
11. MULLER JM, RUPEC RA, BAEUERLE PA. Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 1997; **11**:301–312.
12. MARTINDALE JL, HOLBROOK NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; **192**:1–15.
13. BENI SM, KOHEN R, REITER RJ et al. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J* 2004; **18**:149–151.
14. BAEUERLE PA, HENKEL T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**:141–179.
15. CHEN F, SHI X. Signaling from toxic metals to NF-kappaB and beyond: not just a matter of reactive oxygen species. *Environ Health Perspect* 2002; **110**:807–811.
16. CULMSEE C, MATTSON MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**:761–777.
17. REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**:3225–3236.
18. JUKNAT AA, MENDEZ MDEL V, QUAGLINO A et al. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J Pineal Res* 2005; **38**:84–92.
19. SORG O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol* 2004; **327**:649–662.
20. GILGUN-SHERKI Y, ROSENBAUM Z, MELAMED E et al. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 2002; **54**:271–284.
21. ISCHIROPOULOS H, BECKMAN JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 2003; **111**:163–169.
22. FAHN S, COHEN G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; **32**:804–812.
23. DEL RIO MJ, VELEZ-PARDO C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors. *Biochem Pharmacol* 2002; **63**:677–688.
24. OSSENI RA, RAT P, BOGDAN A et al. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci* 2000; **68**:387–399.
25. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**:1177–1185.
26. RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; **36**:1–9.
27. TOMAS-ZAPICO C, COTO-MONTES A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005; **39**:99–104.
28. GARCIA JJ, REITER RJ, PIE J et al. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**:609–616.
29. TAN DX, HARDELAND R, MANCHESTER LC et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 2003; **34**:249–259.
30. SILVA SO, RODRIGUES MR, CARVALHO SR et al. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res* 2004; **37**:171–175.
31. ONUKI J, ALMEIDA EA, MEDEIROS MH et al. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *J Pineal Res* 2005; **38**:107–115.
32. GUENTHER AL, SCHMIDT SI, LAATSCH H et al. Reaction of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compound, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 2005; **39**:251–260.
33. BALDWIN AS, Jr. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**:649–681.
34. LIU ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 2005; **15**:24–27.
35. SCHMITZ ML, MATTIOLI I, BUSS H et al. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 2004; **5**:1348–1358.
36. CRACK PJ, TAYLOR JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**:1433–1444.
37. UBERTI D, CARSANA T, FRANCISCONI S et al. A novel mechanism for pergolide-induced neuroprotection: inhibition of NF-kappaB nuclear translocation. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**:1743–1750.
38. WU KK. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; **72**:89–93.
39. TRUBIANI O, SALVOLINI E, VIGNINI A et al. NF-kappaB and NOS may play a role in human RPMI-8402 cell apoptosis. *Cell Biol Int* 2005; **29**:529–536.
40. BRUCK R, AEED H, AVNI Y et al. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol* 2004; **40**:86–93.
41. KORSMEYER SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res Suppl* 1999; **59**:1693–1700.
42. JANG MH, JUNG SB, LEE MH et al. Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neurosci Lett* 2005; **380**:26–31.
43. LI P, NIJHAWAN D, BUDIARDJO I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**:479–489.
44. LOPEZ E, FERRER I. Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **85**:61–67.
45. JOU MJ, PENG TI, REITER RJ et al. Visualization of the anti-oxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2004; **37**:55–70.

Melatonin inhibits MPP⁺-induced caspase-mediated death pathway and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cultured cells

Abstract: Neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease are illnesses associated with high morbidity and mortality with few, or no effective, options available for their treatment. In addition, the direct cause of selective dopaminergic cell loss in Parkinson's disease has not been clearly understood. Taken together, several studies have demonstrated that melatonin has a neuroprotective effect both in vivo and in vitro. Accordingly, the effects of melatonin on 1-methyl, 4-phenyl, pyridinium ion (MPP⁺)-treated cultured human neuroblastoma SK-N-SH cell lines were investigated in the present study. The results showed that MPP⁺ significantly decreased cell viability. By contrast, an induction of phosphorylation of c-Jun, activation of caspase-3 enzyme activity, cleavage of DNA fragmentation factors 45 and DNA fragmentation were observed in MPP⁺-treated cells. These changes were diminished by melatonin. These results demonstrate the cellular mechanisms of neuronal cell degeneration induced via c-Jun-N-terminal kinases and caspase-dependent signaling, and the potential role of melatonin on protection of neuronal cell death induced by this neurotoxin.

Jirapa Chetsawang¹, Piyarat Govitrapong^{2,3} and Banthit Chetsawang²

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand; ²Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand; ³Center for Neuroscience and Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, Thailand

Key words: caspase, cleaved DFF45, JNK, melatonin, MPP⁺, neuroprotection, SK-N-SH cells

Address reprint requests to Banthit Chetsawang, Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom 73170, Thailand.
E-mail: grbcs@mahidol.ac.th

Received December 25, 2006;
accepted March 13, 2007.

Introduction

Normal human aging is associated with a progressive loss of nigrostriatal neurons and an age-related exponential increase in Parkinson's disease (PD) [1]. 1-methyl, 4-phenyl, pyridinium ion (MPP⁺), the active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is neurotoxin which selectively destroys catecholaminergic neurons and extremely potent inducers of parkinsonism in humans and animals [2, 3]. Current information suggests that activation of c-Jun-N-terminal kinases [(JNKs) also known as stress-activated protein kinase (SAPK)] and its transcription factor targets are prominent candidate mediators of cell death in response to a wide variety of cellular stressors in neuronal cells [4]. MPP⁺ induces changes in nuclear morphology and nuclear phospho-c-Jun immunoreactivity in dopaminergic neurons of rat mesencephalic cultures has been studied. The results implicate an important role for JNK/SAPK pathways, especially its c-Jun transcriptional target in the death of dopaminergic nigral neuron [5].

Caspases are involved in the apoptotic processes and trigger the apoptotic cascade of the proteolytic cleavage

event in mammalian cells [6]. Caspases that participate in apoptosis are divided into the initiator caspase group (caspase 2, 8, 9, and 10) and the effector caspase group (caspase 3, 6, and 7) [7, 8]. The biochemical and cellular features of apoptosis are induced when executioner caspases cleave their substrates. The most widely studied member of the caspase family, caspase 3, is one of the key executioners of apoptosis that is responsible for the partial or total proteolytic cleavage of many proteins that culminate in the death of cells [9, 10].

Melatonin is synthesized in the pineal gland [11] and has a variety of functions [12–14]. Moreover, the neuroprotective effect of melatonin has been reported both in vivo and in vitro [15–17]. Several studies have shown that melatonin and its metabolites [18] have high potency to prevent astrocytes and neuronal cell death in various parts in brain [19] as well as the PD induced by neurotoxins such as 6-hydroxydopamine (6-OHDA) [20] and MPTP [21]. Increasing evidence demonstrates that MPP⁺ induces neuronal cell death. However, its exact action mechanisms are not clear. To better understand the cellular mechanisms of MPP⁺-induced neuronal cell degeneration via JNK and caspase-dependent signaling,

and the protective roles of melatonin on this cell death. Therefore, in the present study, we used SK-N-SH cells, which are dopaminergic cell lines, to assess the neurotoxic effects of MPP^+ on the cell death, phosphorylation of c-Jun, levels of c-Jun, caspase-3 activity, cleavage of DNA fragmentation factor-45 (DFF45) and DNA fragmentation. In addition, the prevention of this neurotoxin-induced neurotoxicity by melatonin in SK-N-SH cells has also been studied.

Materials and methods

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), penicillin and streptomycin were purchased from Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Melatonin was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). The rabbit polyclonal antibodies against phosphorylated c-Jun (p-c-Jun) at Ser73, c-Jun, Cleaved DFF45 (Asp224) and the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Enhanced chemiluminescent (ECL) Plus Western Blotting Reagent was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). NunclonTM culture flasks and Corning culture plates were obtained from Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark) and Corning Incorporated (Acton, MA, USA), respectively. Human dopaminergic neuroblastoma SK-N-SH cell line was provided from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All other chemicals used in this study were of analytical grade and obtained essentially either from Sigma Aldrich or Lab-scan analytical science (Dublin, Ireland).

SK-N-SH cell cultures

SK-N-SH cells were plated on culture flasks containing the culture medium, which was made in DMEM and 10% FCS. The cultures were maintained at 37°C under 5% CO_2 /95% humidified air incubator for indicated time.

Cell viability assay

SK-N-SH cells were resuspended in 10% FCS-DMEM. Cell suspensions were put into a 96 wells culture plate. Cells were incubated at 37°C under 5% CO_2 /95% humidified air incubator for 24 hr. Cells were then exposed to MPP^+ for 24 hr. In some experiments, melatonin was added to the medium 1 hr prior to incubation with MPP^+ plus melatonin for another 24 hr. Control-untreated cells were incubated with culture medium for 24 hr. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) in Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS) was added to each well and incubation at 37°C for 4 hr. The solution was discarded then the extraction buffer was added. The culture plate was kept in a dark box at room temperature overnight. The optical densities were measured at 560 nm spectral wavelength using microtiter plate reader.

Western immunoblotting

After 3 days, the cultured media were removed from the cultured cells, and the cultures were washed one time with serum free-DMEM (SF-DMEM). Cells were then exposed to 0.1 mM MPP^+ in SF-DMEM and further incubated for 24 hr. In some experiments 1.0 mM melatonin was added to the medium 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP^+ plus melatonin (1.0 mM) for another 24 hr. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 24 hr. The purpose of using SF-DMEM was to avoid the possible manifestation of serum-induced c-Jun expression. After incubation, cultured cells were washed one time with D-PBS. Cells were lysed by adding lysis buffer and scraped off the plate, then the extract was transferred to a microfuge tube. The extracts were sonicated for 10 s and centrifuged for 15 min at 10,000 g. The supernatants were collected and run SDS-PAGE electrophoresis. The protein bands were transferred to nitrocellulose membrane. After transfer, the nitrocellulose membranes were washed with Tris-buffered saline (TBS) for 5 min. Membranes were incubated in Blocking Buffer for 1 hr and washed three times for 5 min each with 0.1% Tween-TBS (TBST). Membranes were then incubated with primary antibodies against phosphorylation of c-Jun at Ser73, c-Jun or C-terminal fragment of DFF45 at 4°C overnight. After incubation, the membranes were washed three times for 5 min each with TBST. Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1 hr following with washed three times for 5 min each with TBST. Western Blots were detected with ECL Plus reagents.

Caspase-3 activity assay

SK-N-SH cells were grown in 96 wells culture plate for 24 hr. SK-N-SH cells were treated with 0.1 mM MPP^+ for 24 hr. Some cells were preincubated with 1.0 mM melatonin 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP^+ plus melatonin (1.0 mM) for another 24 hr. The controls cultured were incubated with culture medium for 24 hr. The cultured media were decanted and cultured cells were washed with PBS. The PBS was removed and the cultured cells were resuspended in cold cell lysis buffer for 30 min on ice. Then, the cell lysates were incubated with caspase-3 fluorogenic substrate (Ac-DEVD-AMC) in HEPES buffer for 1 hr at 37°C. The amount of fluorescent, AMC liberated from fluorogenic substrate was measured using a microtiter plate spectrofluorometer with an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength range of 420–460 nm.

Digital fluorescence imaging microscopy

The cells were grown on glass cover slips and treated with 0.1 mM of MPP^+ for 24 hr. Control-untreated cells were incubated with culture medium for 24 hr. In some experiments, melatonin was added to the medium 1 hr prior to incubation with MPP^+ for another 24 hr without changing the culture medium. The cover slips were washed three times with D-PBS followed by incubation with a fluorescent dye, acridine orange (AO, 5 nM) for 15 min at room temperature. They were washed three times with D-PBS and cover slips were mounted on to microscopic slides using

Trevigen fluorescence mounting medium and observed under digital fluorescence imaging microscopy equipped with Spotlite digital Camera and ImagePro Computer software (Leeds Instruments Co., Minneapolis, MN, USA). Target accentuation and background subtraction computer software was employed to improve the quality of fluorescent images.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Significance was assessed by One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test using the scientific statistic software SigmaStat version 2.03 (Sigma-Aldrich). *P*-values of <0.05 were considered significant.

Results

Cell viability was measured by using MTT assay, which is based on the conversion of MTT to dark blue formazan crystals by mitochondrial dehydrogenase. Exposure to MPP⁺ for 24 hr at 0.1 and 1.0 mM significantly decreased cell survival at $81.85 \pm 2.35\%$ and $65.92 \pm 4.42\%$ respectively, when compared with control cells. The results show the higher concentration of MPP⁺ the greater decrease in cell viability (data not shown). MPP⁺ at 0.1 mM was used to test the toxic effect of MPP⁺-induced cellular signaling cascades leading to cell death.

SK-N-SH cells were treated with MPP⁺ with or without melatonin. Control-cultured cells were treated with the cultured media. Cell viability was determined using MTT assay. The results showed that MPP⁺ at 0.1 mM for 24 hr significantly decreased the cell viability when compared with control-untreated cells. Pretreated cells with melatonin at 0.5, 1.0, and 2.0 mM for 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP⁺ plus melatonin for another 24 hr significantly increased cell viability when compared with MPP⁺-treated cells (Fig. 1). Western immunoblotting was employed to determine the amount of c-Jun phosphorylation, levels of c-Jun protein and cleaved DFF45. The results showed that MPP⁺ at 0.1 mM for 24 hr significantly increased the amount of c-Jun phosphorylation (Fig. 2) and cleaved DFF45 (Fig. 3) and these effects were diminished by melatonin (1.0 mM) (Figs 2 and 3). MPP⁺ at 0.1 mM for 24 hr did not alter the levels of c-Jun protein (Fig. 2) in SK-N-SH cells. The activity of caspase-3 enzyme was determined using fluorometric analysis, which is based on the cleavage of tetrapeptide between aspartic acid residue of caspase-3 substrate (Ac-DEVD) and fluorescent AMC by caspase-3. The fluorescent AMC can be quantified by ultraviolet (UV) spectrofluorometry. MPP⁺ at 0.1 mM for 24 hr significantly enhanced caspase-3 enzyme activity and this effect was abolished by melatonin (1.0 mM) (Fig. 4).

The morphological evaluation of treated cells was determined by staining the cells with fluorescent DNA-binding dye, acridine orange and observing the cells under fluorescence imaging microscopy. The untreated (control) cells exhibited rounded nuclei (Fig. 5A, arrows), while 0.1 mM MPP⁺-treated cells for 24 hr exhibited an irregularly shaped nuclei chromatin or DNA fragmentation (Fig. 5B, arrows). The nuclear DNA fragmentation disap-

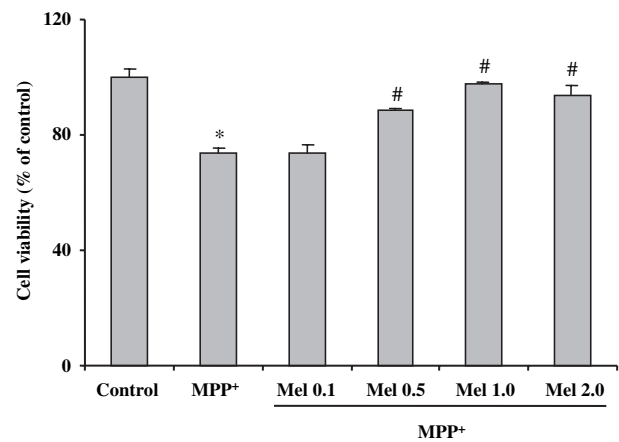


Fig. 1. Inhibitory effect of melatonin on MPP⁺-induced reduction in cell viability in SK-N-SH cultured cells. SK-N-SH cells were incubated with 0.1 mM MPP⁺ for 24 hr. Some cells were preincubated with 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mM melatonin (Mel) 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP⁺ plus melatonin for another 24 hr. The controls cultured were incubated with culture medium for 24 hr. The MTT assay was performed. Results are expressed as percentage of control. Each value represents mean $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. *Significance between control and MPP⁺-treated cells at $P < 0.05$. # Significance between MPP⁺- and MPP⁺ plus melatonin-treated cells at $P < 0.05$.

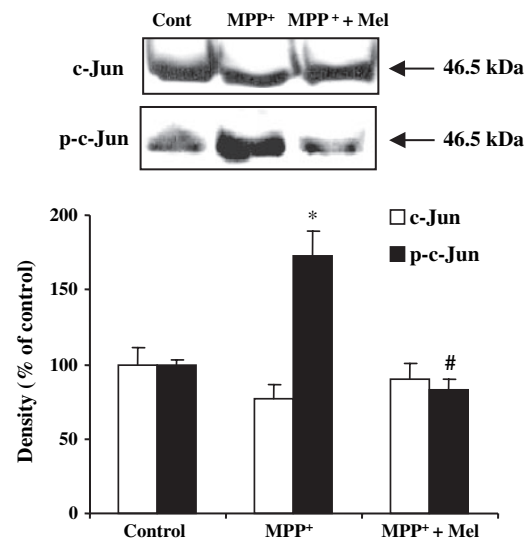


Fig. 2. Effect of MPP⁺ and melatonin mediated phosphorylation of c-Jun (p-c-Jun) and c-Jun levels. SK-N-SH cells were treated with 0.1 mM MPP⁺ for 24 hr. Some cells were preincubated with 1.0 mM melatonin (Mel) 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP⁺ plus melatonin (1.0 mM) for another 24 hr. The controls cultured (Cont) were incubated with culture medium for 24 hr. SK-N-SH cells were lysed and equal amounts of proteins were subjected to immunoblot analysis using antibodies against the phosphorylation form of c-Jun (p-c-Jun) at Ser73 and c-Jun. The p-c-Jun and c-Jun bands were quantified by densitometry and the changes were represented in graph. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. *Significance between control and MPP⁺-treated cells at $P < 0.05$. # Significance between MPP⁺- and MPP⁺ plus melatonin-treated cells at $P < 0.05$.

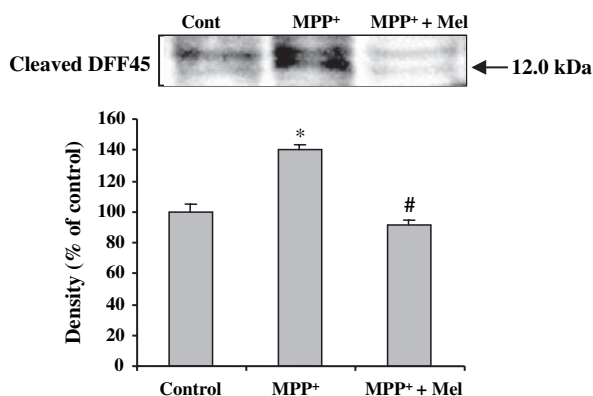


Fig. 3. Effect of MPP⁺ and melatonin mediated cleavage of DFF45. SK-N-SH cells were treated with 0.1 mM MPP⁺ for 24 hr. Some cells were preincubated with 1.0 mM melatonin (Mel) 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP⁺ plus melatonin (1.0 mM) for another 24 hr. The controls cultured (Cont) were incubated with culture medium for 24 hr. SK-N-SH cells were lysed and equal amounts of proteins were subjected to immunoblot analysis using antibody against C-terminal fragment of DFF45. The cleaved DFF45 bands were quantified by densitometry and the changes were represented in graph. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. *Significance between control and MPP⁺-treated cells at $P < 0.05$. # Significance between MPP⁺- and MPP⁺ plus melatonin-treated cells at $P < 0.05$.

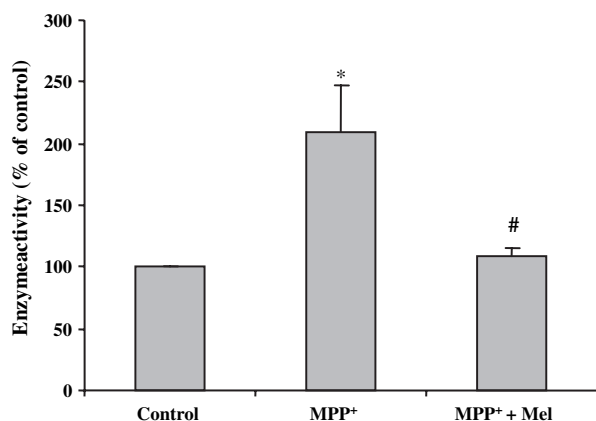


Fig. 4. Effect of MPP⁺ and melatonin on the activity of caspase-3 enzyme. SK-N-SH cells were treated with 0.1 mM MPP⁺ for 24 hr. Some cells were preincubated with 1.0 mM melatonin (Mel) 1 hr prior to incubation with 0.1 mM MPP⁺ plus melatonin (1.0 mM) for another 24 hr. The controls cultured were incubated with culture medium for 24 hr. Caspase-3 activity was analyzed by spectrofluorometric assay. Each value represents mean $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. *Significance between control and MPP⁺-treated cells at $P < 0.05$. # Significance between MPP⁺- and MPP⁺ plus melatonin-treated cells at $P < 0.05$.

peared when SK-N-SH cells were in preincubation with melatonin (1.0 mM) for 1 hr prior to treatment with MPP⁺ at 0.1 mM for an additional 24 hr (Fig. 5C).

Discussion

To determine the causative factors and to delineate the death of dopaminergic nigral neurons, a variety of dopam-

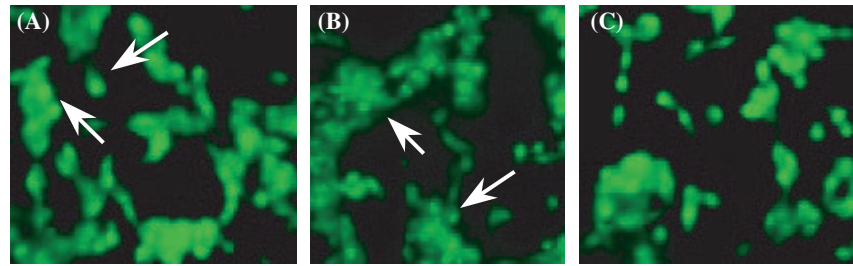
inergic cell lines have been used. In addition, the MPP⁺ has been commonly used as neurotoxin to generate models of PD both in vivo [21] and in vitro [5]. In the present study, we provide evidence of a pivotal role of MPP⁺-induced neurotoxicity in cultured dopaminergic cell lines, SK-N-SH cells. We found that MPP⁺ reduced cell survival, and the toxic effect was dose-dependent. Chun et al. [22] have reported that MPP⁺ at 50 μ M decreased the cell survival of nigral dopaminergic cell line, SN4741 cells, to 75% of control cultures after 24 hr of treatment.

Recently, mounting evidence suggests that phosphorylation of c-Jun (at residues 63 and 73) can be a critical mediation of cell death in the nervous system [23]. In this study, we pinpoint phosphorylation of c-Jun as a key downstream event in MPP⁺ induced SK-N-SH cell death. The results showed that MPP⁺ increased the amount of c-Jun phosphorylation in SK-N-SH cells. However, MPP⁺ did not alter the levels of c-Jun but specially induced changes in the phosphorylation state of this protein. The evidence that the JNK/SAPK pathway mediates dopaminergic toxicity in the MPP⁺ model of PD has been demonstrated in various studies [5, 24]. It has been reported that MPP⁺ activated JNK1/2 MAP kinase and their immediate downstream transcription factors, such as c-Jun. The activated JNK/MAP kinases might induced phosphorylation of c-Jun, which eventually enhance cellular transcriptional activity including genes necessary for death of cell [22].

In the current study, further downstream response cascades of activated c-Jun phosphorylation have been identified. We found that MPP⁺ increased the activation of caspase-3 activity and the levels of cleavage of DFF45 in SK-N-SH cells. DFF45 or ICAD (inhibitor of caspase-activated Dnase) is a caspase-3 substrate that must be cleaved before apoptotic internucleosomal DNA fragmentation can proceed. DFF45/ICAD exists as a complex with a 40-kDa endonuclease termed DFF40, a caspase-activated nuclease or CAD (caspase activated Dnase) that promotes apoptotic DNA fragmentation. DFF45/ICAD serves as both a specific inhibitor of DFF40/CAD and as a molecular chaperon to ensure proper folding of the endonuclease. DFF40/CAD remains inactive while bound to DFF45/ICAD; however, caspase-3 cleaves DFF45/ICAD at two sites, thereby releasing the endonuclease, which then cleaves DNA [10]. In the present study, an appearance of the internucleosomal DNA fragmentation was observed in MPP⁺-treated SK-N-SH cells. They have reported that JNK signaling cascade converges on the phosphorylation of c-Jun. Inhibition of JNK activation by JNK-binding domain (JBD) of JNK-interacting protein-1 (JIP-1) blocks not only cell death but also the cleavage of caspase-9 and caspase-3 in MPTP/MPP⁺-treated dopaminergic neurons [4]. In addition, JNK activation has been reported to induce cytochrome *c* release [25] and to activate the cytochrome *c* and caspase-mediated death pathway [26].

In terms of functional restoration, the inhibition of cell death seems to be superior strategy. Accumulated data have demonstrated an antioxidative role of melatonin on the protection of the oxidative stress-induced cell death during the exposure of MPP⁺ [27–29]. We show here that melatonin prevented the neurotoxicity induced by the neurotoxin.

Fig. 5. The morphological changes of SK-N-SH cells were determined by fluorescence assay using acridine orange staining. The SK-N-SH cells were treated with 0.1 mM MPP⁺ for 24 hr (B) or 0.1 mM MPP⁺ plus 1.0 mM melatonin (C). Panel (A) shows untreated cells. Magnification 400×



Melatonin inhibits decline in cell viability induced by MPP⁺ in SK-N-SH cells. Melatonin is able to reverse the toxic effect of MPP⁺, which leads to the activation of phosphorylation of c-Jun, activation of caspase-3 activity, cleavage of DFF45 and DNA fragmentation in SK-N-SH cells. A possible explanation for the effect of melatonin on reducing the toxic effect of MPP⁺ might be the prevention of MPP⁺-induced formation of reactive oxygen species. When these oxygen species are generated, they can activate the JNK pathway [24] with a subsequent increase in the phosphorylation of c-Jun. It has been demonstrated that MPP⁺-treated human dopaminergic SH-SY5Y cells resulted in increased phosphorylation of MKK4, JNK and c-Jun [4]. Behrens and his colleagues [30] demonstrated that neurons of mutated-mice at the phosphorylation sites of c-Jun were resistant to kainite-induced neuronal apoptosis. It seems retardation of c-Jun-N-terminal kinase signaling pathways especially phosphorylation of c-Jun by melatonin may promote cell survival [31]. It has been demonstrated that melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) have effective antioxidants properties. Therefore, some of the protective actions of melatonin could have been a consequence of its metabolites [32–34].

Based on the present results, we also show here that melatonin prevents the activation of cell death signaling cascade under JNK pathways and caspase-3 mediation induced by neurotoxin. This protective action of melatonin against cell death induced by neurotoxins is an important state of further study. In light of these findings, it is possible that melatonin, by eliminating cell death signaling, may offer a means of treating neuronal degeneration and diseases.

Acknowledgment

This work was supported by a research grant from the Thailand Research Fund (RSA4780018).

References

- INZELBERG R, SCHECHTMAN E, PALEACU D. Onset age of Parkinson disease. *Am J Med Genet* 2002; **111**:459–460.
- CHIUEH CC, MIYAKE H, PENG MT. Role of dopamine autooxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. *Adv Neurol* 1993; **60**:251–258.
- NAKAMURA K, KITAMURA Y, TSUCHIYA D et al. In vitro neurodegeneration model: dopaminergic toxin-induced

apoptosis in human SH-SY5Y cells. *Int Congr Ser* 2004; **1260**:287–290.

- XIA XG, HARDING T, WELLER M et al. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:10433–10438.
- GEARAN T, CASTILLO OA, SCHWARZCHILD MA. The parkinsonian neurotoxin, MPP⁺ induces phosphorylated c-Jun in dopaminergic neurons of mesencephalic cultures. *Parkinsonism Relat Disord* 2001; **8**:19–22.
- REED JC. Bel-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**:3225–3236.
- NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspase: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**:299–306.
- THORNBERRY N, LAZEBNIK YA. Caspase: enemies within. *Science* 1998; **281**:1312–1316.
- ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H et al. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**:43–50.
- SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; **391**:96–99.
- REITER RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **79**:C153–C158.
- REITER RJ. Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News Physiol Sci* 2000; **15**:246–250.
- BENITEZ-KING G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 2006; **40**:1–9.
- WITT-ENDERBY PA, RADIO NM, DOCTOR JS et al. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *J Pineal Res* 2006; **41**:297–305.
- JOU MJ, PENG TI, REITER RJ et al. Visualization of the anti-oxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2004; **37**:55–70.
- ALVIRA D, TAJES M, VERDAGUER E et al. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. *J Pineal Res* 2006; **40**:251–258.
- YIN J, LIU YH, XU YF et al. Melatonin arrests peroxynitrite-induced tau hyperphosphorylation and the overactivation of protein kinases in rat brain. *J Pineal Res* 2006; **41**:124–129.
- TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2007; **42**:28–42.
- REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; **56**:359–384.

20. DABBENI-SALA F, SANTO SD, FRANCESCHINO D et al. Melatonin protects against 6-OHDA induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J* 2001; **15**:164–170.
21. THOMAS B, MOHANAKUMAR KP. Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J Pineal Res* 2004; **36**:25–32.
22. CHUN HS, GIBSON GE, DEGIORGIO LA et al. Dopaminergic cell death induced by MPP⁺, oxidant and specific neurotoxins shares the common molecular mechanism. *J Neurochem* 2001; **76**:1010–1021.
23. MIELKE K, HERDEGEN T. JNK and p38 stresskinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2000; **61**:45–60.
24. CHOI WS, YOON SY, OH TH et al. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS and JNK. *J Neurosci Res* 1999; **57**:86–94.
25. HATAI T, MATSUZAWA A, INOSHITA S et al. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem* 2000; **275**:26576–26581.
26. TOURNIER C, HESS P, YANG DD et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; **288**:870–874.
27. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
28. CHUANG JI, CHEN TH. Effect of melatonin on temporal changes of reactive oxygen species and glutathione after MPP⁺ treatment in human astrocytoma U373MG cells. *J Pineal Res* 2004; **36**:117–125.
29. CHEN LJ, GAO YQ, LI XJ et al. Melatonin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and vitro. *J Pineal Res* 2005; **39**:34–42.
30. BEHRENS A, SIBILIA M, WAGNER EF. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 1999; **21**:326–329.
31. CHETSAWANG B, GOVITRAPONG P, EBADI M. The neuroprotective effect of melatonin against the induction of c-Jun phosphorylation by 6-hydroxydopamine on SK-N-SH cells. *Neurosci Lett* 2004; **371**:205–208.
32. SILVA SO, RODRIGUES MR, CARVALHO SR et al. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res* 2004; **37**:171–175.
33. ONUKI J, ALMEIDA EA, MEDEIROS MH et al. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *J Pineal Res* 2005; **38**:107–115.
34. GUENTHER AL, SCHMIDT SI, LAATSCH H et al. Reaction of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compound, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 2005; **39**:251–260.

The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels

Abstract: Melatonin plays a key role in a variety of important physiological functions including influencing cerebral blood vessels. Therefore, in the present study, we have identified the existence of melatonin receptors and test the effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in bovine cerebral arteries. The results indicate that mt1A melatonin receptor mRNA is expressed in bovine cerebral arteries. The relative levels of mt1A melatonin receptor mRNA expression in anterior, posterior, middle and vertebral cerebral arteries were compared. The data show the highest and lowest levels of mRNA expressions in the middle and vertebral cerebral arteries, respectively. The maximal number ($B_{\max}$) of different types of melatonin receptors in various regions of cerebral arteries were identified and further characterized by using the selective 2-[125 I] iodomelatonin binding assay. Saturation studies revealed that the binding represented a single site of high affinity binding for the melatonin receptor with the highest and lowest binding capacities in the middle and vertebral arteries, respectively. In order to elaborate the functional significance of melatonin in cerebral blood vessels, hydrogen peroxide-induced induction in eNOS protein level and phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (phospho-CaMKII) were demonstrated in the bovine isolated cerebral arteries with these effect being abolished by melatonin. This is the first evidence showing expression of mt1A melatonin receptor in the bovine cerebral arteries. However, further studies are necessary to delineate the role of melatonin and its receptors in regulating physiology of the cerebral vessels.

Prapapun Chucharoen^{1*}, Banthit Chetsawang^{1*}, Chorkaew Putthaprasart¹, Anan Srikiatkachorn² and Piyarat Govitrapong^{1,3}

¹Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom; ²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok; ³Center for Neuroscience and Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Key words: bovine, cerebral arteries, gene expression, melatonin receptors, neuroprotection, nitric oxide synthase

Address reprint requests to Banthit Chetsawang, Neuro-Behavioural Biology Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom 73170, Thailand.
E-mail: grbcs@mahidol.ac.th

*These two authors contributed equally to this work.

Received July 27, 2006;
accepted February 20, 2007.

Introduction

Melatonin is a pineal secretory product that plays a key role in a variety of important physiological responses [1]. High-affinity receptors for melatonin have been localized and characterized in brain as well as in peripheral tissues [2]. Recently, three protein receptor isoforms, which bind with strong affinity to melatonin, MT1, MT2 and MT3 receptors, have been identified [3].

Several lines of evidence suggest an interaction among the melatonins receptor and cerebral blood vessels [4–6]. The first characterization of melatonin receptors in blood vessels was identified using the melatonin analogue 2-[125 I] iodomelatonin. The 125 I-melatonin binding site was found in the smooth muscle layer of large cerebral arteries [4]. Capsoni et al. [7] reported that melatonin receptors in rat cerebral arteries are linked to their second messenger through a pertussis toxin-sensitive G-protein, similar to melatonin receptors in other areas of vertebrate brain. Recently, melatonin has been shown to act on certain

vascular beds. It constricted and potentiated a tractable response to adrenergic stimulation of cerebral arteries [5]. Melatonin constricted cerebral arteries by acting on either MT1 or MT2 receptors. In addition, melatonin inhibited induction of adenylate cyclase activity and vasodilatation is mediated by calcitonin gene-related peptide in cerebral artery [6]. However, the distribution of specific melatonin receptors throughout the cerebral vasculature has not been demonstrated.

Reactive oxygen species (ROS), including superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, and reactive nitrogen species, such as nitric oxide and peroxynitrite, are biologically important derivatives that are increasingly demonstrated to be important in vascular biology through their oxidation/reduction (redox) potentials. All vascular cell types produce ROS, primarily via cell membrane associated nicotinamide adenine dinucleotide phosphate [reduced form (NADPH)] oxidase. ROS regulate vascular function by modulating cell growth, apoptosis, migration, inflammation, secretion, and protein production [8].

Hydrogen peroxide is capable activating NADPH oxidase and reducing the activity of antioxidant enzymes, copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD), but may also increase the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [9]. Nitric oxide (NO), which is the product of eNOS, is a potent vasodilator and an inhibitor of platelet aggregation and leukocyte adhesion [10]. During cerebral ischemia, increases in NO concentration and NOS activity have been documented [10–13].

Numerous studies, both in vivo and in vitro models, have documented the neuroprotective role of melatonin against oxidative stress induced neurodegeneration [14, 15]. Melatonin has been documented to reduce NO production by inhibiting NOS activity [16]. However, the inhibitory role of melatonin on oxidative stress-induced eNOS expression in cerebral blood vessel has not been documented. Therefore, the present study has attempted to identify melatonin receptor subtypes by using a reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and the characterize different types of melatonin receptors by radioligand binding assay in bovine cerebral arteries. In addition, the effect of melatonin on oxidative stress-induced increase in eNOS expression in bovine cerebral arteries has also been determined.

Materials and methods

Animals

Cows (*Bos taurus*) aged between 6 and 12 months were used. Animals were sacrificed between 09:00–10:00 hr at a local slaughterhouse; brain cerebral arteries were dissected from freshly obtained and separated for anterior, posterior, middle and vertebral cerebral arteries. The small blood vessels were separated on the base of frontal, parietal, temporal and occipital lobes. The samples were used immediately for RNA isolation.

Amplification of melatonin receptor transcript

The bovine cerebral arteries from two animals were pooled and total RNAs were extracted by a modification of the guanidine isothiocyanate–phenol–chloroform method using TRIzol reagent (Gibco BRL, Bethesda, MD, USA). The RT-PCR was performed from the deoxyribonucleaseI (DNaseI; Life technology, Gaithersburg, MD, USA) treated-total RNAs in the master mixture containing 1x PCR buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.1% Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 25 pmol each of oligonucleotide primers coding for the *Bos taurus* mt₁A melatonin receptor: sense primer 5' CTG CCA CAG CCT CAG ATA CA' and antisense primer 5' GAG CAT CGG AAC GAT GAA AT 3', 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and 4 units of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega). The mixture was incubated in a thermocycler for 30 min at 42°C for RT-catalyzed first-strand cDNA synthesis, and then followed by repetitive cycles of thermal cycling (30 s at 94°C, 60 s at 55°C and 30 s at 72°C). The final cycle was followed by a 5-min extension step at 72°C to ensure that the amplified DNA was double stranded before reducing the temperature to 4°C for

storage. The suitable condition for semi-quantitative RT-PCR of mt₁A melatonin receptor was generated from 0.5 μ g of total RNA at 30 cycles. This condition is remaining in the linear range of amplification.

Membrane preparations

The bovine cerebral arteries from four to six animals were pooled and homogenized in 10 volumes (w/v) of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 2 mM EDTA and 5 mM of MgCl₂ with a tissue homogenizer (Ultra turrax T25; IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) setting at a moderate speed (13,500 rpm) for 15 s. The homogenate was centrifuged at 900 g for 10 min at 4°C in a refrigerated centrifuge (Doupont, Sorvall RC26 plus, Newtown, CT). The supernatant were further centrifuged at 40,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant was decanted and the membrane pellet was resuspended in 20 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), homogenized and centrifuged at 40,000 g for 20 min. The supernatant was discarded and the final membrane pellet was kept frozen at –80°C until used, usually within 2 wk.

2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding assay

The membrane pellet was resuspended in 5 mL of ice cold 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (containing 5 mM MgCl₂) and homogenized for 15 s with a homogenizer (Ultra turrax T25) setting at a moderate speed (13,500 rpm). Membrane suspensions were incubated for 2 hr at 37°C in 0.25 mL (final volume) of 50 mM Tris-HCl containing 5 mM of MgCl₂, at pH 7.40, with 2-[¹²⁵I]iodomelatonin (2200 Ci/mmol; Amersham, Buckinghamshire, England) 0.02–1.0 nM in the absence or presence of melatonin (10 μ M), which determined the nonspecific binding. After incubation, reactions were terminated by rapidly filtering the reaction mixture through Whatman GF/B filters under vacuum. The filters were washed twice with 3 mL of ice cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), dried and the receptor-bound radioactivity trapped on the filters was counted in a gamma counter (Auto-Gamma 5000 series; Packard, Downer Grove, IL). Saturation curves were analyzed by the nonlinear least-squared regression analysis computer program, LIGAND. $B_{\max}$ and K_d were obtained. The specific (¹²⁵I) iodomelatonin binding accounted for 60–70% the total binding.

Western immunoblotting

Cerebral blood vessels (Circle of Willis and basilar artery) from two animals were dissected from bovine brain and placed onto a dissecting disc immersed in Krebs–Henseleit (K-H) solution. The blood vessels were pooled and carefully cleaned and divided into ring segments of 2–3 mm in length. The ring segments of blood vessel were incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 1% fetal bovine serum at 37°C for 2 hr in the absence (control) or presence of hydrogen peroxide (H₂O₂). Some ring segments of blood vessel were pre-incubated with melatonin for 1 hr prior to treatment with H₂O₂ for an additional 2 hr at 37°C. After incubation, the ring segments of blood vessel were homogenized for 10 s with a tissue

homogenizer in lysis buffer. The homogenate was centrifuged at 4°C for 15 min at 10,000 g. The supernatant was collected and 15.0–20.0 µg proteins was subjected to SDS-PAGE electrophoresis. The protein bands were electroblotted to nitrocellulose membrane using 50 mA current strength for 1.5 hr at 4°C. The transfer efficiency was detected by Ponceau-S red solution. The nitrocellulose membranes were washed with Tris-buffered saline (TBS) for 5 min, incubated in Blocking Buffer (1X TBS, 0.1% Tween-20 and 5% nonfat dry milk) for 1 hr, washed three times for 5 min each with TBST (0.1% Tween-TBS) and incubated in mouse monoclonal antibodies against eNOS (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) or actin (Chemicon, Temecula, CA, USA), or rabbit antibodies against phospho-CaMKII at threonine286 or CaMKII (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) at 4°C overnight. After incubation, they were washed three times for 5 min each with TBST, incubated in peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory, Inc., West Grove, PA, USA) for 1 hr followed by washing three times for 5 min each with TBST. The blots were developed with Chemiluminescent ECL Plus Western Blotting detection reagents. The immunoblots were quantified by measuring the density of each band using densitometry with Scion image program (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Determination of protein

The concentration of protein was determined by the method of Bradford [17], using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Semi-quantitative RT-PCR for MT1 gene expressions were performed by using RNA from various cerebral arteries. The results from experiments were statistically analyzed. Variations among different groups obtained from RT-PCR, radioligand binding or western blot were analyzed by ANOVA or Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test. A level of significance between groups was taken to be $P < 0.05$ unless noted otherwise.

Results

A single PCR product of the expected size (217 bp) was detected on the amplification of RNA prepared from the bovine cerebral artery (Fig. 1). Nucleotide sequencing done by using an automated fluorescent DNA sequencing confirmed that 217 bp cDNA fragment with the exclusion of amplicon bases, encode sequences which are identical (97%) to nucleotides 170–363 of published *Bos Taurus* melatonin receptor 1a (MTNR1A) mRNA sequence (GenBank Accession Number: U73327) (data not shown). This product was also apparent when cerebral artery was amplified. The results of RT-PCR experiments comparing the relative amount of mt₁A mRNA expressed in bovine cerebral arteries isolated from anterior (Ant), posterior (Post), middle (Midd) and vertebral (Vert) cerebral arteries are shown in Fig. 2A. The comparisons among results from

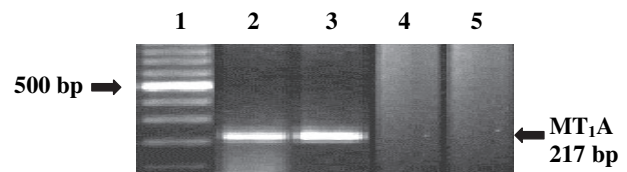


Fig. 1. The reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) products of MT₁A mRNA from bovine circle of Willis and separated on 2% agarose gel electrophoresis. The size of MT₁ bovine Circle of Willis mRNA RT-PCR product was 217 bp. Lane 1: 100 bp DNA ladders. Lanes 2,3: duplicate RT-PCR products of the bovine Circle of Willis MT₁A specific primers. Lane 4: negative control (The reverse transcriptase enzyme was omitted in the RT-PCR reaction mixture). Lane 5: reaction control (The RNA template was omitted in the RT-PCR reaction mixture), respectively.

different experiments are expressed as average of mt₁A expression. The expression was highest on middle and lowest in vertebral cerebral arteries (Fig. 2B). However, amplification of small vessel RNAs in the frontal, parietal, occipital and temporal lobe failed to generate any detectable PCR product (data not shown).

Analysis of the data obtained from the saturation study indicates the presence of a single binding site of 2-[¹²⁵I] iodometatonin in bovine cerebral artery (Fig. 3). The K_d values of 2-[¹²⁵I] iodometatonin binding site in anterior, posterior, middle and vertebral cerebral arteries were 32.0 ± 0.8 , 33.0 ± 0.2 , 36.0 ± 0.6 and 26.0 ± 0.9 pM, respectively. The B_{max} values of 2-[¹²⁵I] iodometatonin binding site in anterior, posterior, middle and vertebral cerebral arteries were 18.0 ± 0.4 , 18.0 ± 0.4 , 21.0 ± 0.4 and 14.0 ± 0.5 fmol/mg protein, respectively (Table 1). The B_{max} value of 2-[¹²⁵I] iodometatonin binding site of middle cerebral artery was highest compared with other cerebral arteries. Whereas, the lowest B_{max} value of 2-[¹²⁵I] iodometatonin binding site was observed in vertebral cerebral artery (Table 1).

The levels of eNOS, CamKII and phospho-CaMKII proteins in bovine cerebral artery were determined using Western blot analysis. Hydrogen peroxide at 100 µM for 2 hr significantly increased eNOS protein levels in bovine cerebral artery when compared with control-untreated artery. Pretreated bovine cerebral artery with melatonin at 0.5, 1 and 2 mM for 1 hr prior to treatment with 100 µM H₂O₂ for 2 hr significantly reduced induction of eNOS expression when compared with H₂O₂-treated artery without melatonin (Fig. 4). H₂O₂ at 100 µM for 2 hr significantly increased the amount of phospho-CaMKII/CaMKII when compared with control untreated cells. Preincubation with melatonin at 0.5, 1.0 and 2.0 mM for 1 hr prior to treatment with H₂O₂ significantly reduced the amount of phospho-CaMKII/CaMKII in SH-SY5Y cells when compared with H₂O₂-treated cells without melatonin (Fig. 5).

Discussion

The cDNA encoding a melatonin receptor was first isolated using mRNA from the *Xenopus laevis* melanophore [18]. This cDNA encodes a high-affinity 2-[¹²⁵I] iodometatonin binding protein of 420 amino acid with seven hydrophobic

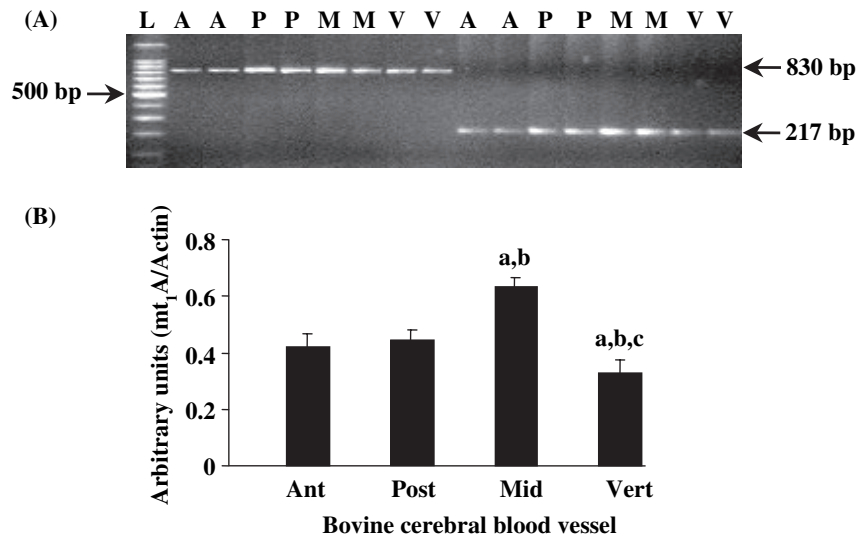


Fig. 2. (A) Gel electrophoresis of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) products from bovine cerebral blood vessel mRNAs. The products were analyzed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The size of RT-PCR products of actin and mt₁A receptor is 830 and 217 bp, respectively. L is 100 bp DNA ladders. A, P, M and V is anterior-, posterior-, middle- and vertebral cerebral artery, respectively. (B) The DNA bands were quantified by densitometry and changes were represent in graph. RT-PCR products of mt₁A are expressed as a ratio of mt₁A/actin RT-PCR products. Each value represents mean $\pm$ S.E.M. of six independent experiments. Ant, Post, Mid and Vert is anterior-, posterior-, middle- and vertebral cerebral artery, respectively. Statistical significance of the data was determined by ANOVA followed by comparisons using Tukey's method; a: statistically different from Ant ($P < 0.001$), b: statistically different from Post ($P < 0.01$), c: statistically different from Mid ($P < 0.001$).

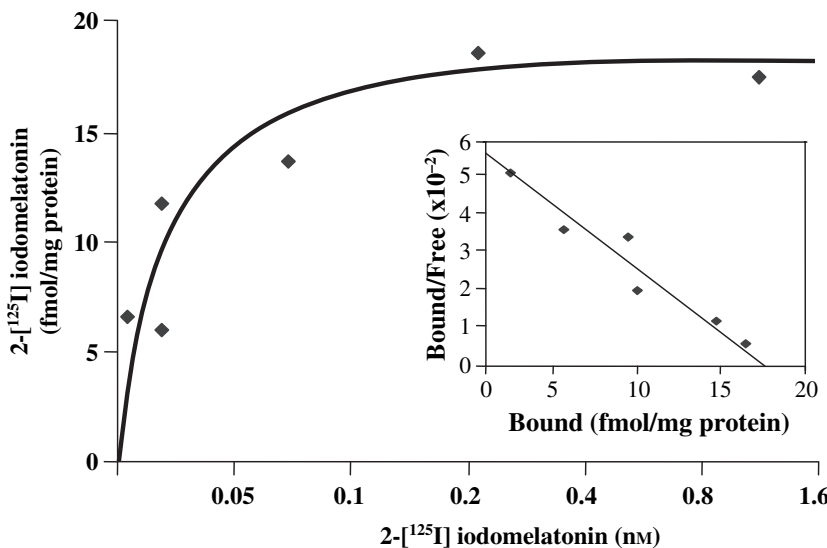


Fig. 3. Saturation curve and Scatchard analysis (inset) of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding to isolate bovine cerebral blood vessel membranes. The experiment was carried out using 2-[¹²⁵I] iodomelatonin concentrations ranging from 0.02–1.0 nM. The plot represents the specific binding of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin. The data were analyzed by using the LIGAND program. The result provides a dissociation equilibrium constant (K_d) value of 30 pM and a maximum receptor density (B_{max}) value of 17.0 fmol/mg protein values. The data presented are from a representative experiment in which all points were determined in duplicate.

transmembrane domains. The cloning of cDNAs encoding the human and sheep high-affinity melatonin receptor was also reported [19]. The cDNA encoding melatonin receptors have been characterized in many tissues including rat tail arteries [20] and rat arteries forming the circle of Willis at the base of the brain [4, 7]. Both mt₁ and mt₂ melatonin receptors are expressed in neural tissue whereas blood vessels contain only the mt₁ receptor subtype. In order to identify and characterize the regional specificity of mRNA expression and receptor binding sites of mt₁A melatonin receptor in bovine cerebral artery. The cerebral artery was divided into four sections; anterior-, posterior-, middle- and vertebral arteries. The results of our studies indicate that the mRNAs encoding mt₁A receptors are expressed in the

bovine cerebral arteries. The lowest level of mt₁A receptor mRNA expression occurred in the vertebral cerebral artery and the highest level occurred in the middle cerebral artery.

We have also identified the presence of melatonin receptor in bovine cerebral artery membranes by 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding assay. The binding in bovine cerebral arteries was saturable which correlated with several previous studies [4]. Capsoni et al. [7] characterized the melatonin receptors in rat brain arteries forming the circle of Willis, and demonstrated that melatonin at nanomolar concentration was able to inhibit forskolin-stimulated cAMP production in rat circle of Willis. This result indicated that melatonin receptors in rat cerebral arteries are linked to their second messenger through a pertussis

Table 1. Summary of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding to melatonin receptors in bovine cerebral blood vessel membranes

Membrane	K _d (pM)	B _{max} (fmol/mg protein)
Anterior cerebral artery	32.0 ± 0.8	18.0 ± 0.4
Posterior cerebral artery	33.0 ± 0.2	18.0 ± 0.4
Middle cerebral artery	36.0 ± 0.6	21.0 ± 0.4 ^{a,b}
Vertebral cerebral artery	26.0 ± 0.9	14.0 ± 0.5 ^{a,b,c}

Each value represents mean ± S.E.M. of four independent experiments. Statistical significance of the data was determined by ANOVA followed by comparisons using Tukey's method; ^astatistically different from anterior ($P < 0.001$), ^bstatistically different from posterior ($P < 0.01$), ^cstatistically different from middle ($P < 0.001$).

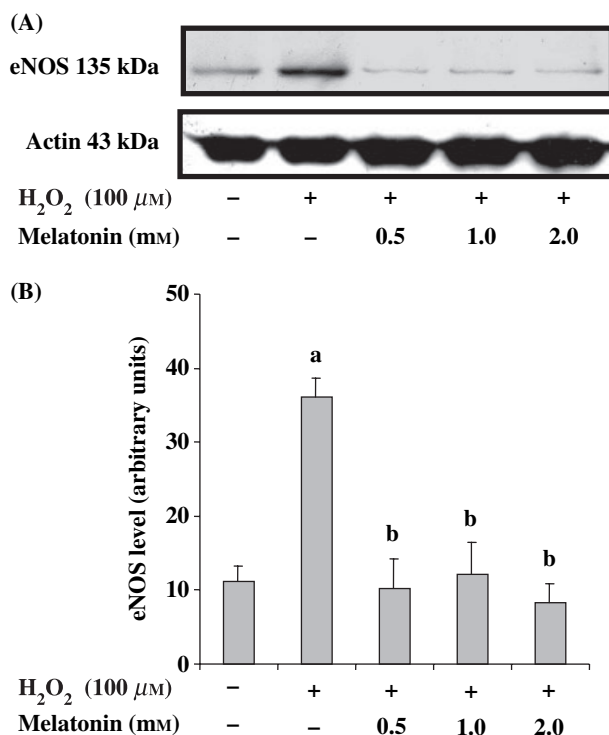


Fig. 4. (A) Effect of hydrogenperoxide (H₂O₂) and melatonin on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in explant cultured of ring segments of bovine cerebral artery assessed by Western blot analysis using mouse monoclonal antibodies against eNOS and actin. The cultured arteries were exposed to H₂O₂ at 100 μM for 2 hr at 37°C or pretreated with melatonin at 0.5 (M 0.5), 1.0 (M 1.0) and 2.0 (M 2.0) mM for 1 hr at 37°C and then 100 μM H₂O₂ was added and the cultured arteries were incubated for another 2 hr at 37°C. The control-cultured arteries were incubated with cultured medium for 2 hr at 37°C. (B) The eNOS bands were quantified by densitometry and the changes were represented in graph. Results are expressed as mean ± S.E.M. of four independent experiments. One-way analysis of variance and Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test was performed for statically analysis. The letter 'a' and 'b' denote significance between control- and H₂O₂-treated arteries at $P < 0.01$ and, H₂O₂- and H₂O₂ plus melatonin-treated arteries at $P < 0.01$, respectively.

toxin-sensitive G-protein, similar to melatonin receptors in different areas of vertebrate brain. 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding site in bovine cerebral arteries was demonstrated for the first time in the present study. The data indicate the presence of a single high affinity binding of bovine cerebral

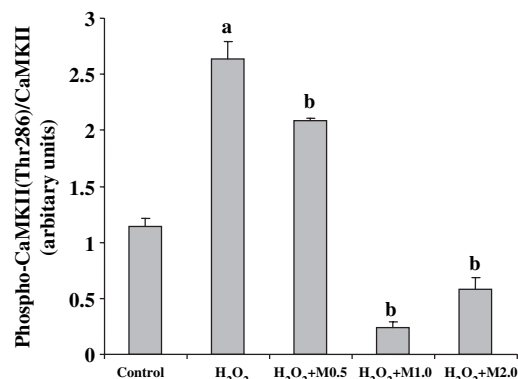
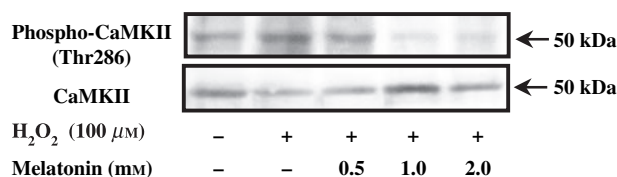


Fig. 5. Effect of H₂O₂ and melatonin on phosphorylation of CaMKII (phospho-CaMKII) in explant cultured of ring segments of bovine cerebral artery assessed by Western blot analysis using rabbit antibodies against phospho-CaMKII and CaMKII. The cultured arteries were exposed to H₂O₂ at 100 μM for 2 hr at 37°C or pretreated with melatonin at 0.5 (M 0.5), 1.0 (M 1.0) and 2.0 (M 2.0) mM for 1 hr at 37°C and then 100 μM H₂O₂ was added and the cultured arteries were incubated for another 2 hr at 37°C. The control-cultured arteries were incubated with cultured medium for 2 hr at 37°C. The phospho-CaMKII and CaMKII bands were quantified by densitometry and the changes were represented in graph. Results are expressed as mean ± S.E.M. of four independent experiments. One-way analysis of variance and Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test was performed for statically analysis. ^a $P < 0.01$ compared with control and ^b $P < 0.05$ compared with H₂O₂-treated group.

arteries. The dissociation equilibrium constant and the maximum number of receptor values are comparable to the previous reports [4]. Savaskan et al. [21] studied in vascular MT₁ immunoreactivity in human as well as in Alzheimer's brain, showed that MT₁ are located in the adventitia of the vessel walls and not in the smooth muscle cells. Endothelial cells did not show MT₁ staining. In addition, the finding of increased vascular MT₁ immunoreactivity in Alzheimer patients by this group suggests an important role for melatonin in regulating regional blood flow. The up-regulation of vascular MT₁ receptor may represent a compensatory mechanism to overcome the impaired melatonin levels reported for Alzheimer's disease [22]. It is also noteworthy that nocturnal melatonin secretion is impaired in stroke and migraine patients [23, 24]. This line of evidence may lead to better understanding of the cerebrovascular protective role of melatonin.

Endogenous NO is generated from arginine by a family of at least three distinct isoforms of NOS enzymes. Neuronal NOS (nNOS) and eNOS are expressed constitutively, and their activity is regulated by local calcium/calmodulin concentrations. Whereas, inducible NOS (iNOS) which is present in neurons, vascular cells, and glia, produces NO independently of calcium concentrations [25–27]. While NO normally functions as a

physiological neuronal mediator, excess production of NO mediates brain injury. Overactivation of glutamate receptors associated with cerebral ischemia and other excitotoxic processes results in massive release of NO. As a free radical, NO is inherently reactive and mediates cellular toxicity by damaging critical metabolic enzymes and by reacting with superoxide to form an even more potent oxidant, peroxynitrite. On basis of these mechanisms, NO appears to play a major role in the pathophysiology of neurodegenerative disorders such as stroke, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis [28]. There is now evidence that oxidative injury can induce endothelial cell damage [29, 30] and up-regulation of eNOS expression in cerebral blood vessels [12]. In addition, the protective effects of melatonin against ROS induced DNA damage and cell death of bovine cerebral endothelial cells has been documented [29]. It has been demonstrated that not only melatonin but its metabolites, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), and N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), are also effective free radical scavengers. Therefore, some of the protective actions of melatonin could have been a consequence of its metabolites [31, 32].

In the current study, we examined the inhibitory effect of melatonin against oxidative stress-induced eNOS protein expression in bovine cerebral artery. Our results show that hydrogen peroxide, which is pro-oxidizing agent, increased eNOS protein levels in cultured bovine cerebral arteries and this effect was abolished by melatonin. The inhibitory effect of melatonin on NOS activity has been reported both in *in vivo* and *in vitro* studies [16, 33]. In addition, the postulate mechanism that H₂O₂ mediates an induction of eNOS levels was identified in the present study. Recent evidence has demonstrated that H₂O₂ upregulates the expression of eNOS mRNA via a CaMKII-mediated mechanism in bovine aortic endothelial cells cultured [34, 35]. From the results of the present study, it seems that H₂O₂-induced increase in the levels of eNOS via CaMKII activation, especially increasing phosphorylation state of this protein kinase. Melatonin inhibits this effect by attenuating CaMKII activation via direct scavenging hydrogen peroxide [36]. However, the mechanism underlying the inhibitory role of melatonin on H₂O₂-induced increases in the levels of eNOS in bovine cerebral artery remains to be fully elucidated.

At present, therapeutic applications of melatonin has been indicated in many conditions including sleeping disorders, circadian rhythm disorders, insomnia in blind people, insomnia in elderly patients, ageing and in a variety of neurodegenerative diseases [37]. It has been reported that nocturnal melatonin excretion is lower in patients with ischemic stroke [38] and rats deficient in melatonin sustained greater brain damage after stroke [39]. It seems reduction in melatonin levels may be detrimental and provoke cerebrovascular disease. In light of present results in inhibition of hydrogen peroxide-induced eNOS expression by melatonin in bovine cerebral blood vessel, we hypothesize that melatonin may have a role in the biological regulation of cerebrovascular disease probably via its effect on the NO. Additional pathway for a more specific role of melatonin on pathophysiology of cerebrovascular

disease is the discovery of new receptors for the melatonergic system. Further studies are necessary for a better understanding of the role of melatonin in the pathophysiology and treatment of cerebrovascular disease. Melatonin plays an important role in toxic free radical scavenging, NOS activity inhibition and neurovascular regulation, offering a new paradigm for studying pathophysiology and treatment of conditions that involve free radicals.

Acknowledgment

The authors greatly acknowledge the Thailand Research Fund for supporting the research grants to A.S. (BRG7/2544) and B.C. (RSA4780018).

References

1. REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151–180.
2. MORGAN PJ, BARRETT P, HOWELL HE et al. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994; **24**:101–146.
3. NOSJEAN O, NICOLAS JP, KLUPSCH F et al. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT₁, MT₂ and MT₃/QR₂. Tissue distribution of MT₃/QR₂. *Biochem Pharmacol* 2001; **61**:1369–1379.
4. VISWANATHAN M, LAITINEN JT, SAAVEDRA JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**:6200–6203.
5. REGRIGNY O, DELAGRANGE P, SCALBERT E et al. Effects of melatonin on rat pial arteriolar diameter *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1999; **127**:1666–1670.
6. VISWANATHAN M. Melatonin inhibits calcitonin gene-related peptide-induced vasodilation and increase in cAMP in rat middle cerebral arteries. *Eur J Pharmacol* 2001; **415**:247–250.
7. CAPSONI S, VISWANATHAN M, DE OLIVERIA AM et al. Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology* 1994; **135**:373–378.
8. TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; **122**:339–352.
9. HA MK, CHUNG KY, BANG D et al. Proteomic analysis of the proteins expressed by hydrogen peroxide treated cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Proteomics* 2005; **5**:1507–1519.
10. IADECOLA C. Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:3913–3916.
11. NIWA M, INAO S, TAKAYASU M et al. Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Med Chir* 2001; **41**:63–72.
12. VELTKAMP R, RAJAPAKSE N, ROBINS G et al. Transient focal ischemia increase endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood vessels. *Stroke* 2002; **33**:2704–2710.
13. PEI Z, FUNG PCW, CHEUNG RTF. Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain barrier breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res* 2003; **34**:110–118.
14. CHEN LJ, GAO YQ, LI XJ et al. Melatonin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial DNA oxidative damage *in vivo* and *in vitro*. *J Pineal Res* 2005; **39**:34–42.

15. ALVIRA D, TAJES M, VERDAGUER E et al. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. *J Pineal Res* 2006; **40**:251–258.
16. BETTAHI I, POZO D, OSUNA C et al. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 1996; **20**:205–210.
17. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248–254.
18. EBISA T, KARNE S, LERNER MR et al. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**:6133–6137.
19. REPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; **13**:1177–1185.
20. TING KN, BLAYLOCK NA, SUGDEN D et al. Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol* 1999; **127**:987–995.
21. SAVASKAN E, OLIVIERI G, BRYDON L et al. Cerebrovascular melatonin MT1-receptor alterations in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; **308**:9–12.
22. WU YH, SWAAB DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 2005; **38**:145–152.
23. BRUN J, CLAUSTRAT B, SADDIER P et al. Nocturnal melatonin excretion is decreased in patients with migraine without aura attacks associated with menses. *Cephalalgia* 1995; **15**:136–139.
24. FIORINA P, LATTUADA G, PONARI O et al. Impaired nocturnal melatonin excretion and changes of immunological status in ischaemic stroke patients. *Lancet* 1996; **347**:692–693.
25. SZABO C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 1996; **41**:131–141.
26. YUN HY, DAWSON VL, DAWSON TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 1996; **10**:291–316.
27. IADECOLA C, ROSS ME. Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **835**:203–217.
28. BREDT DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999; **31**:577–596.
29. SHAIKH AY, XU J, WU Y et al. Melatonin protects bovine cerebral endothelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and death. *Neurosci Lett* 1997; **229**:193–197.
30. CHOI YJ, LEE MK, LEE YJ et al. Inhibition of hydrogen peroxide-induced endothelial apoptosis by 2',4',7-trihydroxyflavanone, a flavonoid form. *J Med Food* 2004; **7**:408–416.
31. ONUKI J, ALMEIDA EA, MEDEIROS MH et al. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *J Pineal Res* 2005; **38**:107–115.
32. GUENTHER AL, SCHMIDT SI, LAATSCH H et al. Reaction of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compound, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 2005; **39**:251–260.
33. POZO D, REITER RJ, CALVO JR et al. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997; **65**:430–442.
34. CAI H, DAVIS ME, DRUMMOND GR et al. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinaseII/Janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**:1571–1576.
35. CAI H, MCNALLY JS, WEBER M et al. Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 2004; **37**:121–125.
36. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**:1177–1185.
37. BUDENIK GA, BLASK DE, BROWN GM et al. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol Signals Recept* 1998; **7**:195–219.
38. FIORINA P, LATTUADA G, PONARI O et al. Impaired nocturnal melatonin excretion and changes of immunological status in ischemic stroke patients. *Lancet* 1996; **347**:692–693.
39. MANEV H, UZ T, KHARLAMOV A et al. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J* 1996; **10**:1546–1551.

บทความสำหรับการเผยแพร่

ในปัจจุบันมีความตื่นตัวกันเป็นอย่างมากในการศึกษาผลในทางลบของสารเคมีชนิดหนึ่ง ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มีผลในการทำลายเซลล์หรืออวัยวะต่างๆในร่างกาย ทำให้เกิดพยาธิสภาพหรือกลุ่มอาการของโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคทางระบบประสาทชนิดที่มีการเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegeneration) ที่สำคัญได้แก่โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) สารเคมีดังกล่าวมีชื่อเรียกกันทั่วไปตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีว่า “อนุมูลอิสระ” โดยทั่วไปแล้วเราสามารถพบอนุมูลอิสระได้มากในอวัยวะที่มีการใช้พลังงานในปริมาณสูง เช่น ไต หัวใจ และสมอง ซึ่งในสภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระออกไปจากเซลล์และอวัยวะต่างๆเหล่านี้ เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์และก่อให้เกิดการเสื่อมสลายหรือการตายของเซลล์ได้ แต่ในบางสภาวะเช่น ร่างกายเกิดความเครียด หรือภาวะที่มีการติดเชื้อ เช่น ติดเชื้อจากไวรัส HIV จะเกิดการขาดภาวะสมดุลย์ของร่างกายและเหนี่ยวนำให้กระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระเสียไป ก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงสาเหตุที่แท้จริงของการเสื่อมสลายของเซลล์รวมทั้งกระบวนการที่ก่อให้เกิดการบกพร่องของกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระ แต่ก็ได้มีการมีความพยายามค้นคว้าทดลองหาหรือสารเคมีที่จะช่วยลดการสร้างหรือเพิ่มการกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อลดการสะสมของอนุมูลอิสระออกไปจากเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ประสาทในสมอง เนื่องจากระบบประสาทโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมองเป็นอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายระบบปิดที่มี Blood Brain Barrier คอยควบคุมการผ่านเข้าออกของยาและสารต่างๆสู่สมอง ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะได้ศึกษาหาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants หรือ free radical scavenger) และมีคุณสมบัติที่สามารถผ่านเข้าไปในสมองได้และที่สำคัญคือไม่มีพิษหรืออันตรายต่อสมองมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระแก่เซลล์ประสาท เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจากต่อมไร้ท่อที่มีชื่อว่า ต่อมไพเนียล (Pineal gland) ซึ่งเป็นต่อมที่ยื่นมาจากสมองส่วน epithalamus โดยทั่วไปแล้วเมลาโทนินจะมีหน้าที่ในการควบคุมระบบการทำงานของร่างกายต่างๆ เช่น ระบบสืบพันธุ์ การนอนหลับ ความชราภาพ ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น แต่จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ทำให้ทราบว่าเมลาโทนินมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม คือสามารถที่จะจับตัวกับอนุมูลอิสระได้โดยตรงหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระ รวมทั้งมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์ในการรักษาของยาหลายชนิด เช่น ยาในกลุ่ม Antibiotics หรือ Chemotherapeutic agents และที่สำคัญคือการศึกษาดังกล่าวในเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์และพบว่าเมลาโทนินสามารถลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทที่เพิ่มขึ้นจากสภาวะที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ประสาทได้ การนำเมลาโทนินมาใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคของระบบประสาทที่มีสาเหตุมาจากการเสื่อมสลายหรือการตายของเซลล์ประสาทจากผลของ

อนุมูลอิสระและ oxidative stress คงจะเป็นทางเลือกใหม่อีกแนวทางหนึ่งของการป้องกันหรือรักษาโรคทางระบบประสาทต่อไปในอนาคต