

RESEARCH ARTICLE

The Effects of LXR Agonist TO901317 on Inorganic Mercury Toxicity in Human Astrocytes**Dusadee Ospondpant¹, Nathawut Sibmooh¹, Sunhapas Soodvilai², Pornpun Vivithanaporn¹**¹ *Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand*² *Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand***Abstract**

Inorganic mercury is toxic to human neuronal and glial cells. Oxidative stress due to increased reactive oxygen species (ROS) is one of the major causes of inorganic mercury toxicity leading to cell death. *In vivo* and *in vitro* studies indicated that the liver X receptor (LXR) agonists could be beneficial for stroke and neurodegenerative diseases. However, their effects on astrocyte functions remain unclear. This study aims to investigate the effects of LXR agonist TO901317 on human astrocyte viability and its effect on inorganic mercury (mercuric chloride, HgCl₂)-induced cell death. Cell viability of human astrocytoma U373 cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. The elevation of ROS and lipid peroxidation were detected by measuring fluorescence intensity of dichlorofluorescein (DCF) and levels of malondialdehyde (MDA), respectively. Herein, TO901317 at 50 µM reduced more than 75% cell viability at 24 hours post-exposure while lower concentrations, 0.1-10 µM, were not toxic to U373 cells. Pretreatment with these non-toxic concentrations of TO901317 for 24 hours could not prevent the loss of cell viability induced by 30 µM HgCl₂ at 24 hours post-exposure. TO901317 at 10 µM could decrease MDA levels by 44%. However, pretreatment with TO901317 did not alter the levels of DCF fluorescence intensity and MDA caused by 10 and 30 µM HgCl₂ after exposure for 1 and 24 hours. These results suggested that an LXR agonist TO901317 could not protect toxicity of inorganic mercury on human astrocytes and has no effect on the increased ROS and lipid peroxidation induced by inorganic mercury.

Keywords: liver X receptor (LXR), LXR agonist TO901317, inorganic mercury, astrocytes, reactive oxygen species (ROS)

บทบาทของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์

ดุชนิ อีสปอนด์พันธ์¹, ณัฐรุส ลิบหมู่¹, สันทาส สุตวิสัย², พรพรรณ วิจิธนาภรณ์¹

¹ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

² ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ปรอทอนินทรีย์ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทและเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ ระดับอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษของปรอทอนินทรีย์ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า สารกระตุ้นตัวรับ liver X receptor (LXR) ลดการเกิดโรคทางระบบประสาท เนื่องจากบทบาทของ LXR ต่อเซลล์แอสโตรไซต์ยังไม่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อการมีชีวิตของเซลล์และต่อพิษของเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ (U373) ประเมินการมีชีวิตของเซลล์ ระดับ ROS และลิปิดเปอร์ออกซิเดชันโดยวัด MTT ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของ dichlorofluorescein (DCF) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า TO901317 (50 µM) ลดการมีชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 75 ที่เวลา 24 ชั่วโมง TO901317 (0.1-10 µM) ไม่สามารถป้องกันพิษของ HgCl₂ (30 µM) ที่เวลา 24 ชั่วโมง TO901317 (10 µM) สามารถลดระดับ MDA ได้ร้อยละ 44 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่สามารถลดการเพิ่มระดับ DCF ฟลูออเรสเซนซ์ และ MDA ซึ่งชักนำโดย HgCl₂ (10 และ 30 µM) ที่ 1 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าผลของ TO901317 ต่อเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ ไม่มีฤทธิ์ป้องกันพิษของปรอทอนินทรีย์ รวมทั้งการเกิด ROS และลิปิดเปอร์ออกซิเดชันซึ่งชักนำโดยปรอทอนินทรีย์

คำสำคัญ: liver X receptor (LXR), สารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317, ปรอทอนินทรีย์, เซลล์แอสโตรไซต์, อนุมูลอิสระของออกซิเจน (ROS)

บทนำ

ปรอทอนินทรีย์ (Inorganic mercury) เป็นโลหะหนักที่ก่อให้เกิดภาวะผิดปกติต่อระบบประสาท¹ การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าปรอทอนินทรีย์มีพิษต่อเซลล์ประสาท (neuron) และเซลล์แอสโตรไซต์ (astrocyte) ของมนุษย์²⁻⁴ ภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษของปรอทอนินทรีย์ในระดับเซลล์ โดยปรอทอนินทรีย์ไปกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS)⁵⁻⁷

Liver X receptor (LXR) เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor protein) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม nuclear receptor superfamily ซึ่งพบมากใน ไขมัน เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) และเซลล์แมคโครเฟจ (macrophage) การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้รายงานการพบ LXR ในเซลล์ประสาทและเซลล์แอสโตรไซต์⁸ LXR มีหน้าที่หลักในการควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมันและระดับคอเลสเตอรอล รวมทั้งตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ (anti-inflammatory response)⁹ การศึกษาในสัตว์และหลอดทดลองพบว่า สารกระตุ้นตัวรับ LXR มีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทและการเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) เช่น ลดการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง (stroke) และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)¹⁰⁻¹² การศึกษาวิจัยในเซลล์เยื่อหุ้มของมนุษย์และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูพบว่าสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ลดการเพิ่มของระดับ ROS ในภาวะที่ระดับน้ำตาลสูง^{13,14} นอกจากนี้หนูทดลองที่ได้รับ TO901317 มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อ oxidative stress เพิ่มขึ้น¹⁵

ในระบบประสาท เซลล์แอสโตรไซต์ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนและเสริมสร้างการทำงานของเซลล์ประสาท การตายหรือได้รับบาดเจ็บของเซลล์แอสโตรไซต์อาจส่งผลให้การทำงานของเซลล์ประสาทบกพร่องหรือผิดปกติ และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท อย่างไรก็ตามบทบาทหน้าที่ของ LXR ในแอสโตรไซต์ยังไม่ชัดเจน งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อการมีชีวิตของเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging capacity) ของ TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ (human astrocytoma U373 cells, U373)

เซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ (U373) เป็นของขวัญจาก Professor Christopher Power (University of Alberta, ประเทศแคนาดา) เซลล์ได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหาร Minimum Essential Medium (MEM, Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่มีการเติม 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ 1% penicillin/streptomycin (Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37°C

การเตรียมสารเคมี

สารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 (Cayman chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา หมายเลขผลิตภัณฑ์ 71810 ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$) ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl_2 , BDH Chemicals Ltd, ประเทศอังกฤษ หมายเลขผลิตภัณฑ์ 29163 ความบริสุทธิ์ 97%) ละลายในน้ำกลั่น

การศึกษาผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อการมีชีวิตของเซลล์ U373 (cell viability) ด้วยวิธี MTT

การทดสอบความเป็นพิษของ TO901317 ต่อเซลล์ U373 นำเซลล์ U373 จำนวน 8,000 เซลล์ต่อหลุมมาเพาะเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) เมื่อเซลล์มีระดับความหนาแน่นที่ร้อยละ 90-100 ของพื้นที่ (confluence) จะได้รับ TO901317 ความเข้มข้น 0.1-50 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมเป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง ก่อนนำมาเติมสารละลาย MTT (-3[4,-5dimethylthiazol--2yl]-2,5diphenyltetrazolium bromide, Bio Basic®, ประเทศแคนาดา) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ประเมินการมีชีวิตของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) ยี่ห้อ BioTek® รุ่น ELx 808 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้หักลบกับค่าการดูดกลืนแสงอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณหาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ดังนี้

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

การทดสอบผลของ TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ในเซลล์ U373 เพาะเลี้ยงเซลล์ U373 จำนวน 8,000 เซลล์ต่อหลุม ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เมื่อเซลล์มีระดับความหนาแน่นที่ร้อยละ 90-100 จะได้รับ TO901317 (0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl_2 , 10 และ 30 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ประเมินการมีชีวิตของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 และ 630 นาโนเมตร คำนวณหาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต

การศึกษาฤทธิ์ของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ที่ชักนำให้เกิด ROS ภายในเซลล์ U373 ด้วยวิธี DCFH-DA

เซลล์ U373 ถูกเพาะเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมชนิดที่บัสแสง จำนวน 8,000 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์มีระดับความหนาแน่นที่ร้อยละ 90-100 จะได้รับ TO901317 (0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนย้อมเซลล์ด้วย DCFH-DA (2',7'-dichloro-fluorescein diacetate, Sigma-Aldrich®, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์ (10 และ 30

ไมโครโมลาร์) ซึ่งปราศจากซีรัมและฟีนอลเรด (phenol red) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent intensity) ของ DCF ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Wallac Victor 2V 1420Multilabel HTS Counter ที่ค่าการดูดกลืนแสง 490 นาโนเมตร (excitation wavelength) และการคายแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (emission wavelength) คำนวณหาร้อยละของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ดังนี้

$$\text{ร้อยละของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ DCF} = \frac{\text{ค่าความเข้มแสง DCF กลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าความเข้มแสง DCF กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

การศึกษาฤทธิ์ของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ที่ชักนำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ด้วยวิธี TBARS

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) เตรียม TEP (Sigma-Aldrich®, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในเอทานอล 100% จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 นาโนโมลาร์ และทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดสอบ

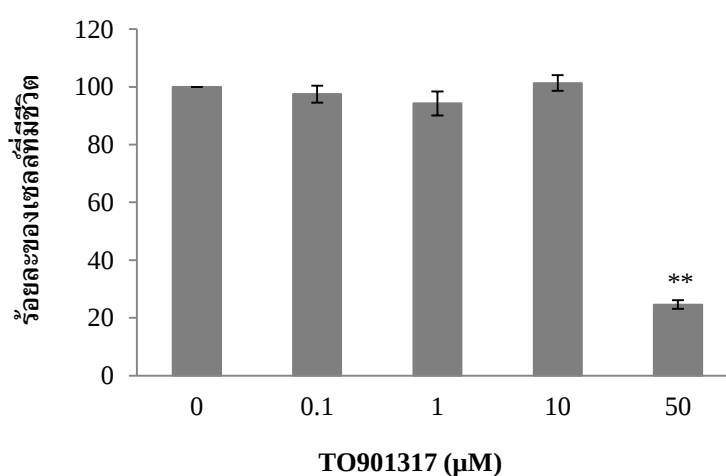
การทดสอบผลของ TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ที่ชักนำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน เพาะเลี้ยงเซลล์ U373 จำนวน 80,000 เซลล์ต่อหลุมในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 12 หลุม เมื่อเซลล์มีระดับความหนาแน่นที่ร้อยละ 90-100 จะได้รับ TO901317 (0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์ (10 และ 30 ไมโครโมลาร์) ซึ่งปราศจากซีรัมและฟีนอลเรดเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) และสารมาตรฐาน TEP ที่เตรียมไว้ มาทำปฏิกิริยากับ 10% TCA (trichloroacetic acid, Emsure® Acs, ประเทศเยอรมนี) และ 1% TBA (thiobarbituric acid, Sigma-Aldrich®, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 90-100°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที สกัดมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ด้วยบิวทานอล (1-butanol) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นระยะเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของ MDA ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (excitation wavelength) และค่าการคายแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร (emission wavelength) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น LS55 Luminescence spectrometer คำนวณหาระดับ MDA ของสารตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน TEP (standard curve) ที่มีค่า r^2 อย่างน้อยที่สุด 99.0% แสดงค่าเป็นระดับความเข้มข้นของ MDA (นาโนโมล/มิลลิลิตร)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean $\pm$ SEM) โดยทำการทดลองซ้ำกัน 3-6 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) โดยใช้ Tukey's post-hoc test เพื่อบ่งชี้ัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p -value <0.05)

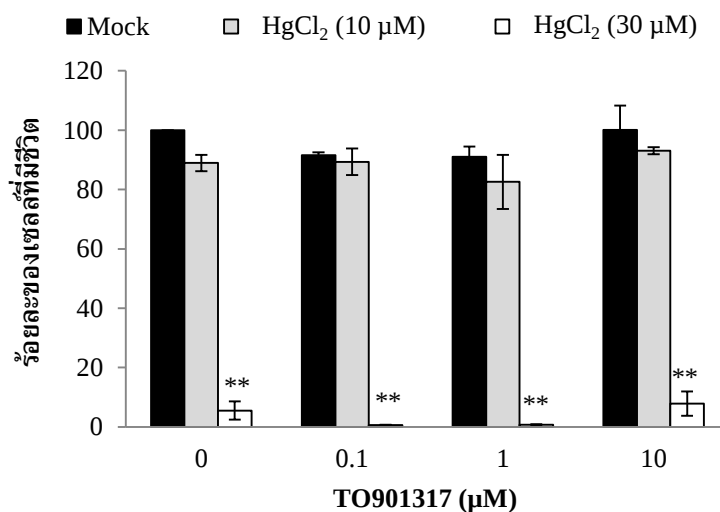
ผลการวิจัย

การศึกษาระยะต้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อความเป็นพิษของเซลล์ และการป้องกันพิษของปรอทอนินทรีย์ (เมอร์คิวริกคลอไรด์, HgCl_2) ในเซลล์ U373 โดยวิธี MTT เป็นการทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์ที่มีชีวิต โดยเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ซึ่งมีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นผลึก formazan สีม่วง การตายหรือได้รับบาดเจ็บของเซลล์ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติหรือทำงานลดลง ทำให้ MTT ถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น formazan ให้สีม่วงจางลงหรือไม่สี¹⁶



รูปที่ 1 ผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อการมีชีวิตของเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ เมื่อเซลล์ได้รับ TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1–50 ไมโครโมลาร์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง; ** $p < 0.01$, $n = 5$

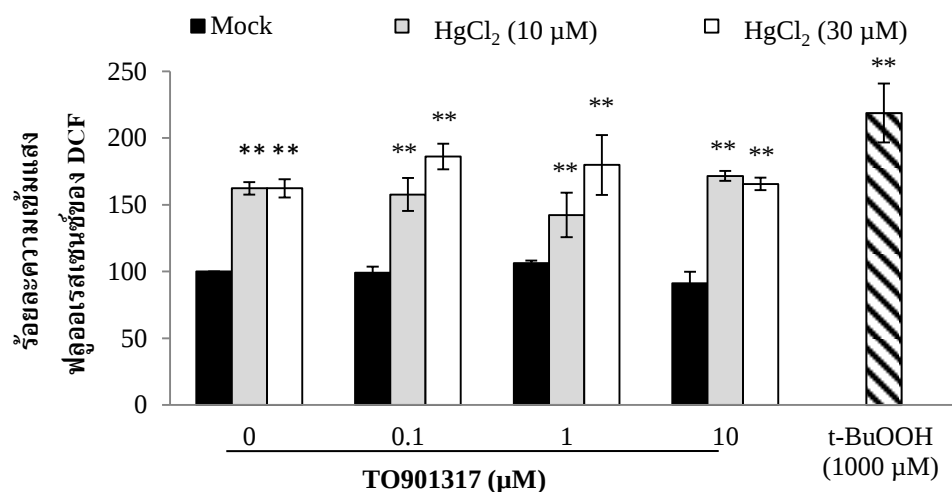
ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ที่ได้รับ TO901317 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีผลให้การทำงานของไมโทคอนเดรียมีค่าลดลงเหลือเพียงร้อยละ 24.6 ± 8.5 (รูปที่ 1) ในขณะที่สารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1-10 ไมโครโมลาร์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น การศึกษาผลของ TO901317 ต่อพิษของเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl_2) เซลล์ U373 จะได้รับ TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนเติมเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 30 ไมโครโมลาร์ ผลการศึกษาพบว่าเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เซลล์มีชีวิตลดลงมากกว่าร้อยละ 90 นอกจากนี้เซลล์ได้รับ TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ไม่สามารถลดความเป็นพิษของเมอร์คิวริกคลอไรด์ในเซลล์ U373 (รูปที่ 2)



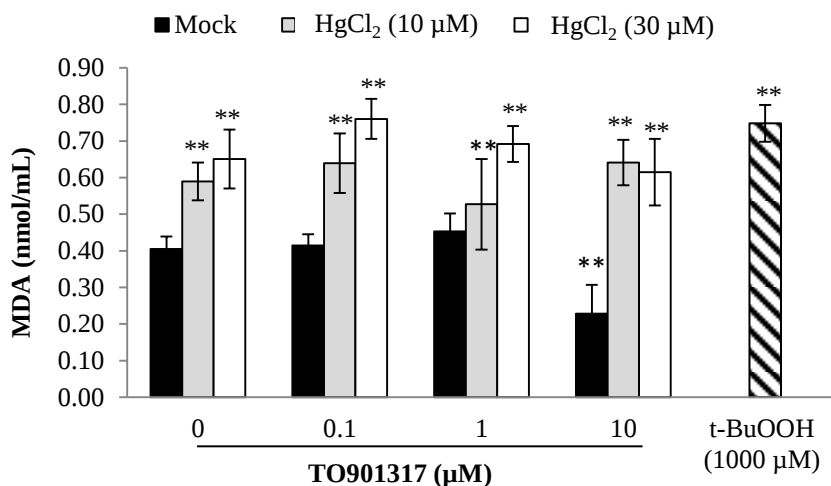
รูปที่ 2 ผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ เซลล์ U373 ได้รับ TO901317 (0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับ HgCl₂ (10 และ 30 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง; ** $p < 0.01$, $n = 3-5$

การศึกษาในหลอดทดลองก่อนหน้านี้พบว่า พิษของเมอร์คิวริกคลอไรด์มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ภายในเซลล์^{7,17} การวิเคราะห์หาระดับ ROS โดยวิธี DCFH-DA อาศัยการทำงานของเอนไซม์ esterase ภายในเซลล์โดยเปลี่ยนสาร DCFH-DA เป็น DCFH ซึ่งเป็นสารไม่เรืองแสง (non-fluorescence) ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะเปลี่ยน DCFH เป็น DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสง (fluorescence) โดยค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent intensity) ของ DCF จะบ่งบอกถึงระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์¹⁸ ผลการทดลองในเซลล์ U373 พบว่าเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 30 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิด ROS เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 60 เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ TO901317 และเมอร์คิวริกคลอไรด์ เซลล์ที่ได้รับ TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถลดระดับ ROS ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการชักนำโดยเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ 1 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

การเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ภายในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับไขมันบริเวณผนังเซลล์ เกิดกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) การเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันภายในเซลล์สามารถวิเคราะห์โดยวิธี TBARS ซึ่งเป็นการวัดระดับมาลอนัลดีไฮด์ (malonaldehyde, MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการนี้¹⁹ ผลการศึกษาพิษของเมอร์คิวริกคลอไรด์ในเซลล์ U373 พบว่าระดับ MDA เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 และ 60 ในเซลล์ที่ได้รับเมอร์คิวริกคลอไรด์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 และ 30 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ไม่สามารถลดระดับ MDA ในเซลล์ที่ได้รับเมอร์คิวริกคลอไรด์ อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ได้รับ TO901317 เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่าระดับของ MDA ลดลงร้อยละ 44 (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 ผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ที่ชักนำให้เกิด ROS ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ เซลล์ได้รับ TO901317 (0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับ HgCl₂ (0-30 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ใช้ tert-Butyl hydroperoxide (t-BuOOH, Sigma-Aldrich® ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control); ***p* < 0.01, n = 3-6



รูปที่ 4 ผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อพิษของปรอทอนินทรีย์ที่ชักนำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ เซลล์ได้รับ TO901317 (0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับ HgCl₂ (0-30 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ใช้ tert-Butyl hydroperoxide (t-BuOOH, 1 มิลลิโมลาร์) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control); ***p* < 0.01, n = 3-6

วิจารณ์

ผลการศึกษาในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์พบว่า สารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ TO901317 ที่ความเข้มข้นซึ่งไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (0.1-10 ไมโครโมลาร์) ไม่สามารถป้องกันหรือลดการเกิด ROS และลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน รวมทั้งการลดลงของการมีชีวิตของเซลล์แอสโตรไซต์ที่เกิดจากพิษของปรอทอนินทรีย์

อย่างไรก็ตามการศึกษาในหลอดทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 สามารถลดการเกิด ROS ในเซลล์เยื่อบุผิวของมนุษย์และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูที่ถูกชักนำในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงและลดระดับ ROS ในเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ชนิดบีเซลล์จากม้ามของหนูที่ถูกชักนำโดยโฮโมซิสเตอีน (homocysteine)²⁰ การศึกษาในสัตว์ ทดลองยังพบว่าปอดของหนูที่ได้รับ TO901317 มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น กลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอรัส (GST) และเมทัลโลไธโอนีน (Mt)¹⁵

ในการศึกษาครั้งนี้ สารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ไม่มีฤทธิ์ในการกำจัดหรือลดการเกิด ROS ภายในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ที่ชักนำให้เกิดโดยปรอทอนินทรีย์ อาจเนื่องจากความแตกต่างของตัวชักนำให้เกิด ROS ภายในเซลล์ นอกจากนี้ อาจเนื่องจากการตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิดต่อสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 มีความแตกต่างกัน การศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูพบว่า TO901317 สามารถลดการตายแบบ apoptosis ซึ่งชักนำโดยภาวะระดับน้ำตาลสูง¹⁴ และมีรายงานว่า TO901317 สามารถลดการเกิด apoptosis ในเซลล์แอสโตรไซต์ของหนูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยกลูตาเมต (glutamate) และภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia)²¹ อย่างไรก็ตามการศึกษาในเซลล์มะเร็งรังไข่ของมนุษย์ และเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF-7 พบว่า TO901317 ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และชักนำให้เกิด apoptosis^{22,23}

แม้ว่าผลการศึกษาพิษของปรอทอนินทรีย์ต่อเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ภายในเซลล์ และการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ภายในเซลล์เป็นเพียงกลไกหนึ่งของการเกิดพิษของปรอทอนินทรีย์ โดยการศึกษาในหลอดทดลองก่อนหน้านี้รายงานว่า การเกิดพิษของปรอทอนินทรีย์ยังเกี่ยวข้องกับกลไกอื่น ๆ เช่น การลดลงของระดับกลูตาไธโอน (glutathione, GSH) ภายในเซลล์ ความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dysfunction) การเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียม (Ca^{2+}) ภายในเซลล์ และการทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage)^{3,6,24,25}

เนื่องจากยังไม่มีหลักฐานระบุแน่ชัดถึงกลไกการเกิดพิษของปรอทอนินทรีย์ หรือกลไกการชักนำระดับ ROS ที่เพิ่มสูงขึ้นภายในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ การศึกษาก่อนหน้านี้ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์และหนูรายงานว่า ปรอทอนินทรีย์ชักนำให้เกิดการตายหรือบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของระดับกลูตาไธโอนภายในเซลล์ เนื่องจากปรอทอนินทรีย์สามารถจับกับหมู่ sulfhydryl (-SH) ของกลูตาไธโอน^{3,24} นอกจากนี้การศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดทีเซลล์จากเลือด (peripheral blood) ของมนุษย์ มีรายงานว่าปรอทอนินทรีย์ชักนำให้ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติโดยลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ภายในเซลล์²⁵ การลดลงของ

ระดับกลูตาไธโอนภายในเซลล์ และไมโทคอนเดรียถูกทำลายหรือทำงานผิดปกติซึ่งชักนำโดยโปรออกซิแดนท์ อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการเพิ่มระดับ ROS ภายในเซลล์ และ/หรือเป็นสาเหตุการตายของเซลล์ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้นอกจากความแตกต่างของตัวชักนำให้เกิด ROS ภายในเซลล์ หรือชนิดของเซลล์ที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 กลไกการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ TO901317 ไม่มีผลต่อการป้องกันพิษของโปรออกซิแดนท์ เนื่องจากความแตกต่างระหว่างกลไกการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 และกลไกการเกิดพิษของโปรออกซิแดนท์ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์

จากผลการศึกษาในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ที่ได้รับสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า TO901317 ลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ TO901317 อาจเนื่องจาก TO901317 มีผลต่อการควบคุมความสมดุลของระดับไขมัน การตอบสนองต่อการอักเสบ หรือการกำจัดอนุมูลอิสระ เนื่องจากเซลล์สร้างขึ้นเอง ซึ่งมีรายงานการศึกษาในเนื้อเยื่อปอดของหนูที่ได้รับสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 สามารถลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งชักนำโดยคาราจีแนน (carageenan) จากผลการศึกษารายงานว่า การลดลงของระดับ MDA สัมพันธ์กับการลดลงของระดับไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO) และการลดลงของสารไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-1 β (IL-1 β) และ tumor necrosis factor-alpha, (TNF- α)²⁶

อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ แม้ว่าจะไม่มีฤทธิ์กำจัด ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ซึ่งถูกชักนำโดยโปรออกซิแดนท์ แต่อาจมีผลต่อการป้องกันหรือยับยั้งการหลั่งสารไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบภายในเซลล์ หรือมีผลต่อกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษของโปรออกซิแดนท์ในระดับเซลล์ ดังนั้น การศึกษาผลของสารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ต่อกลไกอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดพิษของโปรออกซิแดนท์ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาศึกษาต่อยอดและเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของ LXR ที่มีต่อเซลล์แอสโตรไซต์ รวมทั้งการพัฒนารักษาพิษของโปรออกซิแดนท์

สรุป

สารกระตุ้นตัวรับ LXR TO901317 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ TO901317 ที่ความเข้มข้น 0.1-10 ไมโครโมลาร์ ไม่มีพิษต่อเซลล์และไม่มีฤทธิ์ป้องกันหรือยับยั้งการเกิดพิษของโปรออกซิแดนท์ในเซลล์แอสโตรไซต์ของมนุษย์ นอกจากนี้ TO901317 ไม่สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระหรือลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งชักนำให้เกิดโดยโปรออกซิแดนท์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสมาคมศิษย์เก่าบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วน และหน่วยเครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Farina M, Avila DS, da Rocha JB, Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int.* 2013 Apr;62(5):575-94.
2. Xu F, Farkas S, Kortbeek S, Zhang FX, Chen L, Zamponi GW, Syed NI. Mercury-induced toxicity of rat cortical neurons is mediated through N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Mol Brain.* 2012 Sep 14;5:30.
3. Lee YW, Ha MS, Kim YK. Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells. *Neurochem Res.* 2001 Nov;26(11):1187-93.
4. Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn F, Stahelin HB, Herrmann M, Renard P, Brockhaus M, Hock C. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2000 Jan;74(1):231-6.
5. Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1993 May 25;45(10):2017-24.
6. Kim SH, Sharma RP. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca(2+) homeostasis, and cytokine gene expression. *Toxicol In Vitro.* 2003 Aug;17(4):385-95..
7. Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG, Farina M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol.* 2007 Dec;20(12):1919-26.
8. Whitney KD, Watson MA, Collins JL, Benson WG, Stone TM, Numerick MJ, Tippin TK, Wilson JG, Winegar DA, Klier SA. Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol Endocrinol.* 2002 Jun;16(6):1378-85.
9. Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JA, Steffensen KR. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Jul;33(7):394-404.
10. Xu P, Li D, Tang X, Bao X, Huang J, Tang Y, Yang Y, Xu H, Fan X. LXR agonists: new potential therapeutic drug for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2013 Dec;48(3):715-28.

11. Sodhi RK, Singh N. Liver X receptors: emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol Res.* 2013 Jun;72:45-51.
12. Morales JR, Ballesteros I, Deniz JM, Hurtado O, Vivancos J, Nombela F, Lizasoain I, Castrillo A, Moro MA. Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation.* 2008 Sep 30;118(14):1450-9.
13. Hayashi T, Kotani H, Yamaguchi T, Taguchi K, Iida M, Ina K, Maeda M, Kuzuya M, Hattori Y, Ignarro LJ. Endothelial cellular senescence is inhibited by liver X receptor activation with an additional mechanism for its atheroprotection in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 21;111(3):1168-73.
14. Cheng Y, Feng Y, Zhu M, Yan B, Fu S, Guo J, Hu J, Song X, Guo S, Liu G. Synthetic liver X receptor agonist T0901317 attenuates high glucose-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in cardiomyocytes. *Acta Histochem.* 2014 Jan;116(1):214-21.
15. Gong H, He J, Lee JH, Mallick E, Gao X, Li S, Homanics GE, Xie W. Activation of the liver X receptor prevents lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Biol Chem.* 2009 Oct 30;284(44):30113-21.
16. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol.* 2011;716:157-68.
17. Monroe RK, Halvorsen SW. Mercury abolishes neurotrophic factor-stimulated Jak-STAT signaling in nerve cells by oxidative stress. *Toxicol Sci.* 2006 Nov; 94(1):129-38.
18. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002 Jul 1;265(1-2):49-72.
19. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S.
20. Chang L, Zhang Z, Li W, Dai J, Guan Y, Wang X. Liver-X-receptor activator prevents homocysteine-induced production of IgG antibodies from murine B lymphocytes via the ROS-NF-kappaB pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 8;357(3):772-8.
21. Zhou S, Wu H, Zeng C, Xiong X, Tang S, Tang Z, Sun X. Apolipoprotein E protects astrocytes from hypoxia and glutamate-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2013 Jan 16;587(2):254-8.
22. El Roz A, Bard JM, Huvelin JM, Nazih H. LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Res.* 2012 Jul;32(7):3007-13.
23. Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, Daly JM. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res.* 2010 May 26; 3:13.

24. Cookson MR, Pentreath VW. Protective roles of glutathione in the toxicity of mercury and cadmium compounds to C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro*. 1996 Jun;10(3):257-64.
25. Guo TL, Miller MA, Shapiro IM, Shenker BJ. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 Dec;153(2):250-7.
26. Crisafulli C, Mazzon E, Paterniti I, Galuppo M, Bramanti P, Cuzzocrea S. Effects of liver X receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. *Respir Res*. 2010 Feb 22;11:19.