

บทคัดย่อ

การที่มีระดับไขมันในเลือดสูง ส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับระดับของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low density lipoprotein; LDL) ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาทั้งในผู้ป่วยและสัตว์ทดลองพบว่าการที่มีไขมันในเลือดสูงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคอัลไซเมอร์แต่การศึกษาถึงกลไกทางชีวเคมีระหว่าง LDL กับกระบวนการเกิดโรคดังกล่าวยังไม่ทราบชัดเจน งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบผลของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำและออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (Oxidized-LDL; Ox-LDL) ต่อกระบวนการทำงานของ cAMP response element binding protein (CREB) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในสมองที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างความทรงจำระยะยาว โดยการเกิดออกซิเดชันของ LDL จะถูกเหนี่ยวนำด้วย CuSO_4 ที่เวลา 2 ชั่วโมงเรียกว่า mildly oxidized LDL (mox-LDL) และ 16-24 ชั่วโมงเรียกว่า fully oxidized LDL (fox-LDL) แล้วทดสอบการมีชีวิตรอดของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ด้วย MTT assay ทดสอบการสร้างภาวะ oxidative stress (intracellular ROS) ด้วย fluorescent DCFH-DA และการแสดงออกรวมทั้งการ activation ของโปรตีน CREB ด้วยวิธี western blotting ผลการศึกษาพบว่า fox-LDL ทำให้เซลล์ประสาทตายโดยขึ้นกับความเข้มข้นโดยเห็นผลชัดเจนที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ LDL และ mox-LDL มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาทเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่น่าสนใจคือ mox-LDL ความเข้มข้น 50-200 $\mu\text{g/ml}$ สร้างภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ได้มากกว่า fox-LDL ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และเห็นชัดเจนและเกิดมากที่สุดที่เวลา 4 ชั่วโมง และทั้ง LDL และ oxidized LDL มีผลต่อการทำงานของโปรตีน CREB โดยมีแนวโน้มลดการแสดงออกของโปรตีน CREB ซึ่งอาจเกิดจากรบกวนจากภาวะ oxidative stress แม้ว่าการวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลที่ทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง แต่ผลจากการศึกษาก็สามารถบ่งบอกได้ว่า LDL และ Ox-LDL อาจมีผลต่อการสร้างความทรงจำของเซลล์ประสาทในสมอง โดยไปควบคุมการแสดงออกของ CREB ดังนั้น การมีระดับของคอเลสเตอรอลหรือ LDL ในเลือดสูงอาจมีบทบาทสำคัญต่อการสูญเสียความทรงจำในมนุษย์ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้

Abstract

Oxidation of lipoprotein especially low density lipoprotein (LDL) may play important role in Alzheimer's disease (AD). Extensive data collected from AD patients and animal models indicate that high serum cholesterol level and oxidative stress associated with the AD development. However, the investigation of LDL oxidation on memory formation is not well document. This study aimed to test the effect of LDL and its oxidized forms on cellular oxidative stress and the activation of CREB in SHSY-5Y human neuroblastoma cells. The LDL was oxidized by CuSO_4 to either mildly oxidized-LDL (mox-LDL) or fully oxidized-LDL (fox-LDL). The neuronal survival was determined by MTT assay and the intracellular reactive oxygen species (ROS) was evaluated by fluorescent DCFH-DA. CREB is a transcription factor protein involving the formation of long-term memory. CREB and phosphorylated CREB were measured by western blotting. The result showed that fox-LDL dose dependently reduced cell viability whereas LDL and mox-LDL showed a small effect. The intracellular ROS level was however increased by mox-LDL more significant than fox-LDL. The western blot analysis revealed that LDL and both oxidized forms differently affected CREB activation. This study suggested that LDL, especially oxidized LDL, had influences on neuronal survival and cellular function such as gene transcription possibly through the induction of cellular oxidative stress. LDL and/or oxidized LDL possibly involved in the pathways associated with memory loss in culture cells, and this might occur in AD pathogenesis.

บทสรุปย่อ (Executive summary)

ในภาวะที่มีระดับไขมันในเลือดสูง ส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับระดับของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low density lipoprotein; LDL) ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่ง LDL สามารถเกิดกระบวนการออกซิเดชันได้ง่ายและเกิดอันตราย เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ แต่มีรายงานวิจัยในปัจจุบันทั้งในผู้ป่วยและสัตว์ทดลองพบว่าการที่มีไขมันในเลือดสูงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคอัลไซเมอร์ มีผลต่อการทำงานของเซลล์ประสาทและทำให้เซลล์ตายจากการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียม อนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species; ROS) และยังเพิ่มการสะสมของโปรตีน A β แต่การศึกษาถึงกลไกทางชีวเคมีระหว่าง LDL กับกระบวนการเกิดโรคดังกล่าวยังไม่ทราบชัดเจน ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงบทบาทของ LDL และ oxidized LDL ต่อการเปลี่ยนแปลงของ CREB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ซึ่ง CREB เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในเซลล์ประสาทที่เชื่อว่าเมื่อมีการ phosphorylation ของโปรตีน CREB แล้วจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างความทรงจำระยะยาว

ผู้วิจัยจึงทำการปั่นแยก LDL จาก plasma ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก blood bank ของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ซึ่งทำการกระตุ้นให้เกิดการ oxidation ด้วยโลหะหนัก ในที่นี้ใช้ CuSO₄ และทดสอบการเกิด oxidation ของ LDL ด้วย TBARS assay ซึ่งเป็นการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก lipid peroxidation ของไขมันภายใน LDL ซึ่งพบว่า LDL ที่ 1 mg/ml และ CuSO₄ ที่ 10 μ M เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ พบว่าเมื่อทำการ oxidation ของ LDL ด้วย CuSO₄ การเกิด lipid peroxidation จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมงสำหรับการเกิด mildly oxidized LDL และ 16 -24 ชั่วโมง สำหรับ fully oxidized LDL ในการนำไปทดสอบการตายของเซลล์

ในการทดสอบ neurotoxicity ต่อเซลล์ประสาทของ oxidized LDL ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบด้วย MTT assay โดยใช้เซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เหนี่ยวนำให้เกิด differentiation ไปเป็น neuronal-like cells ด้วย retinoic acid และทดสอบการสร้างภาวะ oxidative stress ด้วยการวัดระดับของ intracellular ROS ส่วนการทดสอบบทบาทของ LDL และ oxidized LDL ต่อการเปลี่ยนแปลงของ โปรตีน CREB สามารถทดสอบด้วยวิธี immunoblotting (western blotting)

จากการศึกษา พบว่า fox-LDL ทำให้เซลล์ SH-SY5Y ตายมากกว่า mox-LDL โดยผลนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของ oxidized LDL (dose-dependent effect) โดย fox-LDL ที่ความเข้มข้น 200 μ g/ml เซลล์มีชีวิตรอดแค่ 20% ขณะที่ mox-LDL เซลล์มีชีวิตรอด 80% ในขณะที่ native LDL ไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่สิ่งที่น่าสนใจผู้วิจัยพบว่า เมื่อทดสอบการสร้างภาวะ oxidative stress ของเซลล์ SH-SY5Y ด้วย intracellular ROS assay พบว่า mox-LDL ในความเข้มข้น 50 – 200 μ g/ml กระตุ้นการสร้าง ROS มากกว่า fox-LDL ซึ่งผลนี้ให้ได้ชัดเจนที่เวลา 4 ชั่วโมง โดยผลนี้ขึ้นตามความเข้มข้นของ mox-LDL ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า fox-LDL จะทำให้เกิดอันตรายที่ extracellular และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายเนื่องจากผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation (MDA) ขณะที่ mox-LDL มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง oxidative stress ภายในเซลล์ประสาท ซึ่งน่าจะเกิดจากการ uptake oxidized-LDL เข้าไปภายในเซลล์ และงานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าทั้ง LDL และ oxidized LDL form มีผลต่อการทำงานของโปรตีน CREB โดยพบว่ามีแนวโน้มลดการทำงานของ CREB ซึ่งการทำงานที่ลดลงอาจจากการรบกวนด้วยภาวะ oxidative stress และอาจมีกลไกอื่นที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน CREB จึงควรมีการศึกษาถึงกลไกเชิงลึกเพิ่มเติมทั้ง LDL และ oxidized -LDL ต่อการทำงานของ CREB และเมื่อทราบถึงกลไกที่ชัดเจนแล้ว การศึกษาเพื่อหาสารซึ่งมีคุณสมบัติไปยับยั้งที่กลไกดังกล่าวก็อาจจะเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยและพัฒนาาใหม่ที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ต่อไปในอนาคต

ผลการศึกษาของโครงการวิจัยนี้ ได้มีการเผยแพร่ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) “วิทยาศาสตร์เพื่ออนาคตของมนุษยชาติ” ในรูปแบบการนำเสนอ แบบโปสเตอร์ และ proceeding (full paper) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	1
Abstract.....	2
บทสรุปวบยอด (Executive summary).....	3
สารบัญ.....	5
สารบัญรูปภาพ.....	6
รายการคำย่อ.....	7
 บทที่ 1 บทนำ (Introduction).....	 9
หลักการและเหตุผล.....	9
วัตถุประสงค์.....	11
ขอบเขตของงานวิจัย.....	11
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	12
 บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods).....	 13
สารเคมี.....	13
เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	15
วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
 บทที่ 3 ผลการทดลอง (Results).....	 20
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง (Discussion & Conclusion).....	30
เอกสารอ้างอิง (References).....	35
ผลลัพธ์ (Output).....	38
ภาคผนวก (Index)	40

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 วิธีแยก LDL โดยวิธี density gradient ultracentrifugation	16
รูปที่ 2 การเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ LDL	21
รูปที่ 3 ผลของ LDL ต่อการมีชีวิตรอด SH-SY5Y neuroblastoma cell	23
รูปที่ 4 ผลของ LDL ต่อการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell	25
รูปที่ 5 ผลของ LDL (100 µg/ml) เวลาต่อการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ในเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell	26
รูปที่ 6 ผลของ LDL ต่อการทำงานของโปรตีน CREB ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell	28
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบผลของการแสดงออกของโปรตีน pCREB และ CREB ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell	29

รายการคำย่อ

BCA	Bicinchoninic acid assay
CREB	cAMP response element binding protein
°C	Degree celcius
CO ₂	Carbondioxide
Cu ⁺	Cuprous ion
Cu ²⁺	Cupric ion
CuSO ₄	Copper sulfate
d	Density
DMEM	Dulbecco's Modifide Eagle's Medium-low glucose
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
EDTA	Ethylenediamine-tetraacetic acid
EtOH	Ethanol
fox-LDL	Fully oxidized LDL
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
HCl	Hydrochloric acid
HDL	High density lipoprotein
Hr	Hour
IDL	Intermediate density lipoprotein
KBr	Potassium bromine
KCl	Potassium chloride
kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
MDA	Malondialdehyde
MgCl ₂	Magnesium chloride
M	Molar
min	Minute
mg	Milligram
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mox-LDL	Mildly oxidized LDL
μg	Microgram
μl	Microliter
μM	Micromolar
N ₂	Nitrogen
NaCl	Sodium chloride
Na ₂ EDTA	Sodium ethylenediamine-tetraacetic acid
Na ₂ CO ₃	Sodium bicarbonate
Oxidized-LDL	Oxidized low density lipoprotein
PBS	Phosphate buffer saline
pCREB	Phosphorylated CREB
PVDF	Polyvinylidene fluoride
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substance
TBS	Tris buffer saline
VLDL	Very low density lipoprotein

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

หลักการและเหตุผล

เนื่องจากการพัฒนาการของเทคโนโลยีทางการแพทย์ในปัจจุบัน จำนวนผู้สูงอายุจึงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้น โรคที่เกิดจากความเสื่อมต่างๆ เช่น โรคทางหลอดเลือดและหัวใจ โรคความจำเสื่อม รวมทั้งโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) จึงพบในอัตราที่สูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งโรคอัลไซเมอร์มีแนวโน้มของอุบัติการณ์การเกิดของโรคเพิ่มมากขึ้นทุกปี จากการศึกษาพบว่าในช่วงปี 2549 ทั่วโลกมีผู้ที่เป็นโรคอัลไซเมอร์กว่า 26.6 ล้านคน และมีการคาดการณ์ว่าอาจเพิ่มเป็นกว่า 100 ล้านคนในอีก 45 ปี ข้างหน้า[1]

Alzheimer's disease เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ เช่น การสูญเสียเซลล์ประสาทจาก cholinergic ในสมอง เซลล์ตายเนื่องจาก reactive oxygen species (ROS) การลดการส่งสัญญาณประสาทเนื่องจากกระบวนการสะสมของ amyloid beta และจากปฏิกิริยาของกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบการศึกษาจากนักวิจัยหลายกลุ่มหลายประเทศถึงความสัมพันธ์ระหว่างการมีระดับไขมันในเลือดสูงกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ในภาวะที่มีระดับไขมันในเลือดสูง โดยเฉพาะไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ที่สามารถเกิดกระบวนการออกซิเดชันได้ง่ายและเกิดอันตรายต่อเซลล์ประสาท [2, 3] ซึ่งอาจส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมและ ROS (reactive oxygen species) ภายในเซลล์ประสาท [4] นอกจากนี้การเกิดออกซิเดชันก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ส่งผลให้เกิดการทำลายในระดับโมเลกุลโดยเฉพาะการรบกวนหรือทำลายดีเอ็นเอ ที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหลากหลายชนิดรวมถึงในกระบวนการสร้างความทรงจำของเซลล์ประสาท และยังเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้โดยการเพิ่มของ caspase-3[3, 5]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในผู้ป่วยพบว่า ผู้ที่มีระดับ LDL ในเลือดสูงสัมพันธ์กับการลดลงของ cognitive score [6] รวมถึงพลาสมาของกลุ่มที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ มีระดับ LDL protein carbonyl content ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม [7] และน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่เป็นอัลไซเมอร์มีระดับของ oxidized-LDL antibody ที่สูงกว่าคนปกติ [8] และมีการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบอีกว่า พบว่า ในกระต่ายที่ได้รับการเลี้ยงด้วยอาหารที่มี cholesterol สูง มีการสูญเสียการทำงานในด้านเกี่ยวข้องกับ การเรียนรู้และความจำ รวมถึงรบกวนหน้าที่ของ Blood brain barrier (BBB) ทำให้สูญเสียการทำงานและมีการ leakage ของ (BBB) [9] และมีการปรากฏของ apo-B ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ

ของ LDL ในสมอง [9] ยังพบอีกว่า cholesterol สูงยังทำให้มีการเพิ่มการสะสมของ โปรตีนอะมัยลอยด์เบตา ($A\beta$) [10] แต่กลไกที่ชัดเจนในการทำลายเซลล์ประสาทจนก่อให้เกิดภาวะความจำเสื่อมของ oxidized LDL กับกระบวนการสร้างความทรงจำทั้งในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองยังไม่มีรายงาน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าในประเด็นดังกล่าวนี้ โดยจะเน้นในการค้นหาผลกระทบของ oxidized LDL ต่อการเปลี่ยนแปลง transcription factor ที่ทราบกันดีว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างความทรงจำ ซึ่งได้แก่ c-AMP-response element binding protein (CREB)

CREB เป็น transcription factor ที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนข้อมูลที่เซลล์ประสาทเพิ่งจะได้รับ ซึ่งจัดเป็น short-term memory ไปเป็นความทรงจำระยะยาวหรือ long-term memory มีการกล่าวไว้ว่า CREB ทำหน้าที่คล้ายกับ “switch” ในการบันทึกความทรงจำระดับเซลล์ [9, 11] ถ้ามีการรบกวนการทำงานของ CREB อาจจะเป็นสาเหตุไม่สามารถสร้างความทรงจำได้ มีรายงานหลายชิ้นพบว่า การทำงานของ CREB มีความผิดปกติไปในสมองของสัตว์ทดลองที่ใช้เป็น model ของโรคอัลไซเมอร์ และสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ และพบว่าการ overexpression ของ CREB อาจลดการตายแบบ apoptosis ของ hippocampal neurons cell ของหนูทดลองได้ [12]

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะศึกษาหากลไกดังกล่าว โดยเน้นไปที่การศึกษาผลของ oxidized LDL ในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก (protein expression) หรือการทำงานของ c-AMP-response element binding protein (CREB) ซึ่งเป็น transcription factor ที่พบในเซลล์ประสาทและทำหน้าที่ในการสร้างความทรงจำ (memory formation) โดยมีบทบาทในการเปลี่ยน short-term memory ไปเป็น long-term memory ซึ่งผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลที่สามารถใช้ในการอธิบายกลไกการสูญเสียความทรงจำในระดับเซลล์และโมเลกุลได้ และยังเป็นแนวทางให้มีการศึกษาวิจัยในระดับลึกถึงกระบวนการอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับการสูญเสียความทรงจำได้ นอกจากนี้ ยังอาจเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นเป้าหมายของการรักษา (therapeutic target) ใหม่ๆ แม้ว่าในปัจจุบัน จะมียาหลายกลุ่มที่สามารถใช้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ แต่ก็ไม่มียากลุ่มใดที่มีประสิทธิภาพดีสมบูรณ์ เนื่องจากการทำงานของระบบประสาทและสมองมีความซับซ้อน ประกอบกับพยาธิวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ก็มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับหลากหลายกระบวนการ เพื่อให้ได้ความชัดเจนต่างๆ ของกระบวนการการเกิดความเสื่อมนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ใหม่ๆ ซึ่งอาจสามารถช่วยเสริมฤทธิ์กับยาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบผลของ oxidized LDL ต่อการเป็นพิษและการสร้าง oxidative stress ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง
2. เพื่อทดสอบผลของ oxidized LDL ต่อการแสดงออกและการทำงานของ CREB ที่ทำหน้าที่ในการสร้างความทรงจำในเซลล์ประสาท

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงบทบาทของ oxidized LDL ต่อการเปลี่ยนแปลงของ CREB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง human neuroblastoma cell line, SY-SY5Y ซึ่ง LDL ที่ได้จะทำการปั่นแยกมาจาก plasma ที่ได้รับจาก blood bank และจะทำการกระตุ้นให้เกิดการ oxidation ด้วยโลหะหนัก ในที่นี้ใช้ CuSO_4 และการประเมิน neurotoxicity ต่อเซลล์ประสาท ทำได้โดยการวัด cell viability ด้วย MTT assay และยังจะทำการทดสอบภาวะ oxidative stress ที่อาจเกิดขึ้นในเซลล์ประสาท ด้วยการวัดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ สำหรับการทดสอบผลของ oxidized LDL ต่อการทำงานของ CREB จะประเมินโดย western blot ซึ่งจะทำการวัดปริมาณของ total CREB และ phosphoCREB ซึ่งเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ (active form) ของ CREB การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน CREB หรือการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนการเกิด phosphorylation ของ CREB จะสามารถใช้ประเมินผลของ oxidized LDL ต่อทั้งการแสดงออกและการทำงานของ CREB ได้ ซึ่งจะสามารถเชื่อมโยงไปถึงกระบวนการสร้างความทรงจำระดับเซลล์ได้ โดยการทดสอบผลของ oxidized LDL ในทุกๆ การทดลองในโครงการวิจัยนี้ จะทำการเปรียบเทียบกับ native LDL เสมอ เพื่อประเมินผลที่เฉพาะเจาะจงจาก oxidized LDL

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากข้อมูลที่เคยมีการรายงานถึงบทบาทของ oxidized LDL ต่อความเสื่อมของเซลล์ประสาท และความสัมพันธ์ของ oxidized LDL กับภาวะของโรคอัลไซเมอร์ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า oxidized LDL อาจจะมีผลต่อการสร้างความทรงจำระดับเซลล์ได้ โดยรบกวนการทำงานของ CREB ซึ่งถ้าสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้ เป็นไปตามที่ตั้งไว้ จะสามารถศึกษาต่อยอดในระดับลึกถึงกลไกในการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ CREB ได้ เช่น ศึกษาถึงบทบาทของเอนไซม์ kinase หรือ phosphatase บางชนิดภายในเซลล์ประสาท ที่อาจมีผลการกระตุ้นหรือยับยั้ง CREB ซึ่งผู้วิจัยได้วางแผนที่จะดำเนินการในอนาคตต่อไป นอกจากศึกษากลไกในระดับลึกแล้ว รูปแบบการทดลองนี้ยังอาจใช้เป็น model ของโรคอัลไซเมอร์อีกแบบหนึ่งได้ ซึ่งสามารถใช้ในการวิจัยทดสอบเบื้องต้น

(screening test) ของสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ในการป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบ neurotoxicity effect ของ oxidized LDL ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง
2. ทราบบทบาทของ oxidized LDL ต่อการแสดงออกและการทำงานของ CREB ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการสร้างความทรงจำระดับเซลล์
3. ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเผยแพร่โดยการนำเสนอผลงาน และ/หรือ ตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ
4. เปิดโอกาสให้นักวิจัยรุ่นใหม่ ซึ่งเป็นนิสิตปริญญาโทหรือเอก เข้ามามีส่วนร่วมในการวิจัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

1. สารเคมี

1. Actin antibody (Cell signaling Teahnology[®], Boston, USA)
2. Ammonium persulfate (APS, Sigma, Missouri, USA)
3. Absolute ethanol (AR grade RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
4. Acrylamide/Bis[™] 37:5:1(30:0:8),40% (w/v) (Amresco, OH,USA)
5. BCA protein assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
6. Bromophenol blue(Sigma, Missouri, USA)
7. Copper sulfate (CuSO₄, Ajaxfinechem, Seven Hills, Australia)
8. CREB antibody (Milipore, MA, USA)
9. Phospho-CREB antibody (Cell signaling Teahnology[®], Boston, USA)
10. Dimethylsulfoxide (DMSO, cell culture grade, Sigma, Missouri, USA)
11. Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na₂HPO₄, Ajaxfinechem, Seven Hills, Australia)
12. Dulbecco's Modifide Eagle's Medium-low glucose (Sigma, Missouri, USA)
13. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, , Missouri, USA)
14. Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dehydrate(EDTA, Molecular Biology grade, Sigma, Missouri, USA)
15. Fetal bovine serum (FBS, Gibco, California, USA)
16. Glycine (USP grade, Research Organics, Cleveland, USA)
17. Hydrochloric acid (HCl, Sigma, Missouri, USA)
18. Methanol (AR grade RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
19. Methylene blue (Sigma, Missouri, USA)
20. 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad, Philadelphia, USA)
21. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, ultra pure grade, Amresco[®], Solon, USA)
22. Nuclear extraction kit (Milipore, MA, USA)
23. Penicillin and Streptomycin (Gibco, California, USA)

24. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Bio basic, Markham Ontario, Canada)
25. Potassium chloride (KCl, Ajax finechem Pty Ltd., Taren Point, Australia)
26. Potassium dihydrogen orthophosphate (Ajax finechem Pty Ltd., Taren Point, Australia)
27. Protease inhibitor cocktail (Sigma, Missouri, USA)
28. PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentus, Thermo scientific , Rockford, USA)
29. Peroxidase anti-rabbit IgG (Milipore, MA, USA)
30. Peroxidase anti-mouse IgG (Milipore, MA, USA)
31. Sodium bicarbonate (Na_2CO_3 , culture grade, Sigma Chemical co.)
32. Sodium chloride (NaCl, Ajaxfinechem, Seven Hills, Australia)
33. Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma, Missouri, USA)
34. Sodium orthovanadate (Na_2VO_4 , Ajax finechem Pty Ltd., Taren Point, Australia)
35. SuperSignal® west pico-chemiluminescence substrate (Thermo scientific , Rockford, USA)
36. Trichloroacetic acid (TCA, Sigma, Missouri, USA)
37. Thiobarbituric acid (TBA, Sigma, Missouri, USA)
38. Tris (hydroxymethyl) amino-methane (Molecular biology grade, Research organics, Cleveland, USA)
39. Trypan blue (Cell culture grade, Sigma Missouri, USA)
40. Trypsin/EDTA (0.25%, Gibco, California, USA)
41. Tween-20 (Bio Basic, Markham Ontario, Canada)
42. 1,2-DI-(Dimethylamino)ethane (TEMED, Calbiochem)

Cell line and Plasma

1. Human neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y, ATCC® Manassas VA, USA)
2. Human plasma obtained healthy volunteer from blood bank Naresuan University hospital

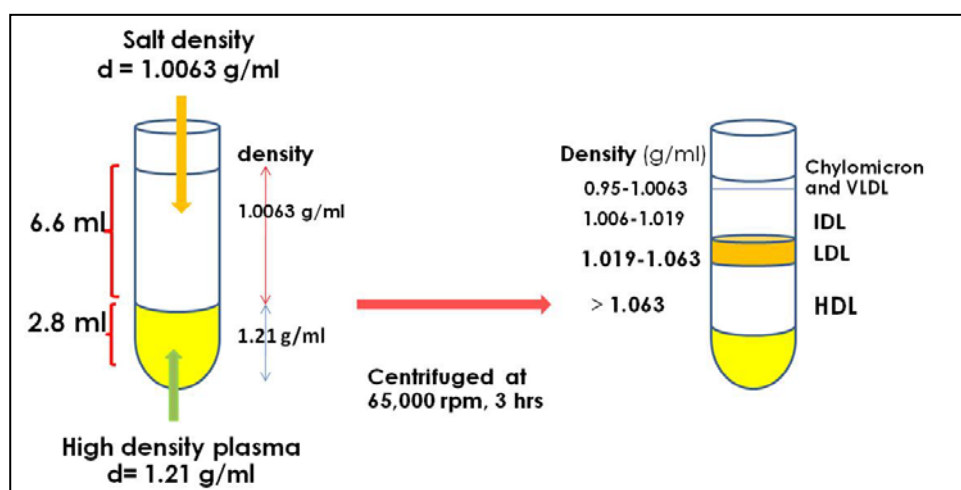
2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. Centrifuge Bottles Polycarbonate (10.4 ml, Beckman, USA)
2. Beckman Coulter Optima L-80 XP Ultracentrifuge (Beckman, USA)
3. Type 90 ti rotor (Beckman, USA)
4. pH meter (S20K, Mettler-Teledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland)
5. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation, Saitama, Japan)
6. Incubator CO₂ (Forma series II, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
7. Laminar flow hood (Heal force®, HF safe 1200/c+, Shanghai, China)
8. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Becman Coulter, NSW, USA)
9. Semi-Dry blotting (Bio-Rad, Philadephia, USA)
10. Vertical gel electrophoresis (Model Mini-PROTEIN Tetra Cell, Bio-Rad laboratory, Philadephia, USA)
11. ChemiDocTM XRS⁺ with image laboratories software (Bio-Rad, Philadephia, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การปั่นแยก LDL (LDL separation)

พลาสมาที่ได้รับจากผู้ป่วยสุขภาพดีจากธนาคารเลือดโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร นำไปปั่นแยก LDL ($d = 1.019-1.063$) ด้วย density gradient ultracentrifugation [13] (รูปที่ 1) โดยพลาสมาจะถูกปรับความหนาแน่นเท่ากับ 1.20 g/ml ด้วย solid potassium bromide (KBr) แล้วปิเปตปริมาตร 2.8 ml ใส่ ultracentrifuge tube ขนาด 10 ml หลังจากนั้น overlaid with gradient salt density (NaCl) ที่มี 0.02 % w/v EDTA ความหนาแน่น 1.006 g/ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 65,000 rpm ที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง ultracentrifuge (type 90 ti rotor) หลังจากนั้นทำการเก็บ LDL โดยใช้ pasture pipette แทะผ่านชั้นของ VLDL, IDL แล้วดูดเฉพาะแถบสีเหลืองส้มบริเวณกลาง tube นำไป dialyze ใน 1x PBS, pH 7.4 ที่มี 10 μ M EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บ LDL กรองด้วย 0.2 μ m pore-size membrane จากนั้นวัดหาปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit แล้วเก็บ LDL ที่ได้ภายใต้ N₂ gas ที่อุณหภูมิ 4.0 °C เพื่อศึกษาการเกิด oxidation ต่อไป



รูปที่ 1 วิธีการแยก LDL โดยวิธี density gradient ultracentrifugation (Beckman Coulter Optima L-80 XP Ultracentrifuge , Type 90ti 65,000 rpm, 15°C)

2. การเกิด oxidation ของ LDL

การทำให้เกิด oxidation ทำได้โดยบ่ม LDL ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 25, 50, μM ที่อุณหภูมิ 37.0 °C ณ เวลาต่างๆ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการเกิด oxidation ด้วยการเติม 0.3 μM EDTA และนำไปวัด lipid oxidation ด้วย TBARs assay ก่อนนำไปทำการทดลองจะทำการกรอง oxidized-LDL ด้วย amicon 30 kDa cut off ที่มี 1x PBS pH 7.4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3600 rpm 5 นาที 5 ครั้ง เพื่อกำจัด EDTA และ CuSO_4 หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit ก่อนนำไปทำการทดลอง

3. การวัด lipid peroxidation ด้วย TBARs assay

การดำเนินไปของปฏิกิริยา oxidation ของ LDL โดยการเหนี่ยวนำ native LDL ที่มีความเข้มข้น 1.0 mg/ml ด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 μM ที่ 37.0 °C เวลา 0-24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.3 μM EDTA แล้วนำไปแช่ใน ice bath ติดตามการเกิด lipid oxidation ด้วย TBARs assay ด้วยการวัดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยจะวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการเติม TBARs reagent (10% trichloroacetic acid, 1% thiobarbituric acid, 5% HCl และ 1% SDS) แล้ว incubate ที่ 90 °C เป็นเวลา 1 ชม หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm

ผู้วิจัยจึงเลือกที่ความเข้มข้นของ 10 μM CuSO_4 ในการเหนี่ยวนำการเกิด oxidation ของ LDL โดยแบ่งความแรงของการเกิด oxidation (degree of oxidation) ตามเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแบ่งเป็น mildly oxidation of LDL (mox-LDL) จะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง และ fully oxidation of LDL (fox-LDL) จะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 16-24 ชั่วโมง

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells line ได้จาก American Type Culture Collection (ATCC) เลี้ยงเซลล์ด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin-streptomycin ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C (saturated humidity atmosphere ที่มี 95% air และ 5% CO_2) ในขวดเลี้ยงเซลล์ 75 cm^3 หลังจากเซลล์เพิ่มจำนวนจนเกือบเต็มพื้นของขวดเลี้ยงเซลล์ (90-95% confluent) จึงทำการ subculture ทำได้โดยลอกเซลล์ออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ (detach) ด้วย 0.25% trypsin ใน Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free phosphate buffer (PBS) ที่มี 0.2 g/L EDTA โดยใช้ split ratio 1:4 ในทุกๆ

3-4 วัน สำหรับการนำไปทดสอบ เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 96 well plate หรือ dish หลังจากเลี้ยงเซลล์ 24 ชม. จะทำการเปลี่ยนอาหารเป็น DMEM/F12 ที่มี 1% FBS และ 10 μ M retinoic acid และเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิด differentiation ที่มีลักษณะของเซลล์ประสาท ซึ่งรวมระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ประมาณ 10 วัน

5. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y human neuroblastoma cell line สามารถวัดได้โดยใช้ MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide) โดยเลี้ยงเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อ well ใน 96 well cell culture plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ differentiate เซลล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน แล้วเปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ใน low serum medium อีก 1 วัน แล้วเติม mildly & fully oxidized LDL และ normal LDL ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 200 μ g/ml โดยใช้ กลุ่มที่ไม่ได้เติมสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมและเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 μ l ของ MTT (5 mg/ml ละลายใน PBS buffer) ใน 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุดการทดสอบ จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม 200 μ l DMSO:EtOH (1:1) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย spectrophotometer

6. การวัด ROS ภายในเซลล์

การวัดการเกิด ROS ที่เกิดภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ทำได้โดยใช้ fluorescence probe โดยเลี้ยง โดยเลี้ยงเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อ well ใน 96 well black side clear bottom plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟีนิล (no phenol red) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ differentiate เซลล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน แล้วเปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ใน 1% serum medium อีก 1 วัน แล้วเติม ความเข้มข้นสุดท้าย 10 μ M ของ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ซึ่งละลายใน methanol ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟีนิล (no phenol red) incubate บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่ 37 °C จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS เพื่อนำ DCFH-DA ที่เหลือออก แล้วเติม mildly & fully oxidized LDL และ native LDL ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 200 μ g/ml ที่เวลา 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ DCFH ได้สารเรืองแสง 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ซึ่งสามารถวัดได้ที่ Ex 485 nm และ Em 530 nm

7. การวัดเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ CREB ด้วย western blotting

เลี้ยง SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่ได้ทำการ differentiation แล้วใน 60 mm dish ด้วย mildly & fully oxidized LDL และ normal ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ในช่วงเวลา 15 และ 60 นาที แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้างด้วย PBS แล้วสกัดโปรตีนจากนิวเคลียส (nuclear protein) ด้วย nuclear extraction kit (Milipore) และวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit (Pierce®) นำโปรตีนปริมาณ 20 $\mu\text{g/ml}$ มาแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (12% SDS-PAGE) แล้วถ่ายโปรตีนลงบน polyvinylidene difluoride (PVDF membrane) หลังจากนั้นทำการ block non-specific binding ด้วย 5% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง membrane ด้วย 0.5%-Tween ใน Tris buffer pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และนำ membrane มาเติม primary antibody : anti-CREB , anti-phospho-CREB 1 ที่ dilute 1:1000 และ anti-actin ที่ dilute 1:10,000 ก่อนจะบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นล้าง membrane ด้วย 0.5% Tween-TBS pH7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จึงให้ทำปฏิกิริยากับ secondary antibody : goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugated and goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated ที่ dilute 1:5000 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.5% Tween-TBS pH7.6 ทั้งหมดทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นเติม chemiluminescence substrate และตรวจสอบแถบการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยเครื่อง ChemidocTM XRS พร้อมกับวิเคราะห์ความหนาของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image LabTM software

8. วิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จาก western blot จะนำไปหาความเข้มของแถบโปรตีนแล้วนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ค่าทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ระหว่างกลุ่ม treatment และกลุ่มควบคุม

บทที่ 3

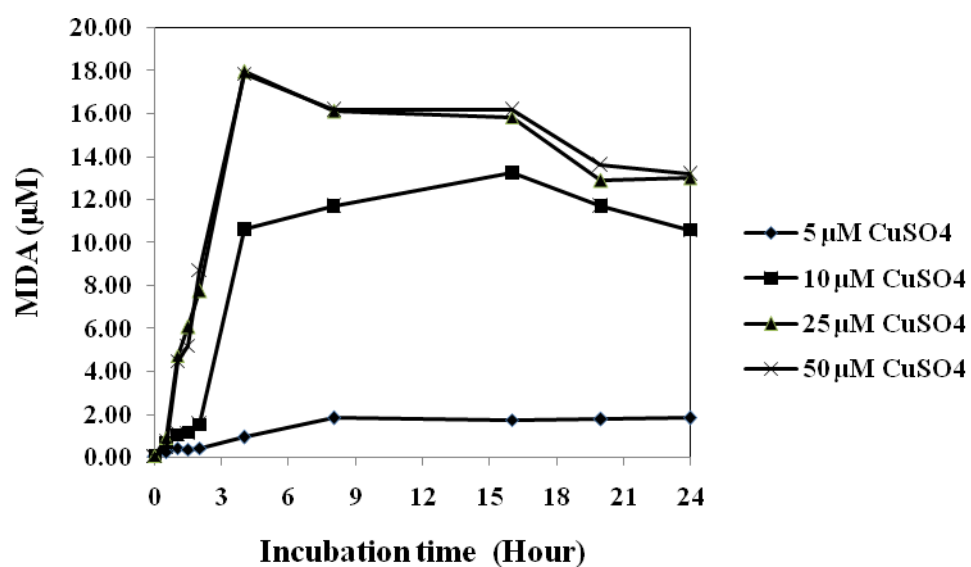
ผลการทดลอง (Results)

การเหนี่ยวนำการเกิด oxidation ของ nativeLDL ด้วย CuSO_4

การศึกษาสภาวะการเกิด oxidation ของ LDL ทำได้โดยการ induce LDL ความเข้มข้น 1.0 mg/ml ด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 μM ที่ 37.0 °C เวลา 0-24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.3 μM EDTA แล้วนำไปแช่ใน ice bath จากนั้นนำไปติดตามการเกิด lipid oxidation ด้วย TBARS assay ซึ่งจะเป็นการวัดผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ lipid peroxidation หรือ MDA แสดงผลดังรูปที่ 2

จากผลการทดลองพบว่า CuSO_4 สามารถเหนี่ยวนำ LDL ให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นโมเดลในการเกิด oxidation แต่ต้องขึ้นอยู่กับอัตราส่วนที่เหมาะสมของ LDL และ CuSO_4 จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิด oxidation ในรูปที่ 2 ลักษณะกราฟที่เกิดจะแบ่งออกเป็น 3 phase คือ lag phase, propagation phase และ termination phase[14] โดยพบว่า LDL ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ induce ด้วย 25 และ 50 μM CuSO_4 จะไม่พบระยะ lag phase โดยจะเกิด propagation phase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และ termination phase ส่วนความเข้มข้นที่ 10 μM จะมีระยะ lag phase เกิดขึ้น ที่ความเข้มข้นของ CuSO_4 น้อยๆ ยังไม่เกิด oxidation หรือเกิดขึ้นน้อยมาก (lag phase) เนื่องจากอัตราส่วนของ LDL และ CuSO_4 ไม่เหมาะสม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CuSO_4 เพิ่มขึ้น การเกิด oxidation ก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (propagation phase) และเริ่มคงที่หรือลดลงเล็กน้อยเมื่อใช้ความเข้มข้นของ CuSO_4 สูงๆ (termination phase)

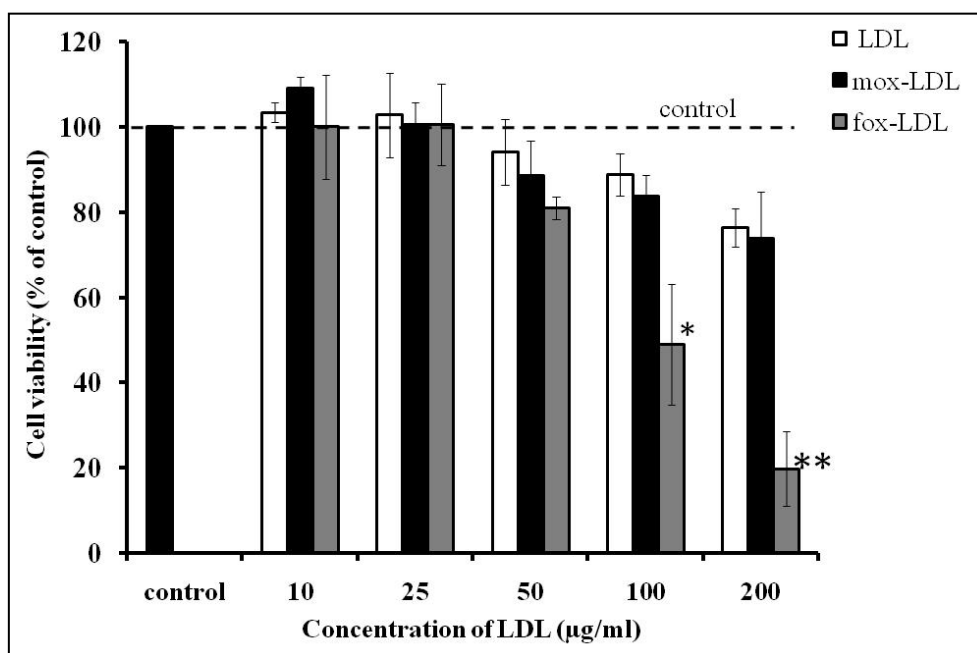
ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกที่ความเข้มข้นของ 10 μM CuSO_4 ในการเหนี่ยวนำการเกิด oxidation ของ LDL โดยแบ่งความแรงของการเกิด oxidation (degree of oxidation) ตามเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแบ่งเป็น mildly oxidation of LDL(mox-LDL) จะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง และ fully oxidation of LDL(fox-LDL) จะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 16-24 ชั่วโมง ดังรูปที่



รูปที่ 2 การเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ LDL LDL ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการ oxidation ด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 μM ในช่วงระยะเวลาต่างๆ

ผลของ mox,fox-LDL และ LDL ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์

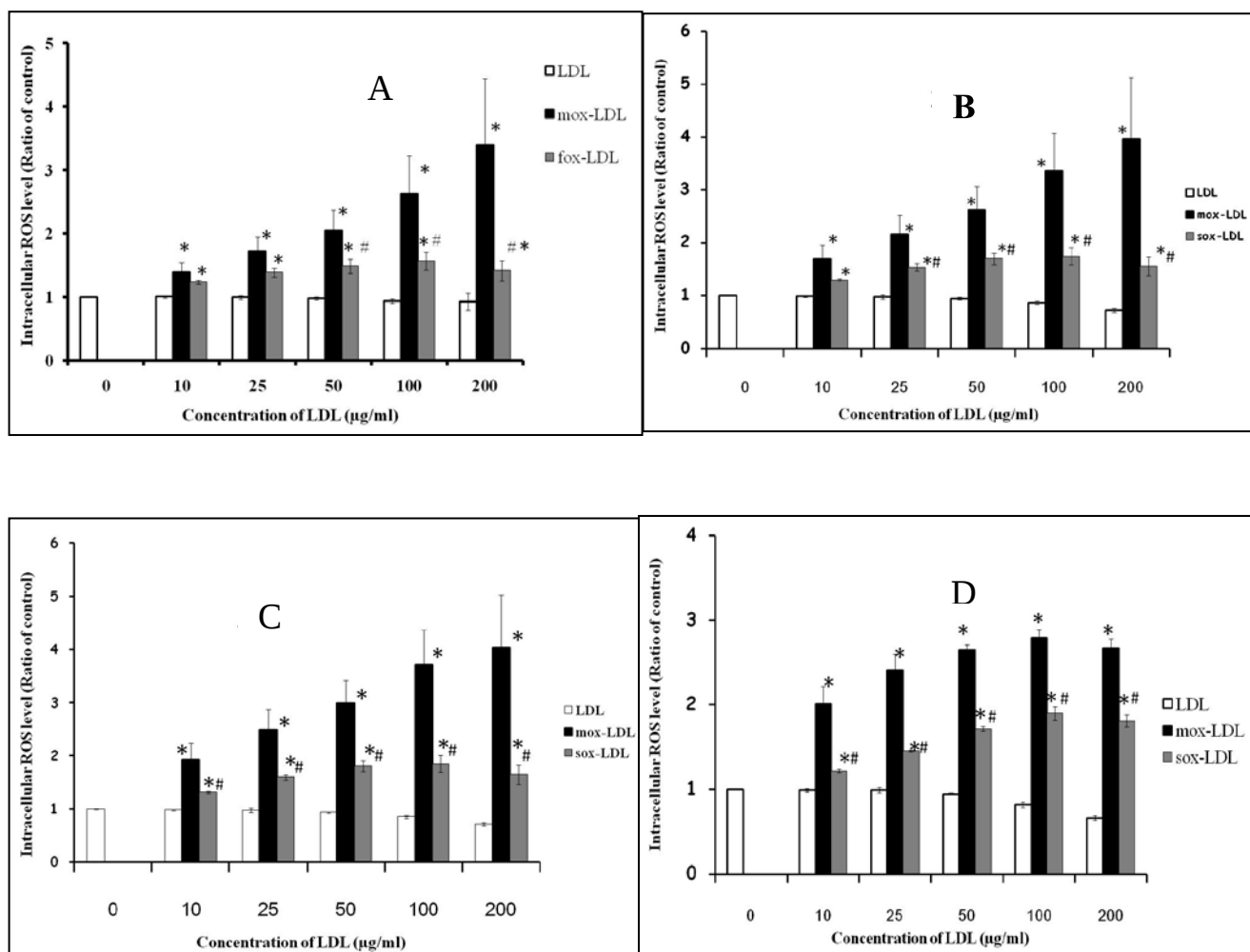
ในการทดสอบผลของ mildly oxidized LDL (mox-LDL), fully oxidized LDL (fox-LDL) and native LDL (nLDL) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ของเซลล์ SH-SY5Y neuroblastoma cell โดยเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y neuroblastoma cell ที่ได้ทำการ differentiation แล้วมาทดสอบด้วย mox & fox LDL และ nLDL ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (cell viability) ด้วย MTT assay พบว่า SH-SY5Y human neuroblastoma cell ที่ทดสอบด้วย fox-LDL การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของ fox-LDL ที่ทดสอบ โดยจะเห็นผลชัดเจนที่ความเข้มข้น 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 3) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ nLDL ตามลำดับ แต่สำหรับเซลล์ที่เลี้ยงด้วย mox-LDL และ nLDL เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นกัน พบว่า ไม่มีผลต่อการลดลงของการมีชีวิตรอดของเซลล์ ถึงแม้ว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ค่อยๆลดลงที่ปริมาณของ mox-LDL และ nLDL ที่ 100 และ 200 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเหนี่ยวนำการเกิดออกซิเดชันของ LDL ด้วย CuSO_4 ดังนั้นผู้วิจัยก็ได้ทำการกรอง CuSO_4 ด้วย amicon tube ที่มี PBS buffer ก่อนนำไปทำการทดสอบทุกครั้ง เนื่องจากอาจมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ และทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 μM พบว่า 1 μM CuSO_4 ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่ข้อมูลไม่ได้แสดงในรูปแบบ



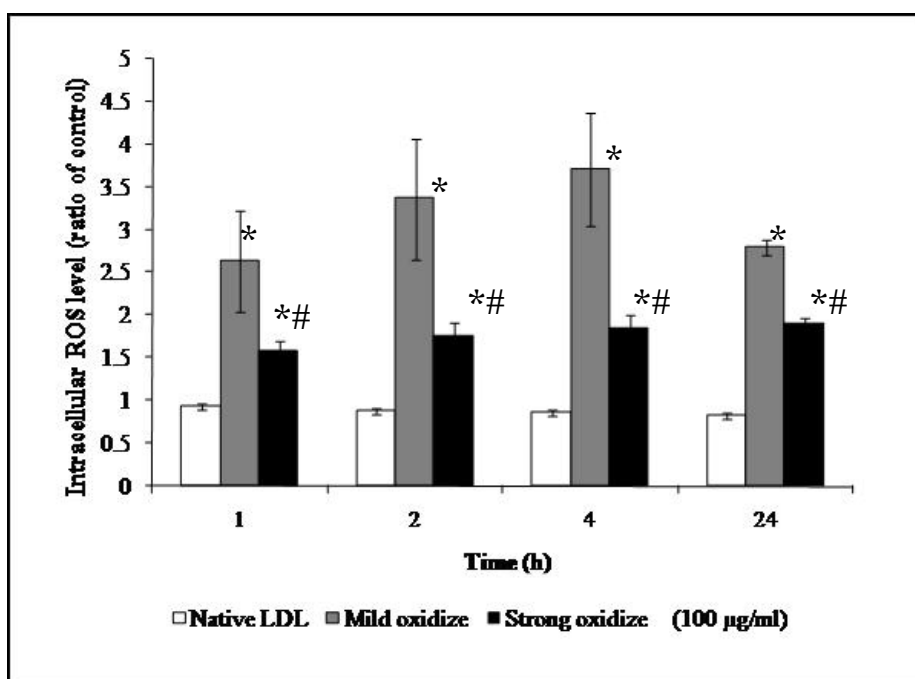
รูปที่ 3 ผลของ LDL ต่อการมีชีวิตรอด SH-SY5Y neuroblastoma cell LDL ที่ทดสอบด้วย ได้แก่ nLDL, mox และ fox-LDL โดยวัดที่ด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ แสดงผลเป็น % of control (Mean $\pm$ SEM) จาก 4 การทดลอง, * $p \leq 0.05$ เทียบกับ Control, และ ** $p \leq 0.01$ เทียบกับ native LDL, กับ mild oxidize LDL

ผลของ mox, fox-LDL และ LDL ต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ SH-SY5Y neuroblastoma

กระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ที่มากเกินไป เชื่อว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลเสียในกระบวนการทำงานของเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ประสาทซึ่งมีงานวิจัยพบว่า การเกิดภาวะ oxidative stress เป็นปัจจัยหนึ่งในกระบวนการเกิด neurodegenerative disorder เช่น โรคอัลไซเมอร์ ในการทดสอบผลของ mox และ fox-LDL and nLDL ต่อการเกิดภาวะออกซิเดชันของเซลล์ SH-SY5Y neuroblastoma โดยเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทำการ differentiation แล้วมาทดสอบด้วย mox และ fox-LDL และ nLDL ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ แล้วทำการวัดการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS) ภายในเซลล์ SH-SY5Y neuroblastoma ด้วย intracellular ROS assay โดยใช้ fluorescence probe ที่เวลา 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ที่ 1 ชั่วโมง เซลล์ที่ทดสอบด้วย mox และ fox-LDL มีการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) โดยเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณ mox และ fox-LDL ที่ทำการทดสอบ แต่ที่น่าสนใจคือ mox-LDL มีการสร้างอนุมูลอิสระที่มากกว่า fox-LDL โดยเฉพาะความเข้มข้นที่ 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเห็นชัดเจนที่เวลา 2, 4, และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 4) ในขณะที่ nLDL ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการเปรียบเทียบ ผลของเวลาต่อการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS) ที่เกิดจากการทดสอบด้วย mox และ fox-LDL and nLDL ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 4 ชั่วโมง ที่เซลล์ทดสอบด้วย mox-LDL มีการสร้างอนุมูลอิสระมากที่สุด และมากกว่า fox-LDL และการสร้างอนุมูลอิสระลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมงซึ่งอาจจะเกิดจากการที่เซลล์เริ่มมีการตายเกิดขึ้น (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ผลของ LDL ต่อการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell เซลล์ถูกเลี้ยงด้วย nLDL, mox และ fox-LDL ที่ความเข้มข้น 10-200 μg/ml ที่เวลา 1, 2, 4, และ 24 ชั่วโมง ดังรูป A, B, C และ D ตามลำดับ กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ แสดงผลเป็น ratio of control (Mean ± SEM) จาก 4 การทดลอง, * $p \leq 0.05$ เทียบกับ Control, และ # $p \leq 0.05$ เทียบกับ mox-LDL

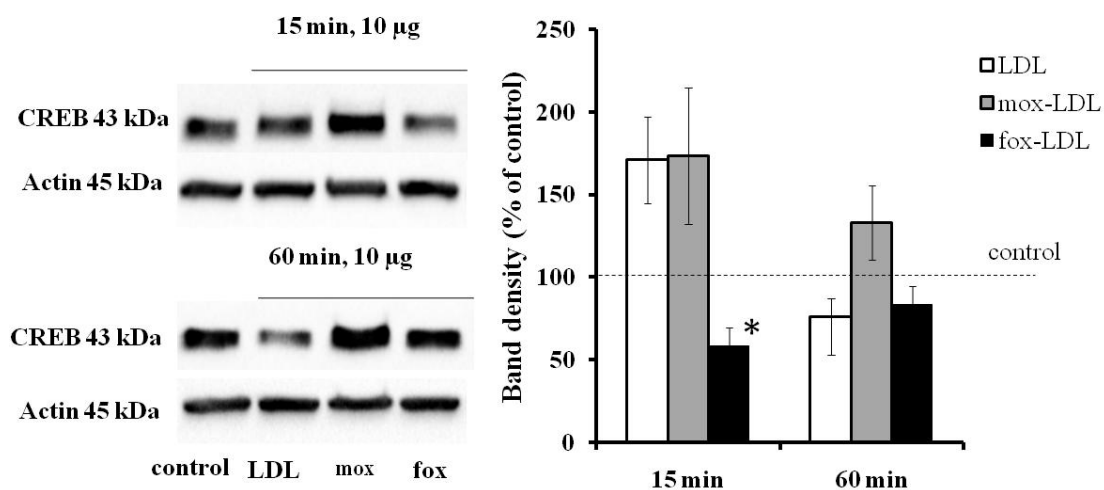


รูปที่ 5 ผลของ LDL (100 µg/ml) เวลาต่อการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ในเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell ที่เวลาต่างๆ เลี้ยงเซลล์ด้วย nLDL, mox และ fox-LDL ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml และทดสอบ intracellular ROS ที่เวลา 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง แสดงผลเป็น ratio of control (Mean ± SEM) จาก 4 การทดลอง, * $p \leq 0.05$ เทียบกับ Control, และ # $p \leq 0.05$ เทียบกับ mox-LDL

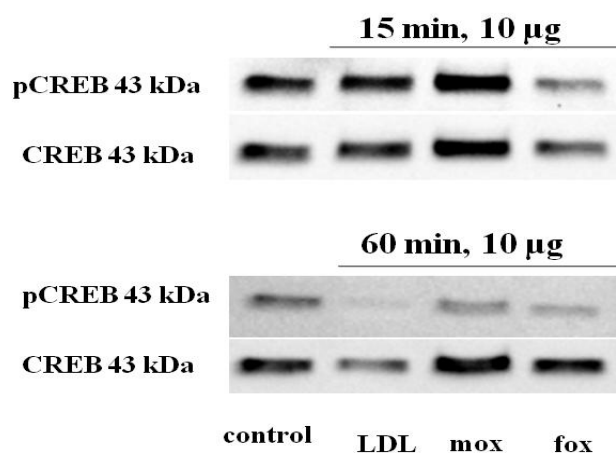
ผลของ mox, fox-LDL และ LDL ต่อการทำงานของโปรตีน CREB

กลไกการสร้างความจำทางชีวโมเลกุลเชื่อว่า CREB เป็น transcription factor ที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนข้อมูลที่เซลล์ประสาทเพิ่งจะได้รับ ซึ่งจัดเป็น short-term memory ไปเป็นความทรงจำระยะยาวหรือ long-term memory โดยผ่านการทำงานของ CREB ซึ่งเป็น transcription factor ที่พบได้ในนิวเคลียสของเซลล์หลายชนิดรวมถึงเซลล์ประสาท CREB สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการ phosphorylation ได้จากหลายวิธีทางโดยหลักแล้วจะมาจากการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP หรือ Ca^{2+} ในไซโทพลาสซึมและผ่านไปทาง protein kinase หลายชนิด จากนั้น phosphorylated CREB (pCREB) จะจับกับสายดีเอ็นเอบริเวณส่วนที่เรียกว่า cAMP-regulated element (CRE) แล้วทำงานร่วมกับโมเลกุลต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้เริ่มกระบวนการการถอดรหัสของยีนส์และสร้างโปรตีน ซึ่งโปรตีนนี้สามารถก่อให้เกิดการเรียนรู้และความจำในระยะยาว การทดลองนี้ได้ศึกษาโปรตีนสองตัว คือ phosphorylated CREB (pCREB) ซึ่งเป็น active form ของ CREB โดยทำการเปรียบเทียบกับ CREB โดยเลี้ยง SH-SY5Y neuroblastoma cell line 2×10^6 เซลล์ ที่ได้ทำการ differentiation แล้วใน 60 mm dish ด้วย mildly และ fully oxidized LDL และ native LDL ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ในช่วงเวลา 15 และ 60 นาที แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้างด้วย PBS แล้วทำการเก็บโปรตีนจากนิวเคลียส (nuclear protein) ด้วย nuclear extraction kit โดยเก็บส่วน nuclear fraction และคำนวณหาปริมาณโปรตีนเพื่อนำมาทำการตรวจสอบแถบโปรตีนด้วย วิธี western blotting

จากการทดลองพบว่า ที่ 15 นาที เซลล์ที่ทดสอบด้วย nLDL และ mox-LDL มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกหรือระดับของโปรตีน CREB แต่เซลล์ที่ทดสอบด้วย fox-LDL มีการลดลงของระดับของโปรตีน CREB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วย nLDL และ mox-LDL ขณะที่เวลา 60 นาที เซลล์ที่ทดสอบด้วย nLDL และ fox-LDL มีการลดลงของระดับโปรตีน CREB แต่เซลล์ที่ทดสอบด้วย mox-LDL มีการเพิ่มขึ้นของระดับของโปรตีน CREB เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ที่ทดสอบด้วย mox-LDL ที่เวลา 15 และ 60 นาที ก็พบว่าการลดลงของระดับของโปรตีน CREB (รูปที่ 6) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เวลาที่มากขึ้น อาจมีผลต่อการสร้างโปรตีน CREB และอาจมีผลต่อการทำงานของโปรตีน CREB ในรูปของ pCREB ได้ หลังจากนั้นจึงได้นำส่วนของ nuclear fraction มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน pCREB ซึ่งเป็นรูป active form ของ CREB พบว่า ผลการทดลองสอดคล้องไปในทางเดียวกับการลดลงของระดับของโปรตีน CREB (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 ผลของ LDL ต่อการทำงานของโปรตีน CREB ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell เลี้ยงเซลล์ด้วย LDL, mox และ fox-LDL ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 15 และ 60 นาที และวัดการทำงานของ CREB ด้วยวิธี western blotting แสดงผลเป็น % of control (Mean $\pm$ SEM) จาก 4 การทดลอง, * $p \leq 0.05$ เทียบกับ Control



รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบผลของการแสดงออกของโปรตีน pCREB และ CREB ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell เลี้ยงเซลล์ด้วย LDL, mox และ fox-LDL ความเข้มข้น 10 μg/ml ที่เวลา 15 และ 60 นาที จากนั้นทำการเก็บโปรตีนในส่วน nuclear fraction ใช้ปริมาณโปรตีน 20 μg/ml ของเซลล์มาแยกด้วย 12% SDS-PAGE เพื่อดูแถบโปรตีนของ CREB และ pCREB ด้วย western blotting

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง (Discussion & Conclusion)

อภิปรายผลการทดลอง

ในภาวะที่มีระดับไขมันในเลือดสูง ส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับระดับของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่ง LDL สามารถเกิดกระบวนการออกซิเดชันได้ง่ายและเกิดอันตราย เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ แต่จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเกิดภาวะดังกล่าวยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์ประสาทและทำให้เซลล์ตายจากการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียม และ อนุมูลอิสระ (ROS) ด้วย แต่กลไกที่เกี่ยวข้องกับความจำด้านชีวเคมียังไม่ชัดเจน

และรายงานการศึกษาในปัจจุบันพบความสัมพันธ์ระหว่าง ผู้ที่มีระดับ LDL ในเลือดสูง สัมพันธ์กับการลดลงของ cognitive score [6] และ ในพลาสมาของกลุ่มที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ มีระดับ LDL protein carbonyl content ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม [7] นอกจากนี้ พบว่าในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์มีระดับของ oxidized-LDL antibody ที่สูงกว่าคนปกติ [8] การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า ในกระต่ายที่ได้รับการเลี้ยงด้วยอาหารที่มี cholesterol สูง มีการสูญเสียการทำงานในด้านเกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ รวมถึงรบกวนหน้าที่ของ Blood brain barrier (BBB) ทำให้สูญเสียการทำงานและมีการ leakage ของ (BBB) [15] และมีการปรากฏของ apo-B ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ LDL ในสมอง[16] ยังพบอีกว่า cholesterol สูงยังทำให้มีการเพิ่มการสะสมของ โปรตีนอะมัยลอยด์เบตา(A β) [10] ซึ่งเกิดจากกระบวนการ proteolysis ของ amyloid precursor protein (APP) โปรตีน A β ก่อให้เซลล์เกิดการสูญเสียการทำงานและเป็นสาเหตุของกระบวนการเกิดโรคอัลไซเมอร์ แต่กลไกที่ cholesterol ที่เกี่ยวข้องกับด้านการเรียนความจำในทางชีวเคมียังไม่ทราบชัดเจน

ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงบทบาทของ oxidized LDL ต่อการเปลี่ยนแปลงของ CREB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ซึ่ง LDL ที่ได้จะทำการปั่นแยกมาจาก plasma ที่ได้รับจาก blood bank ของมหาวิทยาลัยนเรศวร หลังจากนั้นทำการกระตุ้นให้เกิดการ oxidation ด้วยโลหะหนัก ในที่นี้ใช้ CuSO₄ และทดสอบการเกิด oxidation ของ LDL ด้วย TBARs assay ซึ่งเป็นการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก lipid peroxidation ของไขมันภายใน LDL (รูปที่2) และได้ทำการ

ทดลองหาความเข้มข้นของ LDL และ CuSO_4 ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ซึ่งพบว่า LDL ที่ 1mg/ml และ CuSO_4 ที่ 10 μM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม (รูปที่2) นอกจากนี้ พบว่าเมื่อทำการ oxidation ของ LDL ด้วย CuSO_4 การเกิด lipid peroxidation จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมงสำหรับการเกิด mox-LDL และ 16 -24 ชั่วโมง สำหรับ fox-LDL (รูปที่2) ในการนำไปทดสอบการตายของเซลล์ เนื่องจากผู้วิจัยสันนิษฐานว่า oxidized LDL ที่ทำให้เซลล์ตายนั้น คาดว่าไม่ได้อยู่ในสภาพของ lipoprotein particle ที่เหมาะสม มีการแตกสลายของไขมัน ส่งผลให้ lipoprotein particle เสียไป

ในการทดสอบ neurotoxicity ต่อเซลล์ประสาทของ oxidized LDL พบว่า SH-SY5Y human- neuroblastoma cell line ที่ทดสอบด้วย fox-LDL การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของ fox-LDL ที่ทดสอบ โดยจะเห็นผลชัดเจนที่ความเข้มข้น 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่3) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ LDL ตามลำดับ แต่สำหรับเซลล์ที่เลี้ยงด้วย mox-LDL และ LDL เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นกัน พบว่า ไม่มีผลต่อการลดลงของการมีชีวิตรอดของเซลล์ ถึงแม้ว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ค่อยๆลดลงที่ปริมาณของ mox-LDL และ LDL ความเข้มข้นสูงๆ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า oxidized LDL มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท ทำให้เซลล์ประสาทตาย ซึ่ง oxidized LDL อาจทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase[3] นอกจากนี้ oxidized LDL ยังเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) นอกจากนี้ยังทำให้ระดับ Ca^{2+} แคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นมากจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้[7]

แต่สิ่งที่น่าสนใจคือ ผู้วิจัยพบว่าเมื่อทดสอบการสร้าง oxidative stress ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ด้วย intracellular ROS assay พบว่า mox-LDL ในความเข้มข้น 50 – 200 $\mu\text{g/ml}$ กระตุ้นการสร้าง ROS มากกว่า fox-LDL (รูปที่ 4) ซึ่งผลเห็นชัดเจนที่เวลา 4 ชั่วโมง โดยผลนี้ขึ้นตามความเข้มข้นของ mox-LDL ซึ่งอาจชี้ให้เห็นว่า lipoprotein particle ของ mox-LDL ยังคงสภาพของการเกิดออกซิเดชัน มากกว่า fox-LDL ซึ่งการที่ mox-LDL ยังคงสภาพของการเกิดออกซิเดชันทำให้เซลล์ประสาทสามารถ uptake mox-LDL เข้าไปภายในเซลล์มากกว่าจึงเกิดภาวะ oxidative stress มากกว่า และจากการทบทวนวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่า ในเซลล์ประสาทจะมี receptor ที่สามารถจับกับ LDL และ oxidized LDL เช่น low density lipoprotein receptor (LDLR), LDL receptor-related protein 1(LRP-1), apoE type 2 receptors, The lectin like oxLDL receptor 1(LOX-1) และ The toll-like receptor-4(TLR4) [3, 5, 17] ทำให้

เซลล์ประสาทสามารถ uptake mox-LDL ได้มากกว่า fox-LDL ในขณะที่ fox-LDL ก่อให้เกิดอันตรายที่ extracellular ของเซลล์เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation เช่น MDA ที่ทำให้เซลล์ตาย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้ง mox-LDL และ fox-LDL มีอันตรายต่อเซลล์ประสาท และระดับของการเกิดออกซิเดชันก็มีผลต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ด้วย

ในปัจจุบันเชื่อว่าโปรตีนที่ชื่อ cAMP response element binding protein (CREB) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความทรงจำ ซึ่ง CREB เป็น transcription factor ที่พบได้ในนิวเคลียสของเซลล์หลายชนิดรวมถึงเซลล์ประสาท CREB สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการ phosphorylation ได้จากหลายวิธีทาง โดยหลักแล้วจะมาจากการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP หรือ Ca^{2+} ในไซโทพลาสซึมและผ่านไปทาง protein kinase หลายชนิด จากนั้น phosphorylated CREB (pCREB) จะจับกับสายดีเอ็นเอบริเวณส่วนที่เรียกว่า cAMP-regulated element (CRE) แล้วทำงานร่วมกับโมเลกุลต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้เริ่มกระบวนการการถอดรหัสของยีนส์ต่อไป [11, 18-20] แต่การเปลี่ยนแปลงที่เป็นผลมาจาก protein kinase โดยตรงจะคงอยู่เพียงแค่ระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น (short-term) ส่วนการที่ protein kinase กระตุ้นการทำงานของ CREB จะทำให้เกิดการสังเคราะห์เป็นโปรตีนขึ้นมา ซึ่งโปรตีนนี้สามารถก่อให้เกิดการเรียนรู้และความจำได้เช่นเดียวกัน แต่การที่เซลล์เก็บความสามารถนั้นให้อยู่ในรูปโปรตีนจะมีการคงอยู่ได้นานกว่า (long-term) [11, 18, 20] ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ใน cerebral granule neuron cell ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน pCREB ลดลงภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง แต่การลดลงของการแสดงออกของโปรตีน CREB (Total-CREB) จะพบการเปลี่ยนแปลงภายใน 2 ชั่วโมง [21] และยังพบอีกว่า ในสมองของหนูที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วยโปรตีน $A\beta$ ยังลดการแสดงออกของโปรตีน CREB ในส่วน hippocampus และ cortex ด้วย [12]

ในการศึกษานี้พบว่า ที่ 15 นาที เซลล์ที่ทดสอบด้วย nLDL และ mox-LDL มีการเพิ่มขึ้นของการ activation ของโปรตีน CREB แต่เซลล์ที่ทดสอบด้วย fox-LDL มีการลดลงของการ activation ของโปรตีน CREB ขณะที่เวลา 60 นาที เซลล์ที่ทดสอบด้วย LDL และ fox-LDL มีการลดลงของการ activation โปรตีน CREB แต่เซลล์ที่ทดสอบด้วย mox-LDL มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน CREB เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ที่ทดสอบด้วย mox-LDL ที่เวลา 15 และ 60 นาที ก็พบว่าการลดลงของการ activation ของโปรตีน CREB ลดลง (รูปที่ 6) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เวลาที่มากขึ้น อาจมีผลต่อการ activation ของโปรตีน CREB และอาจมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน pCREB หลังจากนั้นก็ได้ นำส่วนของ nuclear fraction มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน

pCREB ซึ่งเป็นรูป active form ของ CREB พบว่า ผลการทดลองสอดคล้องไปในทางเดียวกับการลดลงของการ activation ของโปรตีน CREB (รูปที่7) จากการทดลองนี้อาจชี้ให้เห็นว่าทั้ง LDL และ oxidized LDL มีผลต่อการ activation ของโปรตีน CREB ซึ่งอาจส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน pCREB และ CREB ตามมาได้

ดังนั้น จากหลักฐานและงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว เป็นไปได้ว่าการที่ LDL และ oxidized LDL เหนี่ยวนำการเกิดภาวะ oxidative stress อาจไปมีผลต่อการ activation ของ CREB และรบกวนกระบวนการ phosphorylation CREB ได้ ถึงแม้ว่าการทดลองนี้จะเป็น การทดลองใน cell culture model แต่ก็สามารถอธิบายได้ว่า การที่มีระดับไขมัน ในเลือดสูง หรือ LDL และ oxidized LDL อาจรบกวนกลไกการสร้างความจำของเซลล์ประสาท ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็น โรคอัลไซเมอร์ได้ โดยไปลดการทำงานของโปรตีน CREB ในเซลล์ประสาท

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง ระดับการเกิดออกซิเดชันของ LDL มีผลต่อกระบวนการสร้างภาวะ oxidative stress และความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท ซึ่งการเกิดออกซิเดชันแบบ fully oxidized LDL จะทำให้เกิดอันตรายที่ extracellular และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายเนื่องจากผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation (MDA) ขณะที่ mildly oxidized LDL มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง oxidative stress ภายในเซลล์ประสาทอาจเกิดจากการ uptake oxidized-LDL เข้าไปภายในเซลล์ และ ทั้ง LDL, mox และ fox-LDL มีผลต่อการ activation ของโปรตีน CREB โดยมีแนวโน้มลดการแสดงออกของโปรตีน CREB โดยเกิดจากการรบกวนด้วยภาวะ oxidative stress และอาจมีกลไกอื่นที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน CREB จึงควรมีการศึกษาถึงกลไกเชิงลึกเพิ่มเติมทั้ง LDL และ oxidized - LDL ต่อการทำงานของ CREB และเมื่อทราบถึงกลไกที่ชัดเจนแล้ว การศึกษาเพื่อหาสารซึ่งมีคุณสมบัติไปยับยั้งที่กลไกดังกล่าวก็อาจจะเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยและพัฒนายาใหม่ที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (Reference)

- [1] Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., and Arrighi, H. M. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease, **Alzheimer's & Dementia**, 3(3), 186-191.
- [2] Keller, J. N., Hanni, K. B., and Markesbery, W. R. (1999) Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Neuronal Death, **Journal of Neurochemistry**, 72(6), 2601-2609.
- [3] Nowicki, M., Serke, H., Kosacka, J., Müller, K., and Spanel-Borowski, K. (2010) Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) induces cell death in neuroblastoma and survival autophagy in schwannoma cells, **Experimental and Molecular Pathology**, 89(3), 276-283.
- [4] Keller, J. N., Hanni, K. B., and Markesbery, W. R. (1999) Oxidized low-density lipoprotein induces neuronal death: implications for calcium, reactive oxygen species, and caspases, **Journal of Neurochemistry**, 72(6), 2601-2609.
- [5] Nowicki, M., Müller, K., Serke, H., Kosacka, J., Vilser, C., Ricken, A., and Spanel-Borowski, K. (2010) Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)-induced cell death in dorsal root ganglion cell cultures depends not on the lectin-like oxLDL receptor-1 but on the toll-like receptor-4, **Journal of Neuroscience Research**, 88(2), 403-412.
- [6] Helzner, E. P., Luchsinger, J. A., Scarmeas, N., Cosentino, S., Brickman, A. M., Glymour, M. M., and Stern, Y. (2009) Contribution of vascular risk factors to the progression in Alzheimer disease, **Archives of Neurology**, 66(3), 343-348.
- [7] Aldred, S., Bennett, S., and Mecocci, P. (2010) Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer's disease, **Clinical Biochemistry**, 43(3), 267-271.
- [8] Kankaanpää, J., Turunen, S. P., Moilanen, V., Hörkkö, S., and Remes, A. M. (2009) Cerebrospinal fluid antibodies to oxidized LDL are increased in Alzheimer's disease, **Neurobiology of Disease**, 33(3), 467-472.

- [9] Barco, A., Pittenger, C., and Kandel, E. R. (2003) CREB, memory enhancement and the treatment of memory disorders: promises, pitfalls and prospects, **Expert Opin Ther Targets**, 7(1), 101-114.
- [10] Thirumangalakudi, L., Prakasam, A., Zhang, R., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., Kindy, M. S., and Bhat, N. R. (2008) High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice, **Journal of Neurochemistry**, 106(1), 475-485.
- [11] Benito, E., and Barco, A. (2010) CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models, **Trends in Neurosciences**, 33(5), 230-240.
- [12] Pugazhenth, S., Wang, M., Pham, S., Sze, C. I., and Eckman, C. B. (2011) Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in Abeta-treated rat hippocampal neurons, **Molecular Neurodegenerative**, 6, 60.
- [13] Vieira, O. V., Laranjinha, J. A., Madeira, V. M., and Almeida, L. M. (1996) Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants, **Journal of Lipid Research**, 37(12), 2715-2721.
- [14] Zarev, S., Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Beaudeau, J.-L., Gardès-Albert, M., and Legrand, A. (1999) Major differences in oxysterol formation in human low density lipoproteins (LDLs) oxidized by OH/O₂⁻ free radicals or by copper, **FEBS Letters**, 451(2), 103-108.
- [15] Sparks, D. L., Kuo, Y. M., Roher, A., Martin, T., and Lukas, R. J. (2000) Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations, **Annals of the New York Academy of Sciences**, 903, 335-344.
- [16] Namba, Y., Tsuchiya, H., and Ikeda, K. (1992) Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease, **Neuroscience Letters**, 134(2), 264-266.

- [17] Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., and Schwartz, M. (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis, **Nat Cell Biol**, 9(9), 1081-1088.
- [18] Tully, T., Bourtchouladze, R., Scott, R., and Tallman, J. (2003) Targeting the CREB pathway for memory enhancers, **Nat Rev Drug Discov**, 2(4), 267-277.
- [19] West, A. E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., Takasu, M. A., Tao, X., and Greenberg, M. E. (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98(20), 11024-11031.
- [20] Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., and Kida, S. (1998) CREB AND MEMORY, **Annual Review of Neuroscience**, 21(1), 127-148.
- [21] See, V., and Loeffler, J. P. (2001) Oxidative stress induces neuronal death by recruiting a protease and phosphatase-gated mechanism, **Journal of Biological Chemistry**, 276(37), 35049-35059.

ผลลัพธ์ (Output)

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมระดับชาติ

รูปแบบ การนำเสนอโปสเตอร์ และ full paper proceeding (บทความวิจัยแนบท้ายภาคผนวก)
งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 38 (วทท 38) วิทยาศาสตร์
เพื่ออนาคตของมวลมนุษยชาติ ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 17-19
ตุลาคม 2555



Oxidized Low Density Lipoprotein Induces Oxidative Stress and Reduces Activation of CREB in Neuroblastoma Cells



Panit Yamcheun*, Nanteetip Limpeanchob**

Department of Pharmacy Practice, Pharmacological Laboratory Research, Faculty of Pharmaceutical Sciences

and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

*Presenting author, **Corresponding author, E-mail address: nanteetip1@yahoo.com, nanteetip1@nu.ac.th



Introduction

Alzheimer disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly. The amount of suffering people from AD were 35.6 million individuals and over 106.2 million of these affection is predicted to AD by 2050 worldwide. A number of studies reveal that hypercholesterolemia may lead to a progressive of AD. Hypercholesterolemia is mostly related to high level of LDL that is vulnerable to oxidation. Extensive data have reported that lipidperoxidation and oxidative stress associated in a progressive of AD but the understanding of mechanism is not well document. CREB is a transcription factor protein involving the formation of long term memory. Phosphorylated CREB can be induced transcriptional activation leading to gene products that important role in synaptic plasticity and cognitive function and CREB-mediated gene expression is impaired in AD brain and animal models. This study was aimed to test the effect of LDL and its oxidized form on CREB activation in SHSY-5Y neuroblastoma cells. Mildly oxidized (mox-LDL) and fully oxidized-LDL (fox-LDL) were tested in comparison with native LDL.

Objectives

1. To determine the effect of oxidized-LDL on cell viability and cellular oxidative stress in SHSY-5Y neuroblastoma cells.
2. To determine the effect of oxidized-LDL on the activation of CREB in SHSY-5Y neuroblastoma cells.

Methods

1. Preparation of LDL

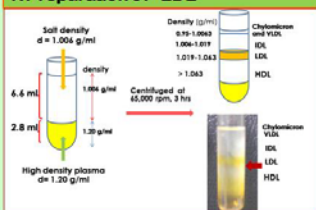


Figure 1. A separation of LDL by density gradient ultracentrifugation at 65,000 rpm, 15°C for 3 h with type 90Ti Rotor

4. Cell culture preparation

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells
 DMEM/F12, 10% FBS
 2 day
 10 µM RetA, 1% FBS
 6 day
 DMEM/F12, 1% FBS
 2 day
 Differentiated SHSY-5Y cells (10 days)

6. Measurement of ROS production

Differentiated SHSY-5Y cells + 10 µM DCFH-DA
 30 min
 Remove DCFH-DA & Wash with 1X PBS
 Treat LDL, mox & fox-LDL
 1, 2, 4, 24 h
 Fluorescence (Ex 485 nm, Em 535 nm)

2. Preparation of oxidized LDL

LDL + 10 µM CuSO₄
 97 °C
 2 h for mox-LDL
 16-24 h for fox-LDL
 Lipidperoxidation by TBAR assay
 mox & fox-LDL filter through 30 kDa amicon

3. TBAR assay

mox & fox-LDL + TBAR reagent
 (40% TCA, 1.4% TBA, 8% HCl)
 Incubate 90 °C, 1 h
 Fluorescence (Ex 535 nm, Em 596 nm)

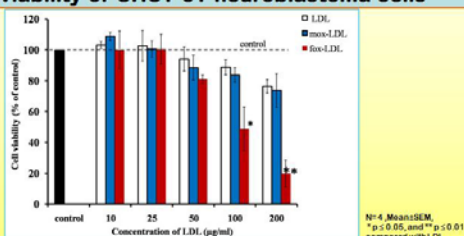
5. MTT assay

Differentiated SHSY-5Y cells + LDL, mox & fox-LDL
 24 h
 Add MTT solution
 2 h
 Remove & Add DMSO: EtOH 1:1
 Absorbance 595 nm

7. Western blot analysis

Differentiated SHSY-5Y cells (10 days)
 + 10 µg/ml LDL, mox-LDL & fox-LDL
 15, 60 min
 Nuclear extract
 Nuclear protein
 Western blotting

Figure 2. The viability of SHSY-5Y neuroblastoma cells



Acknowledgements

This study was financial supported by Naresuan University (R2554B055) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC).

Results

Figure 3. Intracellular ROS production.

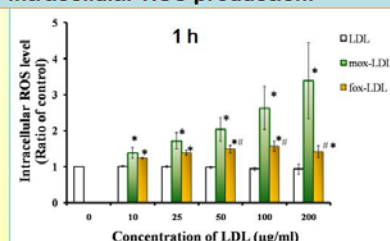


Figure 4. The effects of LDL, mox & fox on the activation of CREB

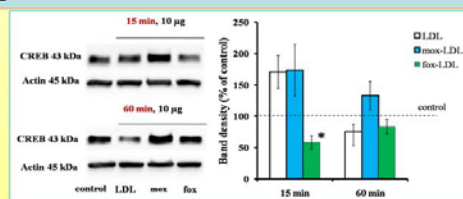
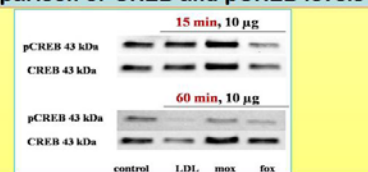


Figure 5. Comparison of CREB and pCREB levels



Discussion and conclusion

This study showed that LDL and its oxidized forms affect cellular oxidative stress and the activation of CREB in SHSY-5Y neuroblastoma cells. LDL fully oxidized obviously showed cell cytotoxicity whereas LDL and mox-LDL showed small effect. On the other hand, the intracellular ROS level was significantly induced by mox-LDL, supposedly through the direct uptake. In addition, LDL and both oxidized forms differently affect CREB activation analyzed by western blotting. These results suggested that oxidized LDL changed viability and/or function of transcription factor possibly through the induction of cellular oxidative stress. Although this study was conducted in cultured cells, the results might support the idea that LDL was one of the pathways associated with memory loss in AD pathogenesis.

ภาคผนวก (Index)

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ nativeLDL ต่อการมีชีวิตของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay

Native LDL ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability(% of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
0	85.59	82.67	96.80	102.49	91.89	9.33	4.67
10	-	105.65	-	100.98	103.31	3.30	2.33
25	75.95	111.90	122.14	101.03	102.75	19.84	9.92
50	86.72	78.12	97.55	114.13	94.13	15.52	7.76
100	81.20	80.40	92.66	101.03	88.82	9.88	4.94
200	89.23	71.28	69.62	75.60	76.43	8.90	4.45

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของ mildly oxidize LDLต่อการมีชีวิตของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay

mox-LDL ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (% of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	-	108.71	114.40	103.72	108.94	5.34	2.67
25	93.65	91.62	101.21	115.26	100.43	10.71	5.35
50	76.97	77.32	88.29	111.52	88.53	16.21	8.10
100	88.24	69.33	90.32	87.10	83.75	9.70	4.85
200	95.18	55.21	55.15	89.88	73.85	21.67	10.84

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นของ fully oxidize LDL ต่อการมีชีวิตของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay

Fully oxidize LDL	Cell viability (% of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	73.71	89.40	130.99	105.92	100.01	24.49	12.24
25	74.02	109.81	99.68	118.58	100.52	19.28	9.64
50	83.42	76.19	87.44	77.03	81.02	5.36	2.68
100	76.69	46.84	61.83	10.49	48.96	28.40	14.20
200	43.44	19.30	14.76	1.69	19.80	17.44	8.72

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของ native LDL, กับ mildly และ fully oxidize LDL ต่อการสร้าง
ภาวะ oxidative stress ใน SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 1 ชั่วโมง

Native LDL($\mu\text{g/ml}$)	ROS level (Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
10	0.95	1.02	1.05	1.02	1.01	0.04	0.02
25	0.94	1.06	1.06	0.95	1.00	0.06	0.03
50	0.89	0.98	1.01	1.02	0.98	0.06	0.03
100	0.83	0.97	1.00	0.94	0.94	0.07	0.04
200	0.69	0.85	0.83	1.34	0.93	0.28	0.14
mox-LDL ($\mu\text{g/ml}$)	ROS level (Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	1.65	1.66	1.20	1.05	1.39	0.31	0.16
25	2.18	2.01	1.50	1.17	1.72	0.46	0.23
50	2.53	2.69	1.60	1.34	2.04	0.67	0.33
100	3.78	3.54	1.78	1.44	2.63	1.20	0.60
200	5.03	5.43	1.63	1.48	3.39	2.13	1.06
Cu ²⁺	1.00	1.04	0.95	1.01	1.00	0.04	0.02
fox-LDL ($\mu\text{g/ml}$)	ROS level (Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	1.14	1.29	1.23	1.28	1.24	0.07	0.03
25	1.27	1.27	1.58	1.44	1.39	0.15	0.07
50	1.31	1.36	1.79	1.52	1.49	0.22	0.11
100	1.28	1.43	1.90	1.68	1.57	0.27	0.14
200	1.24	1.35	1.89	1.18	1.42	0.32	0.16

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ native LDL, กับ mildly และ fully oxidized LDL ต่อการสร้าง
ภาวะ oxidative stress ใน SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 2 ชั่วโมง

Native LDL($\mu\text{g}/\text{m}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
10	0.96	1.01	1.03	0.97	0.99	0.03	0.02
25	0.95	1.08	1.01	0.89	0.98	0.08	0.04
50	0.89	0.97	0.99	0.93	0.95	0.04	0.02
100	0.80	0.95	0.92	0.82	0.87	0.07	0.04
200	0.66	0.82	0.77	0.67	0.73	0.08	0.04
mox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	2.17	2.12	1.32	1.14	1.69	0.53	0.27
25	2.87	2.61	1.83	1.37	2.17	0.69	0.35
50	3.27	3.47	2.13	1.66	2.63	0.87	0.44
100	4.72	4.42	2.47	1.86	3.36	1.42	0.71
200	5.75	6.18	2.12	1.84	3.97	2.31	1.15
Cu ²⁺	1.01	1.05	0.95	0.98	1.00	0.04	0.02
fox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	1.25	1.32	1.29	1.33	1.30	0.04	0.02
25	1.43	1.43	1.72	1.58	1.54	0.14	0.07
50	1.51	1.54	1.99	1.76	1.70	0.22	0.11
100	1.42	1.56	2.08	1.95	1.75	0.31	0.16
200	1.33	1.42	2.10	1.41	1.56	0.36	0.18

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของ native LDL, กับ mildly และ fully oxidized LDL ต่อการสร้าง
ภาวะ oxidative stress ใน SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 4 ชั่วโมง

Native LDL($\mu\text{g}/\text{m}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
10	0.98	1.00	1.02	0.97	0.99	0.02	0.01
25	0.97	1.07	0.99	0.90	0.98	0.07	0.04
50	0.91	0.96	0.97	0.92	0.94	0.03	0.01
100	0.82	0.93	0.89	0.80	0.86	0.06	0.03
200	0.67	0.81	0.74	0.65	0.72	0.07	0.03
mox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	2.52	2.41	1.47	1.29	1.92	0.63	0.32
25	3.29	2.94	2.13	1.58	2.49	0.77	0.39
50	3.63	3.80	2.56	1.96	2.99	0.88	0.44
100	5.00	4.63	3.01	2.20	3.71	1.33	0.66
200	5.67	5.85	2.51	2.11	4.03	2.00	1.00
Cu ²⁺	1.03	1.04	0.96	0.99	1.00	0.04	0.02
fox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	1.32	1.33	1.28	1.35	1.32	0.03	0.02
25	1.52	1.51	1.74	1.61	1.60	0.11	0.05
50	1.64	1.69	2.08	1.82	1.81	0.19	0.10
100	1.54	1.63	2.19	2.04	1.85	0.31	0.16
200	1.44	1.51	2.19	1.45	1.65	0.37	0.18

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้นของ native LDL, กับ mildly และ fully oxidize LDL ต่อการสร้าง
ภาวะ oxidative stress ใน SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่เวลา 24 ชั่วโมง

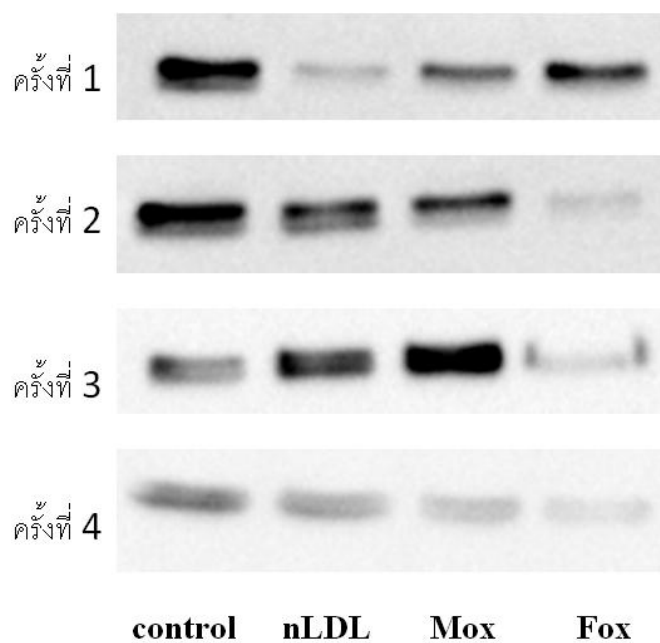
Native LDL($\mu\text{g}/\text{m}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
10	0.98	1.00	1.03	0.95	0.99	0.03	0.02
25	1.07	1.00	0.97	0.93	0.99	0.06	0.03
50	0.97	0.95	0.95	0.93	0.95	0.02	0.01
100	0.89	0.82	0.84	0.75	0.82	0.06	0.03
200	0.73	0.63	0.65	0.61	0.66	0.05	0.03
mox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	2.29	2.46	1.66	1.64	2.01	0.43	0.21
25	2.47	2.89	2.26	2.00	2.41	0.38	0.19
50	2.71	2.70	2.71	2.46	2.65	0.12	0.06
100	2.73	3.02	2.85	2.57	2.79	0.19	0.10
200	2.82	2.89	2.50	2.47	2.67	0.22	0.11
Cu ²⁺	1.05	1.06	1.01	1.00	1.03	0.03	0.02
fox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ROS level(Ratio of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
10	1.24	1.25	1.15	1.23	1.22	0.04	0.02
25	1.42	1.49	1.47	1.44	1.45	0.03	0.01
50	1.70	1.73	1.80	1.66	1.72	0.06	0.03
100	1.78	1.72	2.07	2.01	1.90	0.17	0.08
200	1.83	1.77	1.99	1.64	1.81	0.14	0.07

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้น 10µg/ml ของ nLDL, mox and fox-LDL ต่อการ activation โปรตีนCREB ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่ 15 นาที

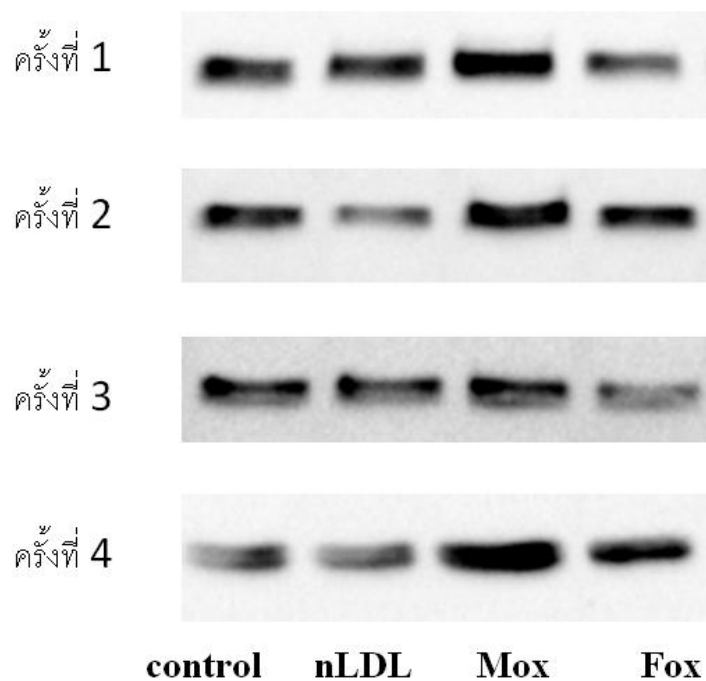
ความเข้มข้น (µg/ml)	Density (% of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
control	100	100	100	100	100	0.00	0.00
10 µg/ml nLDL	100.39	169.36	225.66	187.25	170.665	52.41	26.20
10 µg/ml mox-LDL	155.51	284.87	166.34	86.8	173.38	82.25	41.12
10 µg/ml fox-LDL	64.79	28.59	59.41	80.26	58.2625	21.67	10.83

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้น 10µg/ml ของ nLDL, mox and fox-LDL ต่อการ activation โปรตีนCREB ของเซลล์ SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ที่ 60 นาที

ความเข้มข้น (µg/ml)	Density (% of control)				Mean	SD	SEM
	N1	N2	N3	N4			
control	100	100	100	100	100	0.00	0.00
10 µg/ml nLDL	52.24	88.04	66.39	95.9	75.6425	19.98	11.53
10 µg/ml mox-LDL	138.32	110.28	185.62	96.96	132.795	39.21	22.64
10 µg/ml fox-LDL	100.32	59.19	98.24	75.73	83.37	19.59	11.31



รูปที่ 1 แสดงระดับของโปรตีน CREB ของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell เลี้ยงเซลล์ด้วย nLDL, mox-LDL และ fox-LDL ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 15 นาที



รูปที่ 2 ระดับของโปรตีน CREB ของ SH-SY5Y human neuroblastoma cell เลี้ยงเซลล์ ด้วย nLDL, mox-LDL และ fox-LDL ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 60 นาที