

THE STUDY OF PARATHYROID HORMONE ACTION AND SIGNALING PATHWAYS IN THE REGULATION OF ION TRANSPORT IN CACO-2 MONOLAYER USING ALTERNATING CURRENT AND DIRECT CURRENT ELECTROPHYSIOLOGICAL TECHNIQUES

SUPARERK LAOHAPITAKWORN 4702094 SCMM/D

Ph.D. (MOLECULAR MEDICINE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NARATTAPHOL CHAROENPHANDHU, M.D., Ph.D., NATEETIP KRISHNAMRA, Ph.D., SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.V.M., Ph.D.

ABSTRACT

The electrical circuit of epithelial cells, formed by the plasma membranes and tight junctions, could be explained by combinations of capacitors and resistors. However, a direct current (DC)-based technique could not determine each of the electrical components in this circuit. In the present study, alternating current (AC)-based impedance spectroscopy was applied to analyze the capacitive and resistive properties of intestinal epithelial cell line Caco-2. The results showed that Caco-2 monolayer exhibited apical (C_a) and basolateral (C_b) capacitance of 28.98 ± 0.69 and $12.36 \pm 0.23 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, respectively, and apical (R_a) and basolateral (R_b) resistance of 2141.30 ± 222.50 and $993.96 \pm 60.96 \Omega \cdot \text{cm}^2$, respectively. Impedance analysis successfully determined the forskolin-induced reduction in the plasma membrane resistance. This technique was then applied to study the biological responses of Caco-2 cells to parathyroid hormone (PTH), the direct action of which in the intestine has not been known. PTH reduced both apical and basolateral membrane resistance but had no effect on membrane capacitance, indicating that PTH activated transporters in the plasma membrane and not transporter-rich vesicle fusion. The mechanism and signaling pathways of PTH were further examined by the DC-based Ussing chamber technique. PTH significantly increased short-circuit currents (I_{sc}) in a dose-dependent manner. HCO_3^- depletion abolished the PTH action, while Cl^- depletion had no effect, suggesting that PTH induced apical HCO_3^- secretion in Caco-2 cells. By using various inhibitors, it was found that HCO_3^- came from the uptake via the basolateral electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter-1 (NBCe1) and from intracellular production catalyzed by carbonic anhydrase. HCO_3^- was later secreted through the apical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Apical Na^+/H^+ exchanger (NHE)-3 and basolateral NHE1 might help extrude excess H^+ produced by carbonic anhydrase. This ion regulatory action of PTH was exerted through the protein kinase A (PKA)- and phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-dependent pathways. In conclusion, impedance analysis could be used to determine the plasma membrane capacitance and resistance of epithelial cells and help predict responses of cells to PTH. PTH induced HCO_3^- secretion in Caco-2 cells through CFTR.

KEY WORDS: ANION SECRETION/CYSTIC FIBROTIC TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR (CFTR)/ELECTROGENIC $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ COTRANSPORTER-1(NBCe1)/PARATHYROID HORMONE

112 pages

การศึกษาผลของฮอร์โมนพาราไทรอยด์และการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการขนส่งไอออนในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด
คาโบทูโดยใช้เทคนิคทางสรีรวิทยาไฟฟ้ากระแสสลับและกระแสตรง

THE STUDY OF PARATHYROID HORMONE ACTION AND SIGNALING PATHWAYS IN THE
REGULATION OF ION TRANSPORT IN CACO-2 MONOLAYER USING ALTERNATING CURRENT AND
DIRECT CURRENT ELECTROPHYSIOLOGICAL TECHNIQUES

ศุภฤกษ์ เลาทพิทักษ์ว 4702094 SCMM/D

ปร.ด. (เวชศาสตร์ระดับโมเลกุล)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: นรัตพล เจริญพันธุ์, พ.บ., ปร.ด., นทีทิพย์ กฤษณามระ, ปร.ด., สุทธาสินี ปุญญ
โชติ, สพ.บ., Ph.D.

บทคัดย่อ

วงจรไฟฟ้าซึ่งเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์และไทจันชั้นของเซลล์เชื่อมประกอบไปด้วยตัวเก็บประจุและตัว
ต้านทาน อย่างไรก็ตามการใช้ไฟฟ้ากระแสตรงไม่สามารถวัดค่าตัวเก็บประจุและตัวต้านทานเหล่านี้ได้ ในการศึกษา
ครั้งนี้ได้ใช้การวัดคุณสมบัติความต้านทานไฟฟ้าซึ่งใช้อุปกรณ์ปล่อยไฟฟ้ากระแสสลับเพื่อหาค่าตัวเก็บประจุและตัว
ต้านทานของวงจรไฟฟ้าทั้งนี้ได้ทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงจากของลำไส้ชนิดคาโบทู ผลการทดลองพบว่าเซลล์
เพาะเลี้ยงคาโบทูมีค่าตัวเก็บประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านเอปิตีเลียลและด้านเบโซแลทเทอร์รอล คือ 28.98 ± 0.69 และ $12.36 \pm$
 0.23 ไมโครฟารัดต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ค่าตัวต้านทานที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านเอปิตีเลียลและด้านเบโซแลทเทอร์รอล
คือ 2141.30 ± 222.50 และ 993.96 ± 60.96 โอห์มต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ การวัดคุณสมบัติความต้านทานไฟฟ้า
ตรวจพบการลดลงของความต้านทานที่เยื่อหุ้มเซลล์หลังการกระตุ้นด้วยฟอร์สโคลินได้ จากนั้นได้ประยุกต์เทคนิค
ดังกล่าวเพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงคาโบทูต่อฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ลดความ
ต้านทานทั้งด้านเอปิตีเลียลและด้านเบโซแลทเทอร์รอลของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อค่าตัวเก็บประจุของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่ง
แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนพาราไทรอยด์กระตุ้นการทำงานของโปรตีนขนส่ง แต่ไม่มีผลต่อการเชื่อมต่องับโปรตีน
ขนส่งกับเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาโดยใช้ลูซิเฟอเรสพบว่า ฮอร์โมนพาราไทรอยด์เพิ่มกระแสไฟฟ้าของเซลล์
ตามความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น การลดไบคาร์บอเนตในสารละลายสามารถลดผลของฮอร์โมนพาราไทรอยด์
ได้ ขณะที่การลดคลอไรด์ไม่มีผลต่อการทำงานของฮอร์โมน จึงกล่าวได้ว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์กระตุ้นการหลังไบ
คาร์บอเนตในเซลล์เพาะเลี้ยงคาโบทู จากการใช้ตัวยับยั้งหลายชนิดพบว่าไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ทางด้านเบโซแลท
เทอร์รอลโดยอาศัยโปรตีนขนส่งเอ็นบีซีอี-1 และอาจสร้างไบคาร์บอเนตเองจากภายในเซลล์โดยอาศัยคาร์บอนิกแอนไฮเดรต
ส ไบคาร์บอเนตออกจากเซลล์ผ่านทางซีเอฟทีอาร์ที่อยู่ด้านเอปิตีเลียลของเซลล์ เอ็นเอชอี-3 ที่อยู่ด้านบน และเอ็นเอชอี-1
ที่อยู่ด้านเบโซแลทเทอร์รอลของเซลล์ อาจมีส่วนในการขับไฮโดรเจนไอออนซึ่งผลิตจากคาร์บอนิกแอนไฮเดรต
ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ทำงานผ่านทางเอ็นไซม์โคเนสและฟอสโฟอินสิท-3-ไคนเนส กล่าวโดยสรุปคือการวัด
คุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์โดยอาศัยเทคนิคไฟฟ้ากระแสสลับสามารถวัดค่าตัวเก็บประจุและตัวต้านทานของเยื่อหุ้ม
เซลล์และใช้พยากรณ์ผลของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ได้ และยังพบว่าฮอร์โมนนี้กระตุ้นการขับไบคาร์บอเนตในเซลล์
ลำไส้ผ่านทางโปรตีนซีเอฟทีอาร์