ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46227

EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON STRUCTURE AND FUNCTION OF ISOLATED RAT KIDNEY MITOCHONDRIA FOLLOWING CADMIUM EXPOSURE

ANONGPORN KOBROOB

MASTER OF SCIENCE
IN PHYSIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
FEBRUARY 2012

b00256345

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46227

EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON STRUCTURE AND FUNCTION OF ISOLATED RAT KIDNEY MITOCHONDRIA FOLLOWING CADMIUM EXPOSURE

ANONGPORN KOBROOB

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATED SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN PHYSIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY

FEBRUARY 2012

EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON STRUCTURE AND FUNCTION OF ISOLATED RAT KIDNEY MITOCHONDRIA FOLLOWING CADMIUM EXPOSURE

ANONGPORN KOBROOB

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED

TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SEINCE

IN PHYSIOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn

.....MEMBER

Prof. Dr. Nipon Chattipakorn

.....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Orawan Wongmekiat

.....MEMBER

Dr. Sarawut Kumphune

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Orawan Wongmekiat

.....CO-ADVISOR

Prof. Dr. Nipon Chattipakorn

23 February 2012

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thanks with my deepest sense to my advisor, Associate Professor Dr. Orawan Wongmekiat, for her support, understanding, great encouragement, useful guidance and technical support and supervision in the research work. Special thanks to my co-advisor, Professor Dr. Nipon Chattipakorn, who kindly supports the equipment, workplace and gives helpful advice, comments, understanding, and suggestion through this study.

I wish to thank Associate Professor Dr. Siriporn Chattipakorn and Dr. Sarawut Kumphune, the examining committee, for their suggestions and comments that improve my thesis.

I would like to acknowledge the Faculty of Medicine Endowment Fund for Research, Chiang Mai University, and need to express special acknowledge to Thailand Research Fund for financial support in this study.

I do express my gratitude to all the instructors at the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, and the staffs of Cardiac Electrophysiology Research and Training Center for technical transferring and facilitating my research work. Unforgettably, special thank to all my friends at the Department of Physiology for their friendship and support during my study.

Finally, I thank to my parents and sister for understanding, kindly encouragement and support me to reach this goal. I always keep in mind for your kindness that have been receiving from other people, whom I did not mention here.

Anongporn Kobroob

Thesis Title Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Structure and Function of Isolated Rat Kidney Mitochondria Following Cadmium Exposure

Author Miss Anongporn Kobroob

Degree Master of Science (Physiology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Orawan Wongmekiat Advisor

Prof. Dr. Nipon Chattipakorn Co-advisor

ABSTRACT

E46227

Cadmium is an environmental and industrial pollutant that impact greatly on human health. The kidney is the critical target organ for cadmium toxicity. Evidence has accumulated implicating the reactive oxygen species (ROS) generation with subsequent oxidative stress in mediating cadmium nephrotoxicity. Since mitochondria are major source of ROS production and defective mitochondria are related to various disease conditions, this study was carried out to determine whether caffeic acid phenethy ester (CAPE), a potent phenolic antioxidant, could protect kidney mitochondria against the toxic effect of cadmium. Four sets of experiments were

E46227

performed using mitochondria isolated from rat kidney. First, the different concentrations of cadmium (10-40 μM) on mitochondrial function were investigated. Second, the effects of CAPE (0.1, 1, 10 μM) on mitochondrial function were explored in the presence and absence of cadmium. Next, the impacts of cadmium and CAPE on mitochondrial oxidative stress were evaluated by assessments of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels. Finally, the influence of cadmium and CAPE on mitochondrial structure was examined using electron microscopy. The results demonstrated that cadmium dose-dependently induced mitochondrial damage as indicated by mitochondrial swelling, increased ROS production, decreased membrane potential and impaired mitochondrial ultrastructure. Mitochondrial injury was accompanied by a marked rise in MDA and a substantial fall in GSH. Pretreatment with CAPE dose-dependently attenuated all the changes caused by cadmium, while CAPE itself had no meaningful effect on both mitochondrial structure and function. The findings reported herein clearly demonstrate that CAPE can directly act on the mitochondria to block all cadmium-induced ROS-dependent mediated injury by inhibiting ROS generation, decreasing lipid peroxidation and/or maintenance of the mitochondrial antioxidant GSH pool, and further suggesting that it may be useful to unravel the nephrotoxicity induced by cadmium.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของ caffeic acid phenethyl ester ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากไตของหนูขาวหลังได้รับแคดเมียม

ผู้เขียน นางสาวอนงค์ภรณ์ ขอบรูป

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อรวรรณ	วงศ์มีเกียรติ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. นพ. นิพนธ์	ฉัตรทิพากร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E46227

แคดเมียมเป็นสารพิษทางสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรมที่ส่งผลกระทบอย่างมากต่อสุขภาพของมนุษย์ ไตเป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญของพิษเนื่องจากแคดเมียม มีหลักฐานแสดงว่าพิษของแคดเมียมที่ไตเกิดจากการสร้างสารอนุมูลอิสระและส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน เนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งสร้างอนุมูลอิสระที่สำคัญและการเสียสภาพของไมโตคอนเดรียเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆมากมาย การวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาว่า caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มฟีนอลที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถป้องกันไมโตคอนเดรียของไตต่อการเกิดพิษจากแคดเมียมได้หรือไม่ การวิจัยประกอบด้วย 4 ชุดการทดลองโดยใช้ไมโตคอนเดรียที่แยกจากไตของหนูขาวในการศึกษา การทดลองชุดแรกศึกษาถึงผลของแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (10 – 40 ไมโครโมลลาร์) ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย การทดลองที่สองศึกษาผลของ CAPE (0.1, 1, 10 ไมโครโมลลาร์) ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม การทดลองต่อมาศึกษาผลของแคดเมียมและ CAPE ต่อภาวะเครียดออกซิเดชั่นในไมโตคอนเดรียโดยการประเมินระดับ malondialdehyde (MDA) และ glutathione (GSH) การทดลองสุดท้ายศึกษาผลของแคดเมียมและ CAPE ต่อโครงสร้างของไมโตคอนเดรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการศึกษาพบว่าแคดเมียมทำให้หน้าที่ของไมโตคอนเดรียผิดปกติโดยแสดงจากการบวมของไมโตคอนเดรีย การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

E46227

ศักย์ไฟฟ้าระหว่างเมมเบรนลดลง และการเสียสภาพของโครงสร้างภายในไมโตคอนเดรียซึ่งระดับความรุนแรงขึ้นกับความเข้มข้นของแคดเมียม ความเสียหายของไมโตคอนเดรียที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ MDA และการลดลงของ GSH การให้ CAPE ก่อนแคดเมียมสามารถลดทุกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากแคดเมียมได้ ขณะที่ CAPE เพียงอย่างเดียวไม่มีผลใดๆต่อโครงสร้างและหน้าที่ของไมโตคอนเดรีย ผลการวิจัยแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า CAPE สามารถป้องกันพิษจากแคดเมียมได้จากการออกฤทธิ์โดยตรงที่ไมโตคอนเดรียผ่านทางกลไกการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ ลดการเกิดออกซิเดชั่นของไขมันและ/หรือรักษาระดับสารต้านอนุมูลอิสระ GSH ภายในไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้จากผลการวิจัยสามารถสันนิษฐานได้ว่า CAPE อาจมีประโยชน์ในการป้องกันและแก้ไขภาวะพิษต่อไตที่เกิดจากแคดเมียมได้

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ABSTRACT (in English)	v
ABSTRACT (in Thai)	vii
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xv
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 Statement and Significance of the Problem	1
1.2 Literature Review	3
1.2.1 Cadmium exposure	3
1.2.2 Cadmium toxicity and the kidney	5
1.2.3 Cadmium toxicity and oxidative stress	8
1.2.4 Mitochondria and oxidative stress	9
1.2.5 Cadmium toxicity and mitochondria	13
1.2.6 Caffeic acid phenethyl ester	15
1.3 Rationale, Model, and Hypothesis	17
1.4 Objective of the Study	18
1.5 Scope of the Study	19
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS	20
2.1 Drug and Chemicals	20
2.2 Animal Preparation	20

2.3 Isolation of Kidney Mitochondria 21

2.4 Experimental Protocols 22

2.4.1 Protocol 1: Effects of cadmium on kidney mitochondrial function 22

2.4.2 Protocol 2: Effects of CAPE on kidney mitochondrial function following cadmium exposure 23

2.4.3 Protocol 3: Effects of cadmium and CAPE on mitochondrial oxidative stress 25

2.4.4 Protocol 4: Effects of cadmium and CAPE on mitochondrial structure 25

2.5 Determination of Mitochondrial Protein 26

2.6 Determination of Mitochondrial Swelling 26

2.7 Determination of Mitochondrial ROS 27

2.8 Determination of Mitochondrial Membrane Potential 28

2.9 Determination of Malondialdehyde 29

2.10 Determination of Reduced Glutathione 29

2.11 Electron Microscopic Studies 30

2.12 Statistical Analysis 30

CHAPTER 3 RESULTS 31

3.1 Effects of Cadmium on Mitochondrial Function 31

3.2 Effects of CAPE on Mitochondrial Function under Normal Condition 34

3.3 Effects of CAPE on Mitochondrial Function Following Cadmium Exposure 36

3.4 Effects of Cadmium and CAPE on Mitochondrial Oxidative Stress 39

3.5 Effects of Cadmium and CAPE on Mitochondrial Structure 40

CHAPTER 4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS 41

REFERENCES 53

CURRICULUM VITAE 65

LIST OF TABLES

Table		Page
2-1	Experimental design for study protocol 1	23
2-2	Experimental design for study protocol 2	24
2-3	Experimental design for study protocol 3	25

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1-1	Schema of cadmium in blood and liver	4
1-2	Putative cadmium uptake pathways in proximal tubule	6
1-3	Structure of mitochondria	9
1-4	Mitochondrial oxidative phosphorylation	11
1-5	Generation of ROS and mitochondrial antioxidant system	12
1-6	Chemical structure of CAPE	15
2-1	Diagrammatic showing the method for isolation of mitochondria	21
2-2	Simple diagram showing a light-scattering technique	26
2-3	Principle of mitochondrial ROS assay	27
3-1	Effects of various concentrations of cadmium on mitochondrial swelling (A) kinetics (B) endpoint	32
3-2	Effects of various concentrations of cadmium on mitochondrial ROS production	33
3-3	Effects of various concentrations of cadmium on mitochondrial membrane potential changes	33
3-4	Effects of various concentrations of CAPE on mitochondrial swelling under normal condition (A) kinetics (B) endpoint	34
3-5	Effects of various concentrations of CAPE on mitochondrial ROS production under normal condition	35

3-6 Effects of various concentrations of CAPE on mitochondrial membrane potential changes under normal condition 36

3-7 Effects of CAPE on kidney mitochondrial swelling following cadmium exposure (A) kinetics (B) endpoint 37

3-8 Effects of CAPE on mitochondrial ROS production following cadmium exposure 38

3-9 Effects of CAPE on mitochondrial membrane potential changes following cadmium exposure 38

3-10 Effects of cadmium and CAPE on malondialdehyde (A) and reduced glutathione (B) levels 39

3-11 Electron micrograph showing the effects of cadmium and CAPE on mitochondrial ultrastructural changes 40

4-1 Proposed mitochondrial protective mechanisms by CAPE 51

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	Percent
μM	micromolar
1,25-OH vitamin D	1,25-hydroxy vitamin D
25-OH vitamin D	25-hydroxy vitamin D
ADP	Adenosine diphosphate
AIF	Apoptosis-inducing factor
ANT	Adenine nucleotide translocator
AQP8	Aquaporin 8
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
$CdCl_2$	Cadmium chloride
CdGSH	Cadmium-glutathione complex
CdMT	Cadmium-metallothionein complex
CoQ	Coenzyme Q
$CuSO_4.5H_2O$	Copper sulfate pentahydrate
CuSOD	Copper superoxidase dismutase
CyP D	Cyclophilin D

DCF	Fluorescent dichlorofluorescein
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DCFH	non-fluorescent dichlorofluorescein
DMT1	Divalent metal ion transporter 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ETC	Electron transport chain
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
GST	Glutathione S-transferase
H_2O_2	Hydrogen peroxide
IMAC	Inner membrane anion channel
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimi-dazocarbocyanine iodide
kDa	kilodalton
KH_2PO_4	Potassium dihydrogen phosphate
LMWP	Low-molecular weight proteins
MCU	Mitochondria calcium uniporter
MDA	Malondialdehyde
MnSOD	Manganese superoxide dismutase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore

MT	Metallothionein
$Na_2CO_3.H_2O$	Sodium carbonate monohydrate
NADH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAG	*N*-acetyl-*β*-D-glocosaminidase
$NaHCO_3$	Sodium hydrogen carbonate
NaOH	Sodium hydroxide
$NO^{\bullet}$	Nitric oxide
$O_2^{\bullet -}$	Superoxide anion
$OH^{\bullet}$	Hydroxyl radical
$ONOO^-$	Peroxynitrite
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TOM	Translocase of the outer membrane
VDAC	Voltage-dependent anion channel
ZIP8	Zinc transporter 8
ZnSOD	Zinc superoxide dismutase
$\Delta\Psi m$	Mitochondrial membrane potential change