



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของไฟโตรเอสโตรเจนต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน

ของเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัสในภาวะชรา

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล

(งบประมาณแผ่นดิน) พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2557A10802173

สัญญาเลขที่ 122/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของไฟโตรเอสโตรเจนต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน
ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

30 กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่ สัญญา 122/2557

Acknowledgments

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no.122/2557)

บทคัดย่อ

ความจำเสื่อมพบมากในผู้สูงอายุ เกิดจากเซลล์ประสาทเสื่อมโดยเฉพาะเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนจากต่อมเพศ แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเองก็สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้ เป็นไปได้หรือไม่ว่าในภาวะขาดเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีการสังเคราะห์เอสโตรเจนลดลง และเป็นสาเหตุของภาวะความจำเสื่อมที่พบในผู้สูงอายุ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในแบบจำลองภาวะขาด ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ และทำการเพาะเลี้ยงประสาทฮิปโปแคมปัสร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียระยะกระตุ้นซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของสมองในภาวะขาดมีสำคัญอย่างหนึ่ง เพื่อหาสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะขาด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในภาวะที่เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสอยู่ในระยะขาดโดยดูจากการแสดงออกของ amyloid beta ปริมาณสูงสุด คือ 40 วันของการเพาะเลี้ยง มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะที่พัฒนา (5 วันของการเพาะเลี้ยง) ซึ่งมีปริมาณเอสโตรเจนสูงสุดซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการแสดงออกของโปรตีน steroidogenic acute regulatory (StAR) ซึ่งมีร่องรอยของการแสดงออกสูงสุดที่วันที่ 5 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จนกระทั่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียระยะกระตุ้น พบว่าไม่มีการเพิ่มปริมาณของเอสโตรเจนถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเข้าสู่ระยะพัฒนาก็ตาม เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ interleukin-6 บ่งชี้ว่าสารที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียระยะกระตุ้น เช่น interleukin-6 มีผลยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสได้โดยตรง อย่างไรก็ตามการให้สารในกลุ่ม isoflavonoid เช่น genistein ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาททั้งระยะพัฒนาและระยะขาด การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์เอสโตรเจนลดลงในระยะขาดโดยอาจเกิดจากการที่เซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นเป็นสาเหตุของการสูญเสียความจำและการเรียนรู้ที่พบในผู้สูงอายุ

Abstract

Memory loss, which is common with aging, causes degeneration of neuron especially hippocampal neuron. Previous study reported that there is the relationship between the decrease of gonadal estrogen and degeneration of hippocampal neuron. However, hippocampal neurons are capable of synthesizing estrogen. It is probable that deprivation of estrogen from aged hippocampal neuron leading to age-related memory impairment. Therefore, the present study aims to study the synthesis of estrogen on hippocampal neuronal culture in an aged model using radioimmunoassay technique. Furthermore, the present study also study the effect of microglia activation, commonly found in aged brain, on the synthesis of estrogen from hippocampal neurons. The result showed that estrogen synthesis was decreased in aged hippocampal neuron, 40 days *in vitro*, compare with highly release of estrogen in mature state (5 days *in vitro*). Similarly, the expression of steroidogenic acute regulatory (StAR) was highly expressed at 5 day *in vitro*. Then a significant decrease in expression of StAR was showed at 25-40 day *in vitro* compare to 5-day culture. Moreover, exposure to either activated microglia or IL-6, significantly suppressed the secretion of hippocampal estrogen in hippocampal neurons. However, incubation of isoflavonoid (e.g. genistein) has no effect on the synthesis of estrogen from hippocampal neurons both maturation and aging states. These findings demonstrate a potential mechanism of microglia activation underlying the reduction in estrogen synthesis in aged hippocampal neurons, which may be involved in age-related learning and memory impairments.

สารบัญเรื่อง

หน้า

1. บทนำ	
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	2
1.4 แนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. เนื้อเรื่อง	
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
2.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส	4
2.1.2 การเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron	4
2.1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย	4
2.1.4 การเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์ไมโครเกลีย	4
2.1.5 Radioimmunoassay	5
2.1.6 Western blot analysis	5
2.1.7 การประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล	5
2.2 ผลการทดลอง	6
2.2.1 การแสดงออกของ amyloid beta ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส	6
2.2.2 การแสดงออกของ StAR ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส	7
2.2.3 ปริมาณการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส	7
2.2.4 ผลของไฟโตรเอสโตรเจนต่อการหลั่งเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส	9
2.2.5 ผลของภาวะที่ไม่โครเกลียถูกกระตุ้นต่อการหลั่งเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส	10
3. อภิปราย/วิจารณ์	
3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน	11
3.2 อภิปรายผลการทดลอง	11
4. สรุปและเสนอแนะ	11
5. ผลผลิต	12
6. บรรณานุกรม	12
7. ภาคผนวก	15
จดหมาย Revised Manuscript จาก editor	16

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงภาพแถบโปรตีน (A) และร้อยละของการแสดงออกของโปรตีน amyloid beta (B) ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่เวลาการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน	6
รูปที่ 2 แสดงภาพแถบโปรตีน (A) และแสดงร้อยละของการแสดงออกของโปรตีน StAR (B) ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่เวลาของการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน	7
รูปที่ 3 แสดงปริมาณการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทที่ทำการเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่างกัน	8
รูปที่ 4 แสดงการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทที่บ่มด้วย genistein ที่ความเข้มข้น 1 uM (A) และ ความเข้มข้น 0.1 uM (B) ที่เวลาในการเพาะเลี้ยงต่างกัน	9
รูปที่ 5 แสดงผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (activated microglia co-culture) เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น (unactivated microglia co-culture) กลุ่มที่ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับไมโครเกลียแต่ได้รับ LPS หรือได้รับ IL-6	10

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ANOVA	Analysis of variance
d	day
DIV	Day in vitro
E2	estrogen
g	gram
IL-6	Interleukin-6
ml	milliliter
ng	nanogram
RIA	Radioimmunoassay
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
StAR	steroidgenic acute regulator
uM	micromolar

1. บทนำ (Introduction)

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน

การศึกษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุนิยมศึกษาเชิงพฤติกรรม โดยเฉพาะการศึกษาเชิงลึกถึงระดับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นั้นมีไม่มาก แต่ก็มีบททดลองของ Nunomura และคณะ (2011) รายงานว่ามีการทำลายกรดโรโบนิวคลีอิก ในเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของผู้สูงอายุที่มีภาวะเซลล์ประสาทเสื่อม แต่ก็มีได้มีการเชื่อมโยงกับความจำและการเรียนรู้ [23] งานวิจัยต่อมาพบว่าการตายของเซลล์ประสาทจากการทำลายกรดโรโบนิวคลีอิกไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะความจำเสื่อม [24] แต่พบว่าภาวะความจำเสื่อมพบมากในหญิงชราวัยหมดประจำเดือน แสดงให้เห็นว่าภาวะความจำและการเรียนรู้ที่ถดถอยนั้นมีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนเอสโตรเจน ดังนั้นเมื่อต่อมเพศมีการสร้างฮอร์โมนลดลงจึงมีผลต่อระบบความจำและการเรียนรู้ แต่จากการค้นพบของ Fester และคณะ (2011) พบว่าเซลล์ประสาทเองก็สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้ จากการพบว่ามีแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน ที่สำคัญได้แก่ steroidogenic acute regulatory protein (StAR) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในขั้นกำหนดอัตราของกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน และวัดระดับของเอสโตรเจนในเนื้อเยื่อประสาทของหนูที่ทำการตัดรังไข่พบว่ามีความเข้มข้นของเอสโตรเจนประมาณ 20-60 pg/ml ซึ่งก็น่าจะทำให้สามารถคงสภาพการทำงานของเซลล์ประสาทให้เป็นปกติได้ถึงแม้ว่าจะไม่มีเอสโตรเจนจากต่อมเพศ [14, 17] แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์ประสาทไม่สามารถคงสภาพปกติของกระบวนการสร้างความจำได้เป็นไปได้อาจมีการทำลายหรือยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้น [1] เป็นที่มาของอัตราการเกิดโรคในผู้สูงอายุเพิ่มขึ้น ที่สำคัญได้แก่ โรคเซลล์ประสาทเสื่อม (neurodegenerative disorder) [2-4] มีงานวิจัยรายงานถึงกลไกการตายของเซลล์ประสาทในสมองของผู้สูงอายุ ว่าเกิดจากการทำงานผิดปกติของไมโทคอนเดรียทำให้สูญเสียความสามารถในการสร้างและส่งต่อพลังงาน และรบกวนสมดุลของปฏิกิริยา redox ทำให้มีปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (free radical) เพิ่มขึ้น [15, 31] ส่งผลให้มีการทำลายกรดโรโบนิวคลีอิกภายในเซลล์ [23] นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงภาวะที่เซลล์ไมโครเกลียเปลี่ยนจากระยะพักไปเป็นระยะที่ถูกกระตุ้น ซึ่งจะหลั่งสารในกลุ่ม cytokines ที่สำคัญได้แก่ interleukin-6 (IL-6) ส่งผลทำลายเซลล์ประสาท โดยเฉพาะเซลล์ประสาทที่ง่ายต่อการเสื่อม คือ เซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส [21-24] และเป็นสาเหตุของภาวะความจำเสื่อมมีพบในโรคเซลล์ประสาทเสื่อมในผู้สูงอายุ อย่างไรก็ตามกลับมีการรายงานว่าภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุเกิดขึ้นโดยไม่มีความสัมพันธ์กับการเสื่อมของเซลล์ประสาท บ่งชี้ว่าอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่งภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

เป็นที่ทราบกันดีว่าการให้เอสโตรเจนสามารถลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเซลล์ประสาทเสื่อมในผู้สูงอายุ [28, 30] โดยมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และส่งเสริมกระบวนการ synaptic plasticity [5-9] ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ การทำงานของเอสโตรเจนในสมองอาศัยทั้งเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ (gonadal estrogen) และ เอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (hippocampal estrogen) [8, 10-

14] จากการศึกษาของ Prange-Kiel และ คณะ (2003) แสดงให้เห็นว่า hippocampal estrogen เพิ่มความหนาแน่นของจำนวน dendrite ซึ่งเป็นกลไกของกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ [25] ดังนั้นในสมองของผู้สูงอายุที่มีการลดลงของ gonadal estrogen ก็น่าจะยังมีการทำงานของ hippocampal estrogen อยู่ แต่กลับพบว่ากระบวนการ synaptic plasticity การสร้างความจำ และการเรียนรู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [20, 30] แสดงให้เห็นว่าการทำงานของ hippocampal estrogen ในการคงสภาพสมดุลของกระบวนการ synaptic plasticity มีความผิดปกติด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังแสดงให้เห็นในงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่า hippocampal estrogen มีบทบาทในการเตรียมความพร้อมของเซลล์ประสาทก่อนได้รับ gonadal estrogen โดยการเพิ่มการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน และหากไม่มี hippocampal estrogen จะไม่เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ถึงแม้ว่าจะมีการให้เอสโตรเจนเพิ่มก็ตาม [8] ซึ่งสามารถอธิบายงานวิจัยจำนวนไม่น้อยที่พบว่า การให้เอสโตรเจนทดแทนไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการรักษาโรคเซลล์ประสาทเสื่อมในภาวะชรา [16-19] จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเพราะเหตุใดการให้เอสโตรเจนทดแทนซึ่งเทียบได้กับ gonadal estrogen ในกระแสเลือด ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสทำงานเป็นปกติได้ เป็นไปได้หรือไม่ว่าในภาวะชรา ไม่เพียงแต่มีการลดลงของ gonadal estrogen แต่ยังมี การลดลงของ hippocampal estrogen ร่วมด้วย ดังนั้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณตลอดจนกระบวนการในการสังเคราะห์ hippocampal estrogen ในภาวะชราของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานตามแบบจำลองของการศึกษาภาวะชราในหลอดทดลอง [10, 31] นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังทำการศึกษาผลของเซลล์ไมโครเกลียระยะกระตุ้น (เป็นการเปลี่ยนแปลงที่อย่างหนึ่งที่พบในสมองของผู้สูงอายุ) ต่อการสังเคราะห์ estrogen ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส อีกทั้งยังทำการศึกษาผลของ genistein ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในกลุ่ม isoflavonoids และมีรายงานว่า มีฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย ต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสอีกด้วย ทั้งนี้เพื่อเป็นการหาวิธีการรักษาหรือป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่พบในโรคเซลล์ประสาทเสื่อมในภาวะชราต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.3.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณของ hippocampal estrogen ในแบบจำลองภาวะชราของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ StAR ในแบบจำลองภาวะชราของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron
3. เพื่อศึกษาผลของ isoflavonoids ต่อปริมาณของ hippocampal estrogen ในแบบจำลองภาวะชราของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron
4. เพื่อศึกษาผลของ isoflavonoids ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ P450scc, StAR, และ aromatase ในแบบจำลองภาวะชราของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron
5. เพื่อศึกษาผลของ isoflavonoids ต่อกระบวนการ synaptic plasticity ในแบบจำลองภาวะชราของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampal neuron

1.3.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ ครอบคลุมการศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านปริมาณและกระบวนการ สังเคราะห์ เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในแบบจำลองภาวะชรา

1.4 แนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

เนื่องจากการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสต้องการทั้ง gonadal estrogen และ hippocampal estrogen ในผู้สูงอายุนอกจากปริมาณของ gonadal estrogen ลดลงแล้ว ปริมาณของ hippocampal estrogen ก็ลดลงด้วย จึงทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส เป็นสาเหตุของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ทำให้เข้าใจพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชราและนำไปสู่การค้นพบวิธีในการป้องกันรักษาต่อไป

โดยส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้จะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Neurotoxicology ในชื่อเรื่อง Inhibition of hippocampal synthesized estrogen by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression

2. เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary hippocampus neurons (Cat number A10841-01, Gibco, Carlsbad, CA, USA) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนหนูแรทอายุ 18 วัน ทำการเพาะเลี้ยงใน neurobasal medium (Gibco) 25 μ M L-Glutamate และ 2% B27 Supplement (Gibco) ใน poly-L-lysine-coated T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 25 cm^2 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และความเข้มข้น CO_2 ที่ 5% ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 DIV เพื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่ในภาวะชรา [7, 10, 15, 31]

2.1.2 การเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ H19-7 hippocampal neuron (ATCC[®] Number; CRL-2526[™]) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) ที่ประกอบด้วย 1.5 g/l sodium bicarbonate, 0.2 mg/ml G418, 0.001 mg/ml puromycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) และ 10% fetal bovine serum (Gibco) ใน poly-L-lysine-coated T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 25 cm^2 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 33°C และความเข้มข้น CO_2 ที่ 5% ภายใต้สภาวะแวดล้อมและอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron (cell proliferation) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron จะถูกเลี้ยงด้วย estrogen-free culture medium ที่ประกอบด้วย 0.01% N2 supplement (Gibco) และ 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma) ใน 6-well plate (Corning) ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 39°C และความเข้มข้น CO_2 ที่ 5% ซึ่งในสภาวะนี้เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons จะถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) กลายเป็น mature hippocampal neuron

2.1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI ใน DMEM ที่ประกอบด้วย 5% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acid (Sigma) ใน T-flask ขนาด 25 cm^2 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และความเข้มข้น CO_2 ที่ 5% ในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI เพื่อนำไปศึกษาวิจัยนั้น เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเลี้ยงบน Transwell polyester membrane insert (Product ID 3450; Corning) ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และ ที่ 5% CO_2

2.1.4 การเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์ไมโครเกลีย

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron ร่วมกับ เซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI (neuron-microglia co-culture) โดยเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons ใน 6-well plate ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยง microglial HAPI ที่ถูกเลี้ยง

บน Transwell polyester membrane insert มาวางลงในแต่ละ well ของ 6-well plate ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons อยู่ด้านล่าง

2.1.5 Radioimmunoassay (RIA)

ทำการวัดความปริมาณ local estrogen ใน culture media ด้วยวิธี radioimmunoassay โดยเริ่มจากการผสม anti-estradiol antibody (R&D systems) กับ estrogen (E2) ที่ถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (^{125}I -E2) (R&D systems) ลงใน 96-well plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนเติม culture media ที่ได้จากระบวนการทดลอง หรือ estrogen ที่ทราบความเข้มข้น (เพื่อนำไปกำหนดค่า standard curve) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการจับกันของ estrogen และ antibody (estrogen-anti-estradiol antibody complex) ทำการตกตะกอน estrogen-anti-estradiol antibody complex โดยใส่ secondary antibody แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บ supernatant ไปวัดค่าความเข้มข้นของสารกัมมันตรังสี (^{125}I -E2) ด้วยเครื่อง liquid scintillation spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของ estrogen ใน culture media โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (standard curve)

2.1.6 Western blot analysis

หลังจากให้สารต่าง ๆ แก่เซลล์เพาะเลี้ยงเรียบร้อยแล้วสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, EDTA 5 mM, Na_2HPO_4 30 mM, NaF 50 mM) นำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปบ่มใน 5% non-fat milk เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนนำไปบ่มด้วย anti-StAR antibody และ anti-amyloid beta antibody (Cambridge, UK) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ chemiluminescent detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image

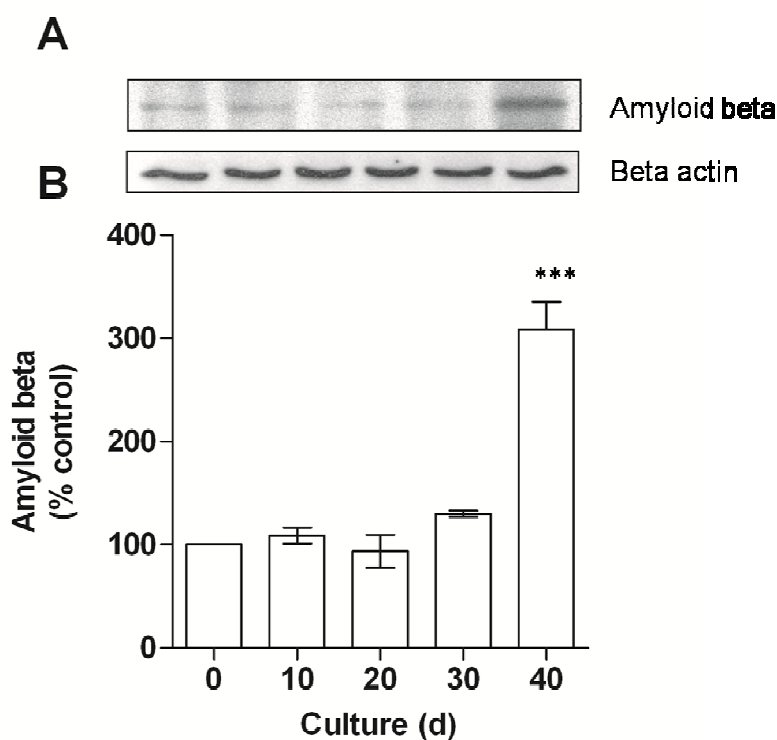
2.1.7 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means $\pm$ SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

2.2 ผลการทดลอง

2.2.1 การแสดงออกของ amyloid beta ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิโปแคมปัส

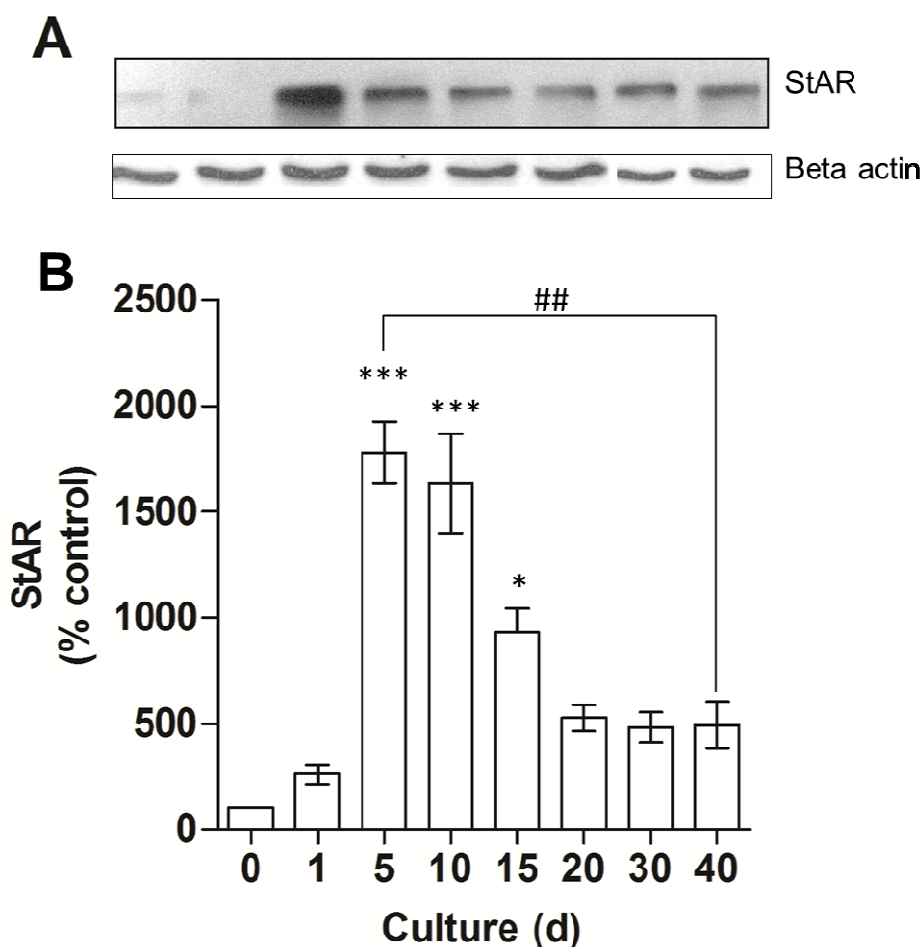
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัสเพื่อศึกษาปริมาณแสดงออกของโปรตีน amyloid beta ซึ่งจัดเป็นโปรตีนบ่งชี้ภาวะเซลล์ประสาทชรา หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 40 วัน ทำการเก็บโปรตีนตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ วันที่ 0 10 20 30 และ 40 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำมาศึกษาปริมาณการแสดงออกของ amyloid beta ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของโปรตีน amyloid beta ในวันที่ 10 20 และ 30 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม (0) และอยู่ในระดับที่ค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงถึงวันที่ 40 พบว่า amyloid beta มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) สรุปได้ว่าเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัสจะเข้าสู่ระยะชราในหลอดทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 40 วัน และใช้เกณฑ์นี้เป็นตัวกำหนดระยะชราในหลอดทดลองของการทดลองต่อไป



รูปที่ 1 แสดงภาพแถบโปรตีน (A) และร้อยละของการแสดงออกของโปรตีน amyloid beta (B) ของเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัสที่เวลาการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ตั้งแต่ 0 10 20 30 และ 40 วัน *** $P < 0.001$ (n=3)

2.2.2 การแสดงออกของ StAR ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส

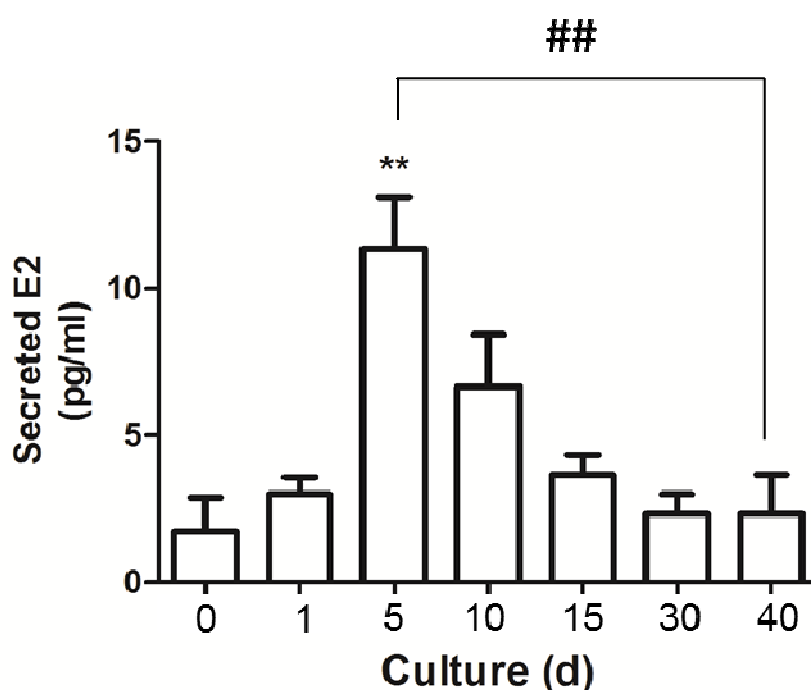
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเป็นเวลา 40 เพื่อให้เข้าสู่ภาวะชราดังแสดงในการทดลองที่ผ่านมา และทำการศึกษาปริมาณแสดงออกของโปรตีน StAR ซึ่งจัดเป็นโปรตีนสำคัญในชั้นกำหนดอัตราของการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่วันที่ 0 1 5 10 15 20 30 และ 40 ของการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ StAR ระดับต่ำในกลุ่มควบคุม (0) ซึ่งเก็บโปรตีนหลักจากการ subculture ทันที และมีร้อยละของการแสดงออกของ StAR จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 5-10 วันของการเพาะเลี้ยง และอยู่ในระดับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นระดับการแสดงออกของ StAR กลับลดลงอยู่ในระดับที่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (40 วัน) (รูปที่ 2) และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าร้อยละของการแสดงออกของ StAR วันที่ 40 ลดลงจากวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า ที่วันที่ 5-10 ของการเพาะเลี้ยงน่าจะเป็นระยะที่เซลล์เข้าสู่ระยะพัฒนาซึ่งมีการเตรียมความพร้อมของเซลล์อย่างเต็มที่ ในการสังเคราะห์เอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสด้วย



รูปที่ 2 แสดงภาพแถบโปรตีน (A) และแสดงร้อยละของการแสดงออกของโปรตีน StAR (B) ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่เวลาของการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ตั้งแต่ 0 1 5 10 15 20 30 และ 40 วัน * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (0) ## $P < 0.005$ เทียบกับวันที่ 5 ($n=3$)

2.2.3 ปริมาณการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิโปแคมปัส

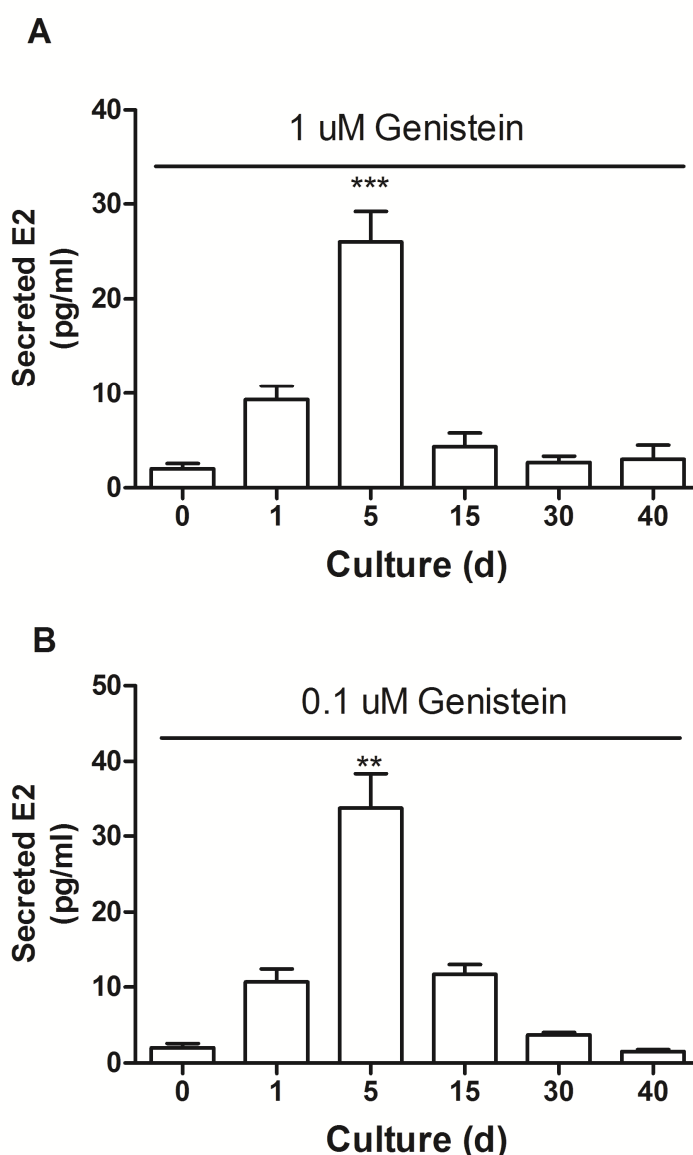
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัส จากนั้นเก็บนำอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 0 1 5 10 15 30 และ 40 วัน นำมาวัดปริมาณเอสโตรเจนด้วยวิธี RIA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ประสาทฮิโปแคมปัสมีการสร้างและหลั่งเอสโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูงสุดที่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (0) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณการแสดงออกของ StAR จากการทดลองก่อนหน้านี้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปผลได้ว่าการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัส สูงสุดที่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และลดลงในภาวะที่เซลล์ประสาทเข้าสู่ระยะชรา คือ 40 วัน จากการผลการทดลองที่ผ่านมาและผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันคือระยะที่เซลล์ประสาทพัฒนาเต็มที่ และการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน คือระยะที่เซลล์ประสาทชราในหลอดทดลอง



รูปที่ 3 แสดงปริมาณการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทที่ทำการเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่างกัน คือ 0 1 5 10 15 30 และ 40 วัน ** $P < 0.005$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (0), ## $P < 0.005$ เทียบกับกลุ่มเพาะเลี้ยง 5 วัน ($n=3$)

2.2.4 ผลของไฟโตรเอสโตรเจนต่อการหลั่งเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิโปแคมปัส

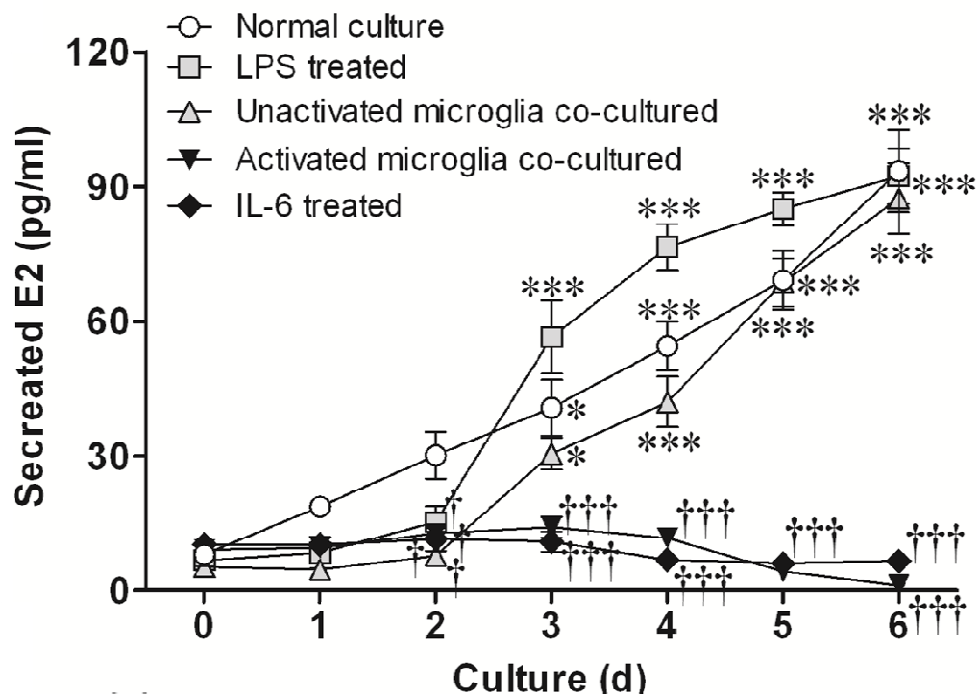
เพื่อศึกษาผลของ genistein ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม isoflavonoid ต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัส ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัสเป็นเวลา 40 วันให้เข้าสู่ภาวะซาร์ร่วมกับการบ่มด้วย genistein ที่ความเข้มข้น 1 μM และ 0.1 μM ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า genistein ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อปริมาณการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัส กล่าวคือ เอสโตรเจนยังคงหลั่งสูงสุดที่วันที่ 5 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งวันที่ 40 เช่นเดียวกับที่พบในการทดลองที่ผ่านมา ดังนั้นสามารถสรุปผลได้ว่า genistein ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิโปแคมปัส แต่อย่างไรก็ตามผลของ genistein ในด้านอื่นๆ ก็ยังต้องการการศึกษาต่อไป



รูปที่ 4 แสดงการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทที่บ่มด้วย genistein ที่ความเข้มข้น 1 μM (A) และ ความเข้มข้น 0.1 μM (B) ที่เวลาในการเพาะเลี้ยงต่างกัน คือ 0 1 5 15 30 และ 40 วัน ** $P < 0.005$ *** $P < 0.001$ ($n=3$)

2.2.5 ผลของภาวะที่ไม่โครเกลียถูกกระตุ้นต่อการหลั่งเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

เนื่องจากการให้ genistein ไม่สามารถทำให้การสังเคราะห์เอสโตรเจนที่ลดลงเมื่อเข้าสู่ภาวะชราภาพกลับมาสู่ระดับปกติได้ แสดงว่าการที่เซลล์ประสาทสังเคราะห์เอสโตรเจนลดลงน่าจะมีปัจจัยภายนอกอื่นร่วมด้วย ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของภาวะที่ไม่โครเกลียถูกกระตุ้น (microglia activation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงสำคัญอย่างหนึ่งที่พบได้ในสมองของผู้สูงอายุ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสร่วมกับไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสไม่สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้ในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเช่นเดียวกับการบ่มด้วย IL-6 ซึ่งเป็น cytokines สำคัญหลังจากเซลล์ไมโครเกลียระยะกระตุ้น ในขณะที่ระดับของเอสโตรเจนไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มที่ได้รับ LPS และ กลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังนั้นจึงสามารถสรุปผลได้ว่า สารที่หลั่งออกมาจากภาวะที่ไม่โครเกลียถูกกระตุ้น เช่น IL-6 มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสโดยตรง



รูปที่ 5 แสดงผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (activated microglia co-culture) เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น (unactivated microglia co-culture) กลุ่มที่ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับไมโครเกลียแต่ได้รับ LPS (LPS treated) หรือได้รับ IL-6 (IL-6 treated) * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ เทียบกับวันที่ 0; + $P < 0.05$, +++ $P < 0.001$ (n = 3)

3. อภิปราย/วิจารณ์

3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ

เนื่องจากเครื่อง real time PCR มีปัญหาไม่สามารถใช้งานได้ผู้วิจัยจึงต้องตัดการทดลองส่วนการศึกษาการแสดงออกในระดับยีน โดยนำงบประมาณส่วนดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียแทน

3.2 อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ในหลอดทดลองต่อการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส โดยพบว่าเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสสามารถหลั่งฮอร์โมนเอสโตรเจนได้สูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเรียกวันนี้ว่า ระยะพัฒนาเต็มที่ และจะค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ และลดลงต่ำที่สุดในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจัดเป็นระยะชราเนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ภาวะชรา คือ amyloid beta สูงสุด สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งมีผู้รายงานไว้ว่า amyloid beta มีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส มีการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ระยะเต็มวัย (nestin) สูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง [7] ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการสังเคราะห์เอสโตรเจนลดลงเมื่อเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเข้าสู่ภาวะชรา และน่าจะเกิดจากการลดลงของเอนไซม์ในขั้นกำหนดอัตรา คือ StAR ซึ่งทำหน้าที่ในการนำคอเรสเตอรอลเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย อาจกล่าวได้ว่าการลดลงของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของภาวะสมองเสื่อมนำไปสู่การสูญเสียความจำในผู้สูงอายุ นอกจากนี้เพื่อเป็นการหาแนวทางในการรักษา ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของ genistein ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายเอสโตรเจน ต่อปริมาณการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส แต่จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า genistein ไม่มีผลต่อกระบวนการดังกล่าวถึงแม้ว่าจะมีการปรับระดับความเข้มข้นแล้วก็ตาม แสดงว่าการลดปริมาณการหลั่งของเอสโตรเจนน่าจะเป็นผลของปัจจัยภายนอกบางอย่างมากการสังเคราะห์เอสโตรเจนไว้ มีรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า genistein สามารถเพิ่มการแสดงออกของ synaptic protein บางตัวได้ เช่น synaptophysin และอาจเกี่ยวกับกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ [6] ซึ่งอาจมีกลไกอื่นในการเหนี่ยวนำ

งานวิจัยจำนวนมากรายงานว่าในสมองของผู้สูงอายุนั้นเซลล์ไมโครเกลียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอยู่ในภาวะถูกกระตุ้น และมีการหลั่งของสารในกลุ่มของ inflammatory cytokines จำนวนมาก ที่สำคัญได้แก่ IL-6 [8, 23] ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของภาวะที่เซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้น ต่อปริมาณการหลั่งของเอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสไม่สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้ในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย และให้ผลเช่นเดียวกับการบ่มด้วย IL-6 ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียน่าจะเป็นสาเหตุหลักของการยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนและ

4. สรุปและเสนอแนะ

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจะลดลงเมื่อเข้าสู่ภาวะชรา ซึ่งเกิดจากการลดระดับการแสดงออกของ StAR ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักของภาวะสมองเสื่อมในผู้สูงอายุ ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับภาวะเซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้น ดังนั้นหากยับยั้งการกระตุ้นไมโครเกลียได้

อาจจะเป็นการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุของภาวะเซลล์ประสาทเสื่อมและทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ ซึ่งเป็นหัวข้อที่น่าสนใจที่ต้องทำการศึกษาต่อไป

5. ผลผลิต

ผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้จะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Neurotoxicology ในชื่อเรื่อง “Inhibition of hippocampal synthesized estrogen by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression” ซึ่งอยู่ระหว่างการ revised manuscript

บรรณานุกรม

1. สำนักงานปลัดกระทรวงการพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์. (2555)
2. สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2549)
3. สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล. (2546). คลินิกเวชปฏิบัติปริทัศน์: ปัญหาการดูแลผู้ป่วยสูงอายุที่มีสมองเสื่อม. วารสารคลินิก. 19 (6). กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข. (2546). แนวปฏิบัติบริการสุขภาพด้านการดูแลผู้สูงอายุ: การดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะสมองเสื่อม.
4. อำไพวรรณ พุ่มศรีสวัสดิ์. (2543). การพยาบาลจิตเวชและสุขภาพจิต แนวปฏิบัติตามพยาธิสภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ธรรมสารจำกัด.
5. Adams SM, Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM. Soy isoflavones genistein and daidzein exert anti-apoptotic actions via a selective ER-mediated mechanism in neurons following HIV-1 Tat(1-86) exposure. PLoS One. 2012; 7(5): e37540.
6. Belcher SM, Zsarnovszky A. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. J Pharmacol Exp Ther. 200; 299(2): 408-414.
7. Bertrand SJ, Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM. Endogenous amyloidogenesis in long-term rat hippocampal cell cultures. BMC Neurosci. 2011; 12: 38.
8. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med. 2012 Jun 30; 44(6): 403-411.
9. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. Neurosci Lett. 2009; 452(2): 130-135.
10. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, He H Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. Neurotox Res. 2012; 22(3): 231-248.
11. Do Rego, J.L., Seong, J.Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon, M.C., Pelletier, G., Vaudry, H. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. Frontiers in Neuroendocrine. 2009; 30: 259-301.
12. Fang, H., Tong, W., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S., Xie, Q., Dial, S.L., Moland, C.L., & Sheehan, D.M. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. Chemical Research in Toxicology. 2001; 14: 280-294.
13. Feng JF, He LL, Li D, Yuan LH, Yu HL, Ma WW, Yang Y, Xi YD, Ding J, Xiao YX, Xiao R. Antagonizing Effects of Soybean Isoflavones on β -Amyloid Peptide-Induced Oxidative

- Damage in Neuron Mitochondria of Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012; 111(4): 248-253.
14. Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., & Rune, G.M. Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research* 2011; 345: 285–294.
 15. Kim MJ, Oh SJ, Park SH, Kang HJ, Won MH, Kang TC, Park JB, Kim JI, Kim J, Lee JY. Neuronal loss in primary long-term cortical culture involves neurodegeneration-like cell death via calpain and p35 processing, but not developmental apoptosis or aging. *Exp Mol Med.* 2007; 39(1): 14-26.
 16. Kiss A, Delattre AM, Pereira SI, Carolino RG, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Zanata SM, Ferraz AC. 17 β -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas. *Behav Brain Res.* 2012; 227(1): 100-108.
 17. Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., & Rune, G.M. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Neuroscience* 2004; 24: 5913–5921.
 18. Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, Magarinos AM, Allen PB, Greengard P, Luine V, McEwen BS. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(7): 2185–2190.
 19. Luine V, Rodriguez M. Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats. *Behav Neural Biol.* 1994; 62(3): 230-236.
 20. McEwen, B.S., & Alves, S.E. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews.* 1999; 20: 279–307.
 21. Murray CA, Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci.* 1998; 18(8): 2974-2981.
 22. Navarro A, Bandez MJ, Lopez-Cepero JM, Gómez C, Boveris A. High doses of vitamin E improve mitochondrial dysfunction in rat hippocampus and frontal cortex upon aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300(4): 827-834.
 23. Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Med Sci Monit.* 2011; 17(4): BR91-96.
 24. Ojo B, Rezaie P, Gabbott PL, Cowely TR, Medvedev NI, Lynch MA, Stewart MG. A neural cell adhesion molecule-derived peptide, FGL, attenuates glial cell activation in the aged hippocampus. *Exp Neurol.* 2011; 232(2): 318-328. Epub 2011 Sep 24.
 25. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus.* 2003; 13(2): 226-234.

26. Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals* 2008; 16(2–3): 140–153.
27. Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simon, H., & Baulieu, E.E. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1995; 53: 355–360.
28. Waring SC, Rocca WA, Petersen RC, O'Brien PC, Tangalos EG, Kokmen E. Postmenopausal estrogen replacement therapy and risk of AD: a population-based study. *Neurology*. 1999; 52(5): 965-970.
29. Wehrenberg, U., Prange-Kiel, J., Rune, G.M. (2001). Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1879–1886.
30. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA*. 1998; 279(9): 688-695.
31. Yin F, Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Signaling in Brain Aging and Neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Sep 5.
32. Zeng Y, Lv F, Li L, Yu H, Dong M, Fu Q. 7,8-dihydroxyflavone rescues spatial memory and synaptic plasticity in cognitively impaired aged rats. *J Neurochem*. 2012; 122(4): 800-811.

ภาคผนวก

จดหมายการ Revised Manuscript จาก editor

Ref.: Ms. No. NEUTOX-D-14-00086R1

Inhibition of hippocampal synthesized estrogen by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression
Neurotoxicology

Dear Dr. chamniansawat,

Reviewers have now commented on your paper. You will see that they are advising that you revise your manuscript. If you are prepared to undertake the work required, I would be pleased to consider your revised manuscript for acceptance and publication.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

If you decide to revise the work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. You have 90 days to complete your revision. If your revision is not returned within 90 days we will withdraw your manuscript. You may resubmit as a new manuscript and you should include the history of the first submission. Under special circumstances extensions to the 90 day revision will be granted provided you contact the Editor with your request.

To submit a revision, go to <http://ees.elsevier.com/neutox/> and log in as an Author. You will see a menu item call Submission Needing Revision. You will find your submission record there.

NOTE: Upon submitting your revised manuscript, please upload the source files for your article. For additional details regarding acceptable file formats, please refer to the Guide for Authors at: <http://www.elsevier.com/journals/neurotoxicology/0161-813X/guide-for-authors>

When submitting your revised paper, we ask that you include the following items:
Manuscript and Figure Source Files (mandatory)

We cannot accommodate PDF manuscript files for production purposes. We also ask that when submitting your revision you follow the journal formatting guidelines. Figures and tables may be embedded within the source file for the submission as long as they are of sufficient resolution for Production. For any figure that cannot be embedded within the source file (such as *.PSD Photoshop files), the original figure needs to be uploaded separately. Refer to the Guide for Authors for additional information.
<http://www.elsevier.com/journals/neurotoxicology/0161-813X/guide-for-authors>

Highlights (mandatory)

Highlights consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See the following website for more information
<http://www.elsevier.com/highlights>

Graphical Abstract (optional)

Graphical Abstracts should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Refer to the following website for more information: <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>

Please note that this journal offers a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown next to published articles on ScienceDirect (see also <http://www.elsevier.com/audioslides>). If your paper is accepted for publication, you will automatically receive an invitation to create an AudioSlides presentation.

Yours sincerely
Marion Ehrich, PhD
Neurotoxicology

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวศิริพร จำเนียรสวัสดิ์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Siriporn Chamniansawat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3240100446071
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่ 169 ถ. ลงหาด
บางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์: 038-103175, โทรสาร: 038-393497
E-mail: siripornc@buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
 - 5.1.ปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปีที่สำเร็จ 2547
 - 5.2.ปริญญาโท สาขากายวิภาคศาสตร์ (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่สำเร็จ 2549
 - 5.3.ปริญญาเอก สาขากายวิภาคศาสตร์และชีววิทยาโครงสร้าง (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล
ปีที่สำเร็จ 2552

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ประสาทวิทยาศาสตร์
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 - 6.1. หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - 6.1.1. บทบาทของการสังเคราะห์เอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทในภาวะที่มีการให้สาร inflammatory cytokines แก่เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron
ทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาณ 2554
 - 6.1.2. ผลของการอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของ local hippocampal estrogen ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาท hippocampus
ทุนพัฒนาศักยภาพศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สกว.- สกอ.) ปี 2554-2555
7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน
 - 7.1. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Exp Mol Med*. 2012;44(6):403-411. ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2554 และ ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 2554-2555
 - 7.2. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Modulation of microglia in response to prolonged exposure to high glucocorticoid level, implication from an in vitro model of chronic depression. *Journal of Neurochemistry* 2010; Suppl 1: 19. ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ให้แก่ รศ.ดร.สุชมาล จงธรรมคุณ)
 - 7.3. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2010; 470: 49-54. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
 - 7.4. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) via MAPK- and PI-3K dependent pathways in SH-

ประสาทกายวิภาคศาสตร์ และ ประสาทวิทยาศาสตร์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1. หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อแผนวิจัย

7.1.1. Study on mechanisms of angiogenesis and proliferation of glioma 2555-2557

7.1.2. Molecular mechanisms in neuroglia for neuroprotection 2553-2554

7.1.3. Neuronal plasticity and brain development 2551-2552

7.1.4. Neuronal injury affecting neuronal plasticity and brain development 2549-2551

7.2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย: ชื่อแผนวิจัย

7.2.1. Molecular mechanisms of neuroplasticity on drug addiction and related neuro-psychiatric problems 2552-2554

8. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย การเผยแพร่ และแหล่งทุน

8.1. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Exp Mol Med*. 2012; 44(6): 403-411.

8.2. Tocharus J, Khonthun C, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J Pineal Res* 2010; 48(4): 347-352.

8.3. Raksakulkiat R, Leechavengvongs S, Malungpaishrope K, Uerpaiojkit C, Witoonchart K, Chongthammakun S. Restoration of winged scapula in upper arm type brachial plexus injury: anatomic feasibility. *J Med Assoc Thai* 2009; 92 Suppl 6: S244-S250

8.4. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2010; 470(1): 49-54.

8.5. Kachadroka S, Hall AM, Niedzielko TL, Chongthammakun S, Floyd CL Effect of endogenous androgens on 17beta-estradiol-mediated protection after spinal cord injury in male rats. *J Neurotrauma* 2010; 27(3): 611-626.

8.6. Ukrit A, Leechavengvongs S, Malungpaishrope K, Uerpaiojkit C, Chongthammakun S, Witoonchart K Nerve transfer for wrist extension using nerve to flexor digitorum superficialis in cervical 5, 6, and 7 root avulsions: anatomic study and report of two cases. *J Hand Surg Am* 2009 Nov; 34(9): 1659-1666.

8.7. Viwatpinyo K, Chongthammakun S. Activation of group I metabotropic glutamate receptors leads to brain-derived neurotrophic factor expression in rat C6 cells. *Neurosci Lett* 2009; 467(2): 127-130.

8.8. Thampithak A, Jaisin Y, Meesarapee B, Chongthammakun S, Piyachaturawat P, Govitrapong P, Supavilai P, Sanvarinda Y. Transcriptional regulation of iNOS and COX-2 by a novel compound from *Curcuma comosa* in lipopolysaccharide-induced microglial activation. *Neurosci Lett* 2009; 462(2): 171-175.

8.9. Chamniansawwat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2009; 452(2): 130-131.

- 8.10. Chongthammakun V, Sanvarinda Y, Chongthammakun S. Reactive oxygen species production and MAPK activation are implicated in tetrahydrobiopterin-induced SH-SY5Y cell death. *Neurosci Lett* 2009; 449(3): 178–182.
- 8.11. Tocharus J, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin inhibits amphetamine-induced nitric oxide synthase mRNA overexpression in microglial cell lines. *Neurosci Lett* 2008; 439(2): 134–137.
- 8.12. Chindewa R, Lapanantasin S, Sanvarinda Y, Chongthammakun S. Pueraria mirifica, phytoestrogen-induced change in synaptophysin expression via estrogen receptor in rat hippocampal neuron. *J Med Assoc Thai* 2008; 91(2): 208–214.
- 8.13. Malungpaishrope K, Leechavengvongs S, Uerpaiojkit C, Witoonchart K, Jitprapaikulsarn S, Chongthammakun S. Nerve transfer to deltoid muscle using the intercostal nerves through the posterior approach: an anatomic study and two case reports. *J Hand Surg [Am]* 2007; 32(2): 218–224.
- 8.14. Lapanantasin S, Chongthammakun S, Floyd CL, Berman RF. Effects of 17beta-estradiol on intracellular calcium changes and neuronal survival after mechanical strain injury in neuronal-glial cultures. *Synapse* 2006; 60(5): 406–410.
- 8.15. Chaovipoch P, Jelks KA, Gerhold LM, West EJ, Chongthammakun S, Floyd CL. 17beta-estradiol is protective in spinal cord injury in post- and pre-menopausal rats. *J Neurotrauma* 2006; 23(6): 830–852.
- 8.16. Jantaratnotai N, Utaisincharoen P, Piyachaturawat P, Chongthammakun S, Sanvarinda Y. Inhibitory effect of Curcuma comosa on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. *Life Sci* 2006; 78(6): 571–577.
- 8.17. Sattayaprasert P, Choi HB, Chongthammakun S, McLarnon JG. Platelet-activation factor enhancement of calcium influx and interleukin-6 expression, but not production, in human microglia. *J Neuroinflammation* 2005; 2(1): 11–19.
- 8.18. Chanyachukul T, Yoovathaworn K, Thongsard W, Chongthammakun S, Navasumrit P, Satayavivad J. Attenuation of paraquat-induced motor behavior and neurochemical disturbances by L-valine in vivo. *Toxicol Lett* 2004; 150(3): 259–269.

-
- | | |
|-------------------------------|---|
| 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) | นายณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน |
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) | Mr. Narongrit Thongon |
| 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน | 5340400106131 |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ |
| 4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ | คณะสหเวชศาสตร์ ม.บูรพา 169 ถ.ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข
อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี 20131 |

โทรศัพท์ 03-810-3166 หรือ 085-020-7189

โทรสาร 03-839-3497 e-mail; narongritt@buu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1.ปริญญาตรี สาขาวิชากายภาพบำบัด (เกียรตินิยมอันดับสอง) คณะเทคนิคการแพทย์ ม. ขอนแก่น ปีที่สำเร็จ 2547

5.2.ปริญญาเอก สาขาวิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล ปีที่สำเร็จ 2551

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ: สรีรวิทยาของการขนส่งสารผ่าน epithelium

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1. หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.1.1. กลไกการออกฤทธิ์ของโพรแลคตินฮอร์โมนในการกระตุ้นการขนส่งแคลเซียมอย่างฉับพลันในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2552 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

7.1.2. ผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ต่อการขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่าน ช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ทุนพัฒนาศักยภาพศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สกว.- สกอ.) ปี 2553

8. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

8.1. Thongon N*, Krishnamra N. Omeprazole suppresses magnesium transport across Caco-2 monolayers. World J Gastroenterol 2010 (accepted). ทุนพัฒนาศักยภาพศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี 2553 (สกว.-สกอ.)

8.2. Thongon N, Nakkrasae L, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKC ζ -dependent Cav1.3-mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin. Am J Physiol Cell Physiol 2009; 296: C1373-C1382. ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2552 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และงบประมาณการวิจัยเทียบโอนจากงบประมาณการเดินทางไปต่างประเทศ ทุน คปก. รุ่นที่ 8

8.3. Nakkrasae L, Thongon N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Transepithelial calcium transport in prolactin-exposed intestine-like Caco-2 monolayer after combinatorial knockdown of TRPV5, TRPV6 and Cav1.3. J Physiol Sci 2010; 60: 9-17.

8.4. Charoenphandhu N, Nakkrasae L, Kraidith K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon N, Krishnamra N. Two-step stimulation of intestinal Ca²⁺ absorption during lactation by long-term prolactin (PRL) exposure and suckling-induced PRL surge. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009; 297: E609-E619.

8.5. Thongon N, Nakkrasae L, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and Rock pathways. Am J Physiol Cell Physiol 2008; 294: C1158-C1168. ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รุ่นที่ 8

- 8.6. Wongdee K, Pandaranandaka J, Teerapornpuntakit J, Tudpor K, Thongbunchoo J, Thongon N, Jantarajit W, Krishnamra N and Charoenphandhu N. Osteoblasts express claudins and tight junction-associated proteins. *Histochem Cell Biol* 2008; 103(1): 79–90.
- 8.7. Jantarajit W (co-author), Thongon N (co-author), Pandaranandaka J, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide-3-kinase pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E372–E384.
ทุนโครงการ
ปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รุ่นที่ 8