

Abstract

Project Code: TRG5580013

Project Title: Functional characterizations of antioxidant enzymes in renal tubular cells induced by calcium oxalate crystal adhesion in kidney stone disease

Investigator: Juthatip Manissorn

Mahidol university

E-mail Address: m_juthatip@yahoo.com

Project Period: 2 years

Adhesion of calcium oxalate crystals on renal tubular epithelial cells is a critical event that triggers many cascades of cellular responses such as the alteration in protein expressions. The aim of this study was to clarify protein function based on proteome data. From our previous study, calcium oxalate dihydrate (COD) crystals (1000 µg/mL) induced down-regulation of various intracellular proteins in renal distal tubular epithelial cells (MDCK) such as anti-oxidant enzymes, proteasomes, and cytoskeletal proteins. Western blot analysis was performed to validate proteome changed. The result showed that anti-oxidant enzyme (SOD1) was not changed whereas cytoskeletal protein (alpha-tubulin) was dramatically decreased. Therefore, in this study, we further clarify the protective roles of alpha-tubulin during COD crystal adhesion in MDCK cells using overexpression technique. Cell death and cell proliferation were observed by trypan blue exclusion assay. The results indicated that alpha-tubulin overexpression could inhibit cell death and promote cell proliferation in MDCK cells. Wound healing assay which was generated by scratch method revealed that cell migration and tissue repair were increased in alpha-tubulin overexpressing cells. Moreover, crystal adhesion assay showed the reduction of crystal adhesion in alpha-tubulin overexpressing cells. Apical membrane isolation using peeling method confirmed that alpha-tubulin overexpression could attenuate crystal adhesion by decreasing some potential crystal-binding proteins including HSP90, HSP70, and alpha-enolase. This finding implied that alpha-tubulin has important role for protecting renal tubular epithelial cells during COD crystal adhesion.

Keywords: Alpha-tubulin, overexpression, calcium oxalate dihydrate (COD), MDCK cells, kidney stone disease

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5580013

ชื่อโครงการ: การศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ท่อไตที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการยึดเกาะของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลทในโรคหัวใจ

ชื่อนักวิจัย: จุฑาทิพย์ มานิสสรณ์ (มหาวิทยาลัยมหิดล)

E-mail Address: m_juthatip@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

การยึดเกาะของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลทในเซลล์ท่อไตส่งผลต่อกระบวนการตอบสนองของเซลล์ในหลายด้าน เช่น การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาโปรตีนในเชิงหน้าที่โดยอาศัยข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าแคลเซียมอ็อกซาเลทชนิดไดไฮเดรตปริมาณ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ชักนำให้โปรตีนหลายชนิดในเซลล์ท่อไตมีปริมาณลดลง เช่น กลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โปรตีนเอโซม และโปรตีนกลุ่มที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ การตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนภายในเซลล์โดยเทคนิค Western blot พบว่ากลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น SOD1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่พบว่าโปรตีนกลุ่มที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เช่น โปรตีนอัลฟา-ทูบูลิน มีการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงอย่างชัดเจน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอัลฟา-ทูบูลินต่อการยึดเกาะของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลทชนิดไดไฮเดรตในเซลล์ท่อไต โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการตายของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยใช้เทคนิคการติดสีของ trypan blue ผลการทดลองแสดงว่าโปรตีนอัลฟา-ทูบูลินที่มีการเพิ่มการแสดงออก สามารถป้องกันการตายของเซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ท่อไต การศึกษาผลต่อการสมานแผลของเซลล์โดยเทคนิคการทำเซลล์ให้เกิดรอยแผลบ่งชี้ว่าโปรตีนอัลฟา-ทูบูลินช่วยในการสมานแผลของเซลล์ได้ดีขึ้น นอกจากนี้โปรตีนอัลฟา-ทูบูลินยังช่วยลดการยึดเกาะของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลทชนิดไดไฮเดรตในเซลล์ท่อไตได้ การศึกษาโปรตีนบนผิวเซลล์แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีนอัลฟา-ทูบูลินช่วยลดโปรตีนที่สามารถจับกับผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลทบนผิวเซลล์ได้ เช่น HSP90, HSP70, และ alpha-enolase งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนอัลฟา-ทูบูลิน มีความสำคัญต่อเซลล์ท่อไตในการป้องกันการยึดเกาะของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลทชนิดไดไฮเดรต

คำหลัก: อัลฟา-ทูบูลิน, การเพิ่มการแสดงออก, แคลเซียมอ็อกซาเลทชนิดไดไฮเดรต, เซลล์ท่อไต, โรคหัวใจ