ACUTE ACTIONS AND SIGNALING TRANSDUCTION OF PROLACTIN ON TRANSEPITHELIAL CALCIUM TRANSPORT IN EPITHELIAL-LIKE CACO-2 MONOLAYER

NARONGRIT THONGON

A THESIS SUMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHYSIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

กลไกระดับเซลล์ของโพรแลคตินฮอร์โมนในการกระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมอย่างฉับพลันในเซลล์เพาะเลี้ยง CACO-2 (ACUTE ACTIONS AND SIGNALING TRANSDUCTION OF PROLACTIN ON TRANSEPITHELIAL CALCIUM TRANSPORT IN EPITHELIAL-LIKE CACO-2 MONOLAYER)

ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น 4736655 SCPS/D
ปร.ด. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นทีทิพย์ กฤษณามระ, ปร.ด., นรัตถพล เจริญพันธุ์, พ.บ., ปร.ด., ชุมพล ผลประมูล, Ph.D., ตวงพร สุทธิพงษ์ชัย, Ph.D., สุทธาสินี ปุญญโชติ, สพ.บ., Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโพรแลคตินมีฤทธิ์กระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมในลำไส้ของหนูขาว แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกการออกฤทธิ์ของโพรแลคติน จุดประสงค์ของการวิจัยนี้คือศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของโพรแลคตินในเซลล์เพาะเลี้ยงคาโคทู (Caco-2) โดยเลี้ยงแผ่นเยื่อ Caco-2 เป็นเวลา 14 วัน ก่อนที่จะเลี้ยงในสารละลายที่มีโพรแลคตินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงศึกษาการขนส่งแคลเซียมผ่านแผ่นเยื่อดังกล่าว

จากการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ คอนโฟคอลอิมมูโนไซโตเคมิสตรี พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มีตัวรับโพรแลคตินทั้งแบบสั้น กลาง และแบบยาว ทั้งในระดับสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 สามารถตอบสนองต่อโพรแลคตินได้ จากการศึกษาการขนส่งแคลเซียมพบว่าโพรแลคตินมีฤทธิ์กระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมแบบใช้พลังงาน โดยโพรแลคตินที่ความเข้มข้น 600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งนี้ แอลวาย-294002 (สารยับยั้งฟอสโฟอิโนสิไทด์ 3-ไคเนส) ยีเอฟ-109203เอ็กซ์ (สารยับยั้งโปรตีนไคเนสซี) วาย-27632 (สารยับยั้งโรห์ร็อค) และ การ์น็อคดาว์น ตัวรับโพรแลคตินแบบยาว ยับยั้งฤทธิ์ของโพรแลคตินในการกระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมแบบใช้พลังงาน นอกจากนี้ยังพบว่าโพรแลคตินมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมแบบไม่ใช้พลังงานและเพิ่มการยอมให้แคลเซียมผ่านแผ่นเยื่อ ทั้งนี้ แอลวาย-294002 และ วาย-27632 สามารถยับยั้งฤทธิ์ของโพรแลคตินในการกระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมแบบไม่ใช้พลังงาน จากการศึกษาด้วยเทคนิคไดลูชั่นโพเทนเชียล และ แค็ทไอออนิคดิฟฟิวชั่นโพเทนเชียลพบว่า โพรแลคตินเพิ่มคุณสมบัติในการยอมให้อิออนประจุบวกผ่านไม่ว่าจะเป็น ลิเธียม โซเดียม โพแทสเซียม รูบิเดียม และซีเซียม โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติการยอมให้อิออนประจุลบ คือคลอไรด์ผ่าน ทั้งนี้ แอลวาย-294002 และ วาย-27632 ส่งผลยับยั้งฤทธิ์ของโพรแลคตินในการเพิ่มคุณสมบัติการยอมให้อิออนประจุบวกผ่าน จากการศึกษาการคัดเลือกขนาดสารให้ผ่านแผ่นเยื่อโดยใช้แมนนิทอลล์ติดสลากรังสีและโพลีเอ็ททิลลีนไกลคอลติดสลากรังสี พบว่าโพรแลคตินไม่มีฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการเลือกขนาดสาร

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า โพรแลคตินออกฤทธิ์ผ่านกลไก ฟอสโฟอิโนสิไทด์ 3-ไคเนส โปรตีนไคเนสซี และโรห์ร็อคเพื่อกระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมแบบใช้พลังงาน นอกจากนี้โพรแลคตินยังออกฤทธิ์ผ่านกลไก ฟอสโฟอิโนสิไทด์ 3-ไคเนส และ โรห์ร็อค ในการกระตุ้นการขนส่งแคลเซี่ยมแบบไม่ใช้พลังงาน และการเพิ่มคุณสมบัติในการยอมให้อิออนประจุบวกผ่าน

113 หน้า

Copyright by Mahidol University

ACUTE ACTIONS AND SIGNALING TRANSDUCTION OF PROLACTIN ON TRANSEPITHELIAL CALCIUM TRANSPORT IN EPITHELIAL-LIKE CACO-2 MONOLAYER

NARONGRIT THONGON 4736655 SCPS/D

Ph.D. (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISORS: NATEETIP KRISHNAMRA, Ph.D., NARATTAPHOL CHAROENPHANDHU, M.D., Ph.D., CHUMPOL PHOLPRAMOOL, Ph.D., TUANGPORN SUTHIPHONGCHAI, Ph.D., SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.M.V., Ph.D.

ABSTRACT

Previous investigations demonstrated the stimulatory effect of prolactin (PRL) on intestinal calcium (Ca) absorption, but the mechanism is unknown. The present study, therefore, aimed to elucidate the mechanism of PRL in the regulation of Ca transport in Caco-2 monolayer. To study intestinal Ca absorption, the Caco-2 monolayer grown on Snapwell for 14 days was exposed to recombinant human PRL (rhPRL) for 1 h before measurement of Ca fluxes in the Ussing chamber.

Human PRL receptors (hPRLR) (short, intermediate, and long isoforms) were identified in Caco-2 cells by PCR and immunocytochemistry, suggesting that Caco-2 cells were targets of PRL action. Results from Ussing experiments showed that rhPRL increased the active Ca flux in a dose-dependent manner with the maximal effective dose of 600 ng/mL. This effect was completely abolished by long-isoform hPRLR (hPRLR-L) knockdown, PI3K inhibitors (wortmannin and LY294002), PKC inhibitor (GF109203X), and ROCK inhibitor (Y27632), but not by MAPK inhibitor (U0126) or JAK2 inhibitor (AG490). PRL also increased the paracellular passive Ca transport and Ca permeability, both of which were abolished by PI3K and ROCK inhibitors. Dilution and cationic diffusion potential experiments demonstrated that rhPRL significantly increased P_{Li}/P_{Cl}, P_{Na}/P_{Cl}, P_{K}/P_{Cl}, P_{Rb}/P_{Cl}, and P_{Cs}/P_{Cl}, i.e., rhPRL increased cation selectivity of the monolayer. This effect was also abolished by PI3K and ROCK inhibitors. Size selectivity of the monolayer was investigated by measuring the dual ^{3}H-mannitol/^{14}C-polyethylene glycol (PEG) fluxes. The results showed that rhPRL had no effect on the size selectivity of Caco-2 monolayer.

In conclusion, PRL rapidly stimulated active Ca transport in Caco-2 monolayer via the non-genomic PI3K, PKC, and ROCK signaling pathways. Such actions of PRL were mediated by hPRLR-L. PRL also enhanced the paracellular passive Ca transport and increased paracellular permeability through the PI3K and ROCK pathways.

KEY WORDS : CACO-2 CELL / CALCIUM TRANSPORT / PROLACTIN / PROLACTIN SIGNALING / PERMEABILITY

113 pp.

Copyright by Mahidol University