ENHANCING EFFECT OF L-GLUTAMATE ON METHYLMERCURY-INDUCED TOXICITY

SIRIRAT AMONPATUMRAT

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

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

ผลของสารแอลกลูตาเมทในการเสริมความเป็นพิษของสารเมททิลเมอร์คิวรี่
(ENHANCING EFFECT OF L-GLUTAMATE ON METHYLMERCURY-INDUCED TOXICITY)

สิริรัตน์ อมรปทุมรัตน์ 4636543 SCTX/D

ปร.ด. (พิษวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์, ปร.ด., Yoshikatsu Kanai, M.D., Ph.D., สุดา เรียงโรจน์พิทักษ์, Ph.D., สุรวัฒน์ จริยาวัฒน์, ปร.ด.

บทคัดย่อ

สารเมททิลเมอร์คิวรี่ (MeHg) เป็นสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม จากคุณสมบัติการละลายในไขมันได้ดีของสารและว่องไวต่อการรวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทำให้ MeHg สามารถแพร่กระจายไปในที่ต่างๆ ได้ดีและสะสมไปทั่วร่างกาย ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ L-Glutamate (L-Glu) ต่อการเสริมความเป็นพิษของ MeHg โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa S3) เนื่องจากมีความคงทนต่อพิษของ MeHg ผลการศึกษาพบว่าในบรรดากรดอะมิโนทั้งหมด 20 ชนิดมีเฉพาะ L-Glu เท่านั้นที่เสริมความเป็นพิษของ MeHg เป็นข้อมูลยืนยัน L-Glu มีความจำเพาะต่อการเสริมความเป็นพิษ การศึกษากลไกของการเสริมความเป็นพิษของ L-Glu ต่อ MeHg ในระดับโมเลกุลนั้นโดยในเบื้องต้นได้ทำการวิเคราะห์ด้วย DNA microarray เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนด้วย Gene Ontology พบว่าการออกฤทธิ์เสริมความเป็นพิษของ L-Glu ต่อ MeHg เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟและการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ตามมาแบบอะพอพโทสิส โดย L-Glu ออกฤทธิ์เสริมความเป็นพิษชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสเพิ่มมากยิ่งขึ้น L-Glu ยังทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (ROS) ในเซลล์เพิ่มขึ้น และลดระดับของกลูตาไทโอนภายในเซลล์ที่ได้รับ MeHg ลงไปอีก ในทางตรงกันข้ามการตายของเซลล์ลดน้อยลงเมื่อเซลล์ให้สาร *N*-acetylcysteine ก่อนชักนำให้เกิดความเป็นพิษ เนื่องจากความจำเพาะของ L-Glu ที่เสริมความเป็นพิษของ MeHg ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับบทบาทในการทำงานของระบบการขนส่ง x^-_C ที่เกี่ยวข้องกับ L-Glu ร่วมกับ MeHg เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ L-Glu หรือ MeHg เพียงอย่างเดียว การทำงานของ x^-_C เพิ่มมากขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าการขนส่ง [^{14}C]L-cystine ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับ L-Glu และ/หรือ MeHg สามารถถูกยับยั้งได้โดย cystine, L-Glu และ L-AAD ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อการขนส่ง [^{14}C]L-cystine อย่างไรก็ตาม L-Asp ไม่สามารถยับยั้งการขนส่ง [^{14}C]L-cystine ได้ นอกจากนี้ เมื่อเซลล์ได้รับตัวยับยั้งจำเพาะต่อ Glu receptor ได้แก่ NMDA, KA และ AMPA พบว่าสารดังกล่าวไม่ทำให้ความเป็นพิษของ MeHg เพิ่มขึ้น จากข้อมูลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า L-Glu มีความจำเพาะในการออกฤทธิ์เสริมความเป็นพิษของ MeHg โดยกลไกการทำงานผ่านกลไกการยับยั้งระบบขนส่ง x^-_C ความเป็นพิษที่เพิ่มขึ้นหลังจากเซลล์ได้รับทั้ง L-Glu และ MeHg เป็นการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน เนื่องจากเมื่อเซลล์ได้รับเพียง L-Glu หรือ MeHg จะเกิดความเป็นพิษเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากกลไกที่ได้กล่าวมาข้างต้นอาจจะนำไปใช้อธิบายความเป็นพิษที่เกิดจากการออกฤทธิ์เสริมกันของ L-Glu และ MeHg ที่พบได้ในเซลล์ประสาท (neuroblastoma cell lines) และระบบประสาท

124 หน้า

Copyright by Mahidol University

ENHANCING EFFECT OF L-GLUTAMATE ON METHYLMERCURY-INDUCED TOXICITY

SIRIRAT AMONPATUMRAT 4636543 SCTX/D

Ph.D. (TOXICOLOGY)

THESIS ADVISORS: PAWINEE PIYACHATURAWAT, Ph.D., YOSHIKATSU KANAI, M.D., Ph.D., SUDA RIENGROJPITAK, Ph.D., SURAWAT JARIYAWAT, Ph.D.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is a well-known environmental toxicant. With its lipophilic nature and high reactivity to sulfhydryl groups, it is widely distributed and accumulated in the body and causes cells damage. The present study aimed to investigate the enhancing effect of L-Glutamate (L-Glu) on MeHg cytotoxicity in HeLa S3 cells. The results showed that among 20 natural L-amino acids, only L-Glu markedly enhanced the MeHg-induced toxicity. L-Glu. L-Glu exhibited concentration-dependent enhancement in MeHg cytotoxicity. Furthermore, the effect of Glu-related amino acid on the MeHg induced toxicity revealed that L-Glu and L-AAD were similarly effective in enhancing MeHg toxicity, whereas D-Glu, L-Asp and D-Asp were not effective in enhancing the MeHg toxicity. Thus, MeHg toxicity was specifically enhanced by L-Glu. The molecular mechanism underlying the phenomena was then investigated using DNA microarray analysis. Gene expression profile and Gene Ontology (GO) analysis implicated that the induction of stress and apoptosis were involved. We further showed that the enhancement of the toxicity was accompanied by the enhanced apoptosis as indicated by the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), the increases in externalized phosphatidylserine (PS) level and activation of caspase-3 activity. Moreover, L-Glu also enhanced MeHg-induced production of reactive oxygen species (ROS) and the depleted intracellular GSH levels. Pretreatment with the anti-oxidant, *N*-acetylcysteine (NAC) greatly alleviated the cytotoxicity, suggesting an enhanced oxidative stress associated with L-Glu-elicited increase of MeHg toxicity. The role of the transport system x^-_C in the enhancement of MeHg cytotoxicity by L-Glu was then studied, and the results found that co-treatment with MeHg plus L-Glu increased the expression of xCT mRNA, supporting the role of oxidative stress as the underlying mechanism in the enhancement of toxicity. The activity of x^-_C slightly increased by treating it with L-Glu or MeHg, but greatly increased by co-treatment with MeHg plus L-Glu. In addition, the increased [^{14}C]L-cystine uptake in the cells treated with MeHg and/or L-Glu was competitively inhibited by unlabeled cystine as well as by L-Glu and L-AAD but not by L-Asp. The glutamate receptor agonists; NMDA, KA, and AMPA, failed to enhance the MeHg toxicity, suggesting the inhibition of system x^-_C by L-Glu underlying its enhancement of MeHg cytotoxicity. The enhancement was highly synergistic as MeHg and L-Glu alone exhibited little toxic effect on the conditions used. This synergism also occurred in neural cells (neuroblastoma cell lines), suggesting that the similar mechanisms may underlie the neural toxicity of MeHg.

KEY WORDS: METHYLMERCURY/ L-GLUTAMATE/ CYTOTOXICITY/ OXIDATIVE STRESS/ TRANSPORT SYSTEM x^-_C

124 pp..

Copyright by Mahidol University