EFFECT OF PROLACTIN ON CALCIUM METABOLISM IN MAMMARY GLAND CELLS

UTCHARIYA ANANTAMONGKOL

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

ผลของโพรแลคตินต่อแคลเซียมเมตาบอลิซึมในเซลล์เต้านม (THE EFFECT OF PROLACTIN ON CALCIUM METABOLISM IN THE MAMMARY GLAND CELLS)

อัจฉริยา อนันตมงคล 4637304 SCPS/D
ปร.ด. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นทีทิพย์ กฤษณามระ, ปร.ด., ตวงพร สุทธิพงษ์ชัย, ปร.ด., ศิริวรรณ พราพงษ์, สพ.บ., ปร.ด.จงกลณี วัฒนาเพิ่มพูล, ปร.ด., MRINALINI CHATTA RAO, Ph.D.

บทคัดย่อ

ถึงแม้แคลเซียม (Ca^{2+}) จะเป็นอิออนที่มีความเข้มข้นสูงสุดในน้ำนม แต่กลไกการขับหลั่งและการควบคุม Ca^{2+} ในเซลล์เต้านมกลับยังไม่เป็นที่เข้าใจ งานวิจัยนี้จึงตั้งสมมติฐานว่าโพรแลคติน ซึ่งเป็นฮอร์โมนหลักที่กระตุ้น การผลิตและหลั่งน้ำนม อาจมีผลกระตุ้นการขับหลั่ง Ca^{2+} และ/หรือ ระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ซึ่งสามารถควบคุมการขนส่งอื่นๆอีกด้วย การวิจัยเริ่มโดยศึกษาผลของโพรแลคตินต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ($[Ca^{2+}]_i$) พบว่าการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ MCF-7 ในโพรแลคติน (1 μg/ml) เป็นเวลา 24 ชม. มีผลลด $[Ca^{2+}]_i$ ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วย ATP หรือ แธพซิการ์กิน การลด $[Ca^{2+}]_i$ นี้ เป็นผลเนื่องมาจากมีการสร้าง mRNA ของ SPCA2 เพิ่มขึ้น จึงมีการขนส่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์ เข้าสู่กอลไจอัพพาราตัส เพื่อหลั่งมาในน้ำนมมากขึ้นด้วย งานต่อไปคือวัดการสังเคราะห์ mRNA ของช่องขนส่ง Ca^{2+} TRPC พบว่า TRPC ชนิดที่มีมากที่สุดใน MCF-7 ในเซลล์เต้านมของหนูถีบจักร (HC-11) และในเนื้อเยื่อเต้านมของหนูขาวได้แก่ TRPC1/TRPC3 และ TRPC1 และ TRPC6 ตามลำดับ โพรแลคตินอย่างเดียวไม่มีผลใดๆ ต่อ mRNA ของ TRPC3 ในเซลล์ HC-11 และพบว่า เซลล์เต้านมของสัตว์แต่ละชนิดจะมีการกระจายตัวของ TRPC ต่างกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ยา 2-APB ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง TRPCs ในการทดลอง สามารถพิสูจน์ได้ว่า TRPCs ทำหน้าที่เป็นช่องให้ Ca^{2+} ผ่านเข้ามาในเซลล์

เพื่อศึกษาว่าโพรแลคตินใช้ตัวรับสัญญาณโปรแลคติน (PRLR) ชนิดใดในการควบคุม Ca^{2+} เราใช้เซลล์ HC-11ซึ่งมีแต่ PRLR แบบยาว พบว่าเซลล์นี้ต้องใช้โพรแลคตินและเดกซาเมธาโซน (PRL+D) เสริมฤทธิ์กันเพื่อออกฤทธิ์ลด $[Ca^{2+}]_i$ ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นของ ATP นอกจากนั้นยังพบว่าโพรแลคตินไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ mRNA ของ SPCA2 แต่มีผลลดการสังเคราะห์ mRNA ของ TRPC3 และพบว่าการปลูกถ่าย PRLR แบบสั้นในเซลล์ HC-11 มีผลลด $[Ca^{2+}]_i$ ลด mRNA ของ TRPC3 และ เพิ่ม mRNA ของ SPCA2 การให้โพรแลคตินหลังจากนั้นไม่มีผลเพิ่มเติม เพื่อศึกษาว่าโพรแลคตินมีผลควบคุมการขับหลั่ง Cl^- ผ่านทางการเปลี่ยนระดับ $[Ca^{2+}]_i$ หรือไม่ เราศึกษาการขับหลั่ง Cl^- ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย ATP และ PRL+D พบว่า PRL+D สามารถลดการขับหลั่ง Cl^- โดยมีกลไกผ่านทางการลด $[Ca^{2+}]_i$ ที่ถูกกระตุ้นด้วย ATP

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โพรแลคตินเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในน้ำนมได้โดย 1) กระตุ้นการขนส่ง Ca^{2+} เข้าสู่กอลไจอัพพาราตัส โดยการเพิ่ม SPCA2 mRNA หรือการลด TRPC3 mRNA โดยขึ้นอยู่กับชนิดเซลล์ และ 2) ยับยั้งการขับหลั่ง Cl^- เพื่อลดการขับหลั่งของเหลว โดยลดระดับ Ca^{2+} ที่ถูกกระตุ้นด้วย ATP นอกจากนั้นยังพิสูจน์ว่าเซลล์เต้านมใช้ TRPC เป็นช่องนำ Ca^{2+} เข้าเซลล์ ในเซลล์เต้านมปกติเช่น HC-11 ต้องใช้ทั้งโพรแลคตินและเดกซาเมธาโซนในการควบคุม $[Ca^{2+}]_i$ ซึ่งมีผลต่อการขับหลั่ง Cl^- ผลของโพรแลคตินต่อ $[Ca^{2+}]_i$ ในเซลล์เต้านมซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ผ่านทาง PRLR แบบสั้นและยาวด้วยกลไกที่ต่างกัน

133 หน้า

THE EFFECT OF PROLACTIN ON CALCIUM METABOLISM IN THE MAMMARY GLAND CELLS
UTCHARIYA ANANTAMONGKOL 4637304 SCPS/D
Ph.D. (PHYSIOLOGY)
THESIS ADVISORS: NATEETIP KRISHNAMRA, Ph.D. (PHYSIOLOGY), TUANGPORN SUTHIPHONGCHAI, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), SIRIWAN PRAPONG, D.V.M., Ph.D. (PHYSIOLOGY), JONGGONNEE WATTANAPERMPOOL, Ph.D. (PHYSIOLOGY), MRINALINI CHATTA RAO, Ph.D. (PHYSIOLOGY)

ABSTRACT

Although calcium (Ca^{2+}) is the major ion in milk, the mechanism and regulation of its secretion is not well understood. This study hypothesized that PRL, the major lactogenic hormone, stimulated calcium secretion and regulated its level, which in turn contributed other transport activities. First, the effect of PRL on the intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) was studied in human cancerous mammary cells, MCF-7. Twenty-four hour treatment with 1 μg/ml PRL suppressed the ATP- and thapsigargin-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. The Ca^{2+} lowering effect of PRL was not due to suppression of Ca^{2+} release or Ca^{2+} influx, but was due to enhancement of Ca^{2+} removal as a result of increased mRNA expression of the Secretory-Pathway Ca^{2+}-ATPase 2 (SPCA2) in the Golgi apparatus. These results were confirmed by the use of siRNA for SPCA2. Next, the most abundant mRNA expression of Classical Transient Receptor Potential channels (TRPCs) in MCF-7 cells, normal mouse mammary cells, (HC-11), and rat mammary tissue were found to be TRPC1, TRPC3, and TRPC1 and 6, respectively. PRL alone had no effect on the TRPC3 mRNA expression in HC-11 cells. In rat mammary tissue, TRPCs varied with stages of the reproductive phase. By using the TRPC inhibitor 2-APB, TRPCs in HC-11 cells were shown to be the channels for the Ca^{2+} influx. To find out the type of PRL receptor (PRLR) isoform involved in PRL action, HC-11 cells, which contains only the long form of PRLR were used. Co-treatment with PRL and dexamethasone (D) was required to suppress the ATP-evoked $[Ca^{2+}]_i$. Interestingly, PRL+D did not increase SPCA2 mRNA but decreased TRPC3 mRNA expression. When the short form of PRLR (PRLR-S) was transfected into the HC-11 cells, its presence decreased the ATP-evoked $[Ca^{2+}]_i$, suppressed the TRPC3 mRNA expression and increased the SPCA2 mRNA expression, all of which were not further changed by PRL+D. Finally, PRL was investigated as to whether it could affect Cl^- secretion by altering the $[Ca^{2+}]_i$. PRL+D were found to suppress Cl^- efflux apparently by decreasing ATP-evoked $[Ca^{2+}]_i$. In conclusion, PRL probably increased Ca^{2+} concentration in milk by 1) increasing Ca^{2+} uptake into the Golgi apparatus by increasing SPCA2 mRNA expression, and 2) suppressing Cl^- efflux possibly by lowering the ATP-evoked $[Ca^{2+}]_i$. As well as showing the differential distribution of Ca^{2+} influx channels TRPCs, the present study also demonstrated that HC-11 cells required PRL+D synergism for the regulation of $[Ca^{2+}]_i$, which in turn regulated Cl^- secretion. In normal mammary epithelial cells, the regulatory action of PRL on $[Ca^{2+}]_i$ may be mediated by the PRLR-L and PRLR-S.

KEYWORDS: MAMMARY EPITHELIAL CELLS/PROLACTIN/PROLACTIN RECEPTOR/CALCIUM/SPCAs/TRPCs

133 pp.