THE STUDY OF PARATHYROID HORMONE ACTION AND SIGNALING PATHWAYS IN THE REGULATION OF ION TRANSPORT IN CACO-2 MONOLAYER USING ALTERNATING CURRENT AND DIRECT CURRENT ELECTROPHYSIOLOGICAL TECHNIQUES

SUPARERK LAOHAPITAKWORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (MOLECULAR MEDICINE) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2011

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

THE STUDY OF PARATHYROID HORMONE ACTION AND SIGNALING PATHWAYS IN THE REGULATION OF ION TRANSPORT IN CACO-2 MONOLAYER USING ALTERNATING CURRENT AND DIRECT CURRENT ELECTROPHYSIOLOGICAL TECHNIQUES

SUPARERK LAOHAPITAKWORN 4702094 SCMM/D

Ph.D. (MOLECULAR MEDICINE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NARATTAPHOL CHAROENPHANDHU, M.D., Ph.D., NATEETIP KRISHNAMRA, Ph.D., SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.V.M., Ph.D.

ABSTRACT

The electrical circuit of epithelial cells, formed by the plasma membranes and tight junctions, could be explained by combinations of capacitors and resistors. However, a direct current (DC)-based technique could not determine each of the electrical components in this circuit. In the present study, alternating current (AC)-based impedance spectroscopy was applied to analyze the capacitive and resistive properties of intestinal epithelial cell line Caco-2. The results showed that Caco-2 monolayer exhibited apical (C_a) and basolateral (C_b) capacitance of 28.98 ± 0.69 and 12.36 ± 0.23 $\mu F/cm^2$, respectively, and apical (R_a) and basolateral (R_b) resistance of 2141.30 ± 222.50 and 993.96 ± 60.96 $\Omega \cdot cm^2$, respectively. Impedance analysis successfully determined the forskolin-induced reduction in the plasma membrane resistance. This technique was then applied to study the biological responses of Caco-2 cells to parathyroid hormone (PTH), the direct action of which in the intestine has not been known. PTH reduced both apical and basolateral membrane resistance but had no effect on membrane capacitance, indicating that PTH activated transporters in the plasma membrane and not transporter-rich vesicle fusion. The mechanism and signaling pathways of PTH were further examined by the DC-based Ussing chamber technique. PTH significantly increased short-circuit currents (I_{sc}) in a dose-dependent manner. HCO_3^- depletion abolished the PTH action, while Cl^- depletion had no effect, suggesting that PTH induced apical HCO_3^- secretion in Caco-2 cells. By using various inhibitors, it was found that HCO_3^- came from the uptake via the basolateral electrogenic Na^+/HCO_3^- cotransporter-1 (NBCe1) and from intracellular production catalyzed by carbonic anhydrase. HCO_3^- was later secreted through the apical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Apical Na^+/H^+ exchanger (NHE)-3 and basolateral NHE1 might help extrude excess H^+ produced by carbonic anhydrase. This ion regulatory action of PTH was exerted through the protein kinase A (PKA)- and phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-dependent pathways. In conclusion, impedance analysis could be used to determine the plasma membrane capacitance and resistance of epithelial cells and help predict responses of cells to PTH. PTH induced HCO_3^- secretion in Caco-2 cells through CFTR.

KEY WORDS: ANION SECRETION/CYSTIC FIBROTIC TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR (CFTR)/ELECTROGENIC Na^+/HCO_3^- COTRANSPORTER-1(NBCe1)/PARATHYROID HORMONE

112 pages

Copyright by Mahidol University

การศึกษาผลของฮอร์โมนพาราไทรอยด์และการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการขนส่งไอออนในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดคาโคทูโดยใช้เทคนิคทางสรีรวิทยาไฟฟ้ากระแสสลับและกระแสตรง

THE STUDY OF PARATHYROID HORMONE ACTION AND SIGNALING PATHWAYS IN THE REGULATION OF ION TRANSPORT IN CACO-2 MONOLAYER USING ALTERNATING CURRENT AND DIRECT CURRENT ELECTROPHYSIOLOGICAL TECHNIQUES

ศุภฤกษ์ เลาหพิทักษ์วร 4702094 SCMM/D

ปร.ด. (เวชศาสตร์ระดับโมเลกุล)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: นรัตถพล เจริญพันธุ์, พ.บ., ปร.ด., นทีทิพย์ กฤษณามระ, ปร.ด., สุทธาสินี ปุญญโชติ, สพ.บ., Ph.D.

บทคัดย่อ

วงจรไฟฟ้าซึ่งเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์และไทจังชั่นของเซลล์เยื่อบุประกอบไปด้วยตัวเก็บประจุและตัวต้านทาน อย่างไรก็ตามการใช้ไฟฟ้ากระแสตรงไม่สามารถวัดค่าตัวเก็บประจุและตัวต้านทานเหล่านี้ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้การวัดคุณสมบัติความต้านทานไฟฟ้าซึ่งใช้อุปกรณ์ปล่อยไฟฟ้ากระแสสลับเพื่อหาค่าตัวเก็บประจุและตัวต้านทานของวงจรไฟฟ้าทั้งนี้ได้ทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงจากของลำไส้ชนิดคาโคทู ผลการทดลองพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงคาโคทูมีค่าตัวเก็บประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านเอปิเคิ้ลและด้านเบโซแลทเทอรัล คือ 28.98 ± 0.69 และ 12.36 ± 0.23 ไมโครฟารัดต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ค่าตัวต้านทานที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านเอปิเคิ้ลและด้านเบโซแลทเทอรัล คือ 2141.30 ± 222.50 และ 993.96 ± 60.96 โอห์มตารางเซนติเมตร ตามลำดับ การวัดคุณสมบัติความต้านทานไฟฟ้าตรวจพบการลดลงของความต้านทานที่เยื่อหุ้มเซลล์หลังการกระตุ้นด้วยฟอร์สโคลินได้ จากนั้นได้ประยุกต์เทคนิคดังกล่าวเพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงคาโคทูต่อฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ลดความต้านทานทั้งด้านเอปิเคิ้ลและด้านเบโซแลทเทอรัลของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อค่าตัวเก็บประจุของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนพาราไทรอยด์กระตุ้นการทำงานของโปรตีนขนส่ง แต่ไม่มีผลต่อการเชื่อมถุงเก็บโปรตีนขนส่งกับเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาโดยใช้อุซซิ่งแชมเบอร์พบว่า ฮอร์โมนพาราไทรอยด์เพิ่มกระแสไฟฟ้าของเซลล์ตามความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น การลดไบคาร์บอเนตในสารละลายสามารถลดผลของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ได้ ขณะที่การลดคลอไรด์ไม่มีผลต่อการทำงานของฮอร์โมน จึงกล่าวได้ว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์กระตุ้นการหลั่งไบคาร์บอเนตในเซลล์เพาะเลี้ยงคาโคทู จากการใช้ตัวยับยั้งหลายชนิดพบว่าไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ทางด้านเบโซแลทเทอรัลโดยอาศัยโปรตีนขนส่งเอ็นบีซีอี-1 และอาจสร้างไบคาร์บอเนตเองจากภายในเซลล์โดยอาศัยคาร์บอนิคแอนไฮเดรส ไบคาร์บอเนตออกจากเซลล์ผ่านทางซีเอฟทีอาร์ที่อยู่ด้านเอปิเคิ้ลของเซลล์ เอ็นเอชอี-3 ที่อยู่ด้านบน และเอ็นเอชอี-1 ที่อยู่ด้านเบโซแลทเทอรัลของเซลล์ อาจมีส่วนในการขับไฮโดรเจนไอออนซึ่งผลิตจากคาร์บอนิคแอนไฮเดรส ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ทำงานผ่านทางเอ็นไซม์ไคเนสเอและฟอสโฟอิโนสิไทด์-3-ไคเนส กล่าวโดยสรุปคือการวัดคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์โดยอาศัยเทคนิคไฟฟ้ากระแสสลับสามารถวัดค่าตัวเก็บประจุและตัวต้านทานของเยื่อหุ้มเซลล์และใช้พยากรณ์ผลของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ได้ และยังพบว่าฮอร์โมนนี้กระตุ้นการขับไบคาร์บอเนตในเซลล์ลำไส้ผ่านทางโปรตีนซีเอฟทีอาร์

112 หน้า

Copyright by Mahidol University