

ผลของกรวดาลโปรอิกและวาลโปรอิลยูเรียต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยโปรตีนบีตาแอมีลอยด์
ในเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอพีลิบแก้ว



นางสาว บุญรัตน์ จันทร์ทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-170-565-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF VALPROIC ACID AND VALPROYL UREA ON BETA AMYLOID PROTEIN-INDUCED
CYTOTOXICITY IN P19 EMBRYONAL CARCINOMA CELLS



Miss Boonrat Chantong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-170-565-4

นางสาว นุญรัตน์ จันทร์ทอง : ผลของกรดวาลโปรอิกและวาลโปรอิลยูเรียต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยโปรตีนปีตาแอมิลอยด์ในเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอพีสิบแก้ว (EFFECTS OF VALPROIC ACID AND VALPROYL UREA ON BETA AMYLOID PROTEIN-INDUCED CYTOTOXICITY IN P19 EMBRYONAL CARCINOMA CELLS)

อ. ที่ปรึกษา : ร.ศ. ดร. บุญยงค์ ตันตีสิริ,

อ. ที่ปรึกษาร่วม : ร.ศ. ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์, 107 หน้า ISBN 974-170-565-4

โปรตีนปีตาแอมิลอยด์เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการทำลายเซลล์ประสาทและก่อให้เกิดพยาธิสภาพในโรคอัลไซเมอร์ มีข้อมูลจำนวนมากที่ชี้ให้เห็นว่ากรดวาลโปรอิกมีคุณสมบัติในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาทโดยหลายกลไก การวิจัยครั้งนี้จึงคำนึงถึงความสามารถดังกล่าวของกรดวาลโปรอิกในการป้องกันการทำลายของเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยโปรตีนปีตาแอมิลอยด์และอนุพันธ์ของกรดวาลโปรอิกคือ วาลโปรอิลยูเรียซึ่งมีผลลดการทำงานของเซลล์ประสาทต่ำกว่าจึงควรมีผลในการป้องกันด้วยเช่นกัน ในการศึกษาได้ทำการทดสอบความสามารถของกรดวาลโปรอิกและวาลโปรอิลยูเรีย ในการป้องกันการทำลายเซลล์จากการชักนำของโปรตีนปีตาแอมิลอยด์ในเซลล์ประสาทที่ถูกเปลี่ยนมาจากเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอพีสิบแก้วซึ่งตรวจวัดการทำหน้าที่ของไมโทคอนเรียโดยใช้วิธีการวัดกั้นของสีเอ็กทีที และการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยวัดการย้อมติดสีของทริแพนบลู และการหลั่งของเอนไซม์แอลดีเอช เมื่อเติมโปรตีนปีตาแอมิลอยด์ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงและบ่มนาน 72 ชั่วโมงพบว่าผลลดความสามารถของ การวัดกั้นของสีเอ็กทีที และการย้อมติดของเซลล์ที่วัดด้วยการย้อมสีทริแพนบลูพร้อมกับมีการหลั่งของเอนไซม์แอลดีเอชอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติมเฉพาะกรดวาลโปรอิกหรือวาลโปรอิลยูเรียตั้งแต่ความเข้มข้น 1 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าไม่มีผลต่อรูปร่างและการทำงานของเซลล์ ในขณะที่เติมโปรตีนปีตาแอมิลอยด์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงพร้อมกับกรดวาลโปรอิกหรือวาลโปรอิลยูเรียพบว่ากรดวาลโปรอิกทั้งที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (100 ไมโครโมลาร์) และเท่ากับที่ใช้ในการรักษา (1000 ไมโครโมลาร์) สามารถปกป้องการถูกทำลายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่วาลโปรอิลยูเรียมีฤทธิ์ในการป้องกันได้แรงกว่ากรดวาลโปรอิกถึง 2 เท่า การทดลองเมื่อเติมกรดวาลโปรอิกหรือวาลโปรอิลยูเรียที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงก่อนเติมโปรตีนปีตาแอมิลอยด์สามารถป้องกันการทำลายเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยระยะเวลาบ่มสารที่มีผลป้องกันมากที่สุดคือ 5 วัน แต่ในการทดลองที่เติมกรดวาลโปรอิกหรือวาลโปรอิลยูเรียหลังจากเซลล์ได้รับโปรตีนปีตาแอมิลอยด์ล่วงหน้าไปก่อน 3 วันนั้นไม่สามารถลดการทำลายเซลล์ได้ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าทั้งกรดวาลโปรอิกและวาลโปรอิลยูเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการทำลายเซลล์ที่เป็นผลมาจากโปรตีนปีตาแอมิลอยด์ โดยที่วาลโปรอิลยูเรียมีฤทธิ์สูงกว่า อย่างไรก็ตามสารทั้งสองไม่สามารถทำให้เซลล์ที่ถูกทำลายไปแล้วกลับมาทำหน้าที่ได้เหมือนเดิม นอกจากนี้วาลโปรอิลยูเรียอาจเป็นสารที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อใช้รักษาภาวะที่มีการเสื่อมของเซลล์ประสาท

ภาควิชา สรีรวิทยา

สาขาวิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิติต ... *นุญรัตน์* จันทร์ทอง
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ... *ดร. บุญยงค์ ตันตีสิริ*
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ... *ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์*

4276571933 : PHYSIOLOGY

KEY WORD: BETA-AMYLOID PROTEIN/ VALPROYL UREA/ VALPROIC ACID /
NEUROPROTECTION / P19EC

MISS BOONRAT CHANTONG : EFFECTS OF VALPROIC ACID AND VALPROYL
UREA ON BETA AMYLOID PROTEIN-INDUCED CYTOTOXICITY IN P19
EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.
BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF.
DUANGDEUN MEKSURIYEN, Ph.D., 107 pp. ISBN 974-170-565-4

β -amyloid protein ($A\beta$), was reported to be toxic on neurons in vitro and in vivo and may play a key role in the amyloid plaque formation and the pathogenesis of Alzheimer's disease. Accumulating evidence suggests that valproic acid (VPA) has neurotrophic and perhaps neuroprotective actions. A derivative of VPA, valproyl urea (VPU) has a potent anticonvulsant activity similar to VPA, but less neurotoxicity. The goal of this study was to examine the possible neuroprotective potential of VPA and VPU in a model for $A\beta$ -induced neuronal cell death in culture of neuron-like cells (NLCs) derived from P19 embryonal carcinoma cells. The assessment of neuronal injury was made by using the tetrazolium salt, XTT reduction assay for mitochondrial activity, as well as by the release of lactate dehydrogenase (LDH), and trypan blue staining to detect damaged plasma membrane. NLCs treated with aged $A\beta_{1-42}$ concentration-dependently and time-dependently exhibited toxicity which at a concentration of 5 μ M for 72 h significantly decreased the XTT reduction and the cell viability determined by trypan blue exclusion assay concomitant with the increasing of LDH release. Cells treated with VPA or VPU alone at the concentrations ranging from 1 μ M to 100 μ M produced no morphological and biochemical changes. While cotreatment with VPA and $A\beta_{1-42}$ on NLCs, significant protection was observed at the subtherapeutic concentration of 100 μ M and with almost protection at the therapeutic concentration of 1000 μ M. Neuroprotection was also elicited by VPU, but the potency of VPU was at least 2 times greater than of VPA in attenuating $A\beta$ -induced cytotoxicity. Pre-treatment of NLCs with VPA or VPU at the concentration of 100 μ M suppressed the loss of redox activity and the membrane damage caused by $A\beta_{1-42}$ at a concentration of 5 μ M with maximal protection after 5 days of pretreatment. However, post-treatment of the cells with either VPA or VPU for 3 days did not rescue the cells from the $A\beta$ -induced toxicity. VPU, like VPA, exhibited an impact on a cell survival mechanism that might enhance cellular resilience and neuronal plasticity. Interestingly, VPU was more effective than VPA in both cotreatment and pretreatment experiments. These results suggested that VPU might possess a novel neuroprotective activity, but lacking of neurorescuing against amyloid-related neurotoxicity. The data might provide additional insight into the treatment of age-related neurodegenerative disorders.

Department Physiology.

Field of study Physiology

Academic year 2001.

Student's signature... *Boonrat Chantong*
Advisor's signature... *Boonyong Tantisira*
Co-advisor's signature... *D. Duangdeun*

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was carried out in the Department of Biochemistry and the cell culture laboratory in the Department of Pharmacology, during the years 2000-2002. I express my special thanks to the personals of Department of Biochemistry for help and for friendship during my thesis work. I am greatly indebted to Assist. Prof. Dr. Thitima Pengsuparp Department of Biochemistry, for providing the excellent facilities for carrying out this study and a generous gift of chemicals. I also thank to Department of Pharmacology and Assist. Prof. Dr. Surachai Unchern for the cell culture facilities. And I would like to thank Assist. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich, Department of Pharmaceutical Chemistry, for kindly supplying n-(2-propylpentanoyl) urea.

I owe my warm gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Boonyong Tantisira, and my co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Duangdeun Meksuriyen for co-operation, criticism, encouragement and numerous discussions during the course of experimental work.

This work was financially supported by grants from the Ministry of University Affairs, Thailand, and the Graduate School, Chulalongkorn University. Fellowship for Boonrat Chantong is gratefully acknowledged.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW.....	
Neuropathology of Alzheimer's disease.....	5
Components of theories of causality.....	6
A β accumulation and APP processing in Alzheimer 's disease.....	10
Polymerization of β -amyloid peptide.....	13
Mechanisms of A β -induced cellular perturbation.....	15
Neuroprotective effect of valproic acid.....	21
P19 embryonal carcinoma cell culture model.....	24
Mechanism of retinoic acid-induced neuronal differentiation in P19 EC..	26
Biochemical and physiological properties of neuron-like cells derived from P19 cells.....	28
Detection of A β -induced neurotoxicity.....	31
III. EXPERIMENTAL.....	
Cell line and culture techniques.....	33
Determination of A β -induced cytotoxicity.....	34
Treatment of valproic acid and valproyl urea.....	35
Treatment of A β_{1-42} and valproic acid or valproyl urea.....	36
Morphology determination.....	37
Determination of cell viability.....	38
Determination of cellular acetylcholinesterase activity.....	39
Statistical analysis.....	40

	Page
IV. RESULTS	
P19 cell differentiation.....	41
Acetylcholinesterase as a marker enzyme in neuron-like cells.....	42
Effect of VPA or VPU alone on neuron-like cells.....	43
Effect of A β_{1-42} treatment on neuron-like cells.....	48
Effects of VPA or VPU on A β_{1-42} -induced cytotoxicity	
Cotreatment with VPA or VPU and A β_{1-42} on NLCs.....	50
Pretreatment with VPA or VPU on A β_{1-42} -treated cells.....	60
Post-treatment with VPA or VPU on A β_{1-42} -treated cells.....	66
V. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	70
REFERENCES.....	78
APPENDICES	
APPENDIX I CHEMICALS, SUPPLIES, EQUIPMENT.....	94
APPENDIX II PREPARATION OF REAGENTS.....	96
APPENDIX III TABLES OF RESULTS.....	99
CURRICULUM VITAE	107



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

A β	=	β -Amyloid protein
A β_{25-35}	=	β -Amyloid protein fragment 25-35
A β_{1-40}	=	β -Amyloid protein fragment 1-40
A β_{1-42}	=	β -Amyloid protein fragment 1-42
ACh	=	Acetylcholine
AChE	=	Acetylcholinesterase
AD	=	Alzheimer's disease
α -MEM	=	α -Minimal essential medium
ANOVA	=	Analysis of variance
ApoE	=	Apolipoprotein E
AP-1	=	Activator protein-1
APP	=	Amyloid precursor protein
Ara C	=	Cytosine- β -arabino-furanoside
ATPases	=	Adenosine tri-phosphatase
Bcl-2	=	B-cell lymphoma-2
BChE	=	Butyryl cholinesterase
BDNF	=	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	=	Bovine serum albumin
[Ca ²⁺] _i	=	Intracellular calcium concentration
cyclic AMP	=	Cyclic adenosine monophosphate
ChAT	=	Choline acetyltransferase
CNS	=	Central nervous system
CRABP	=	Cellular retinoic acid-binding protein
CREB	=	Cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein
CSF	=	Cerebrospinal fluid
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DNase I	=	Deoxyribonuclease I

DTNB	=	5,5'-Dithiobis(nitrobenzoic acid)
EAA	=	Excitatory amino acids
EB	=	Embryoid bodies
EC	=	Embryonal carcinoma
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	=	Endoplasmic reticulum
ERK	=	Extracellular signal regulated protein kinase
FAD	=	Familial Alzheimer's disease
FBS	=	Fetal bovine serum
GABA	=	γ -Aminobutyric acid
GAP-43	=	Growth-associated protein-43 (neuromodulin)
GRP-78	=	78-Kilodalton glucose-regulated protein
GSK	=	Glycogen synthase kinase
H ₂ O ₂	=	Hydrogen peroxide
Iso-OMPA	=	Tetraisopropyl pyrophosphoramidate
kDa	=	Kilo dalton
LDH	=	Lactate dehydrogenase
MAP	=	Mitogen-activated protein
MAP-2	=	Microtubule-associated protein 2
MAP-5	=	Microtubule-associated protein 5
MAPK	=	Mitogen activated protein kinase
MARCKS	=	Myristoylated alanine-rich C kinase substrate
MEM	=	Minimal essential medium
MK-801	=	Dizocilpine maleate
MTT	=	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NeuN	=	Neuronal nuclei marker
NCAM	=	Neuronal cellular adhesion molecules
NCS	=	Newborn calf serum
NFH	=	Neurofilament protein, high molecular weight
NFL	=	Neurofilament protein, low molecular weight
NFM	=	Neurofilament protein, medium molecular weight

NGF	=	Nerve growth factor
NLCs	=	Neuron-like cells
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NO	=	Nitric oxide
PBS	=	Phosphate-buffered saline
PC12	=	Pheochromocytoma cells
PHF	=	Paired helical filament
PI-3K	=	Phosphatidylinositol-3-kinase
PMS	=	Phenazine methosulfate
PS-1	=	Presenilin-1
RA	=	Retinoic acid
RAGE	=	Receptor for advanced glycation end products
RAR α	=	Retinoic acid receptor, subtype α
RAR β	=	Retinoic acid receptor, subtype β
RAR γ	=	Retinoic acid receptor, subtype γ
RARE	=	Retinoic acid response elements
RARs	=	Retinoic acid receptor
ROS	=	Reactive oxygen species
RXR γ	=	Retinoid X receptor, subtype γ
RXR s	=	Retinoid X receptors
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
S.E.M	=	Standard error of the mean
SPSS	=	Statistical package for social sciences
TrkB	=	Tyrosine kinase B
VPA	=	Valproic acid; 2-propylpentanoic acid
VPU	=	Valproyl urea; N-(2-propylpentanoyl) urea
VDCC	=	Voltage-dependent calcium channel
XTT	=	Sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. P19 embryonal carcinoma cells differentiated to ectodermal phenotype in response to retinoic acid.....	44
2. Cresyl violet staining of P19 embryonal carcinoma cells differentiated to ectodermal phenotype in response to retinoic acid.....	45
3. Specific AChE activity in P19 cells under different culture condition.....	46
4. Effect of VPA and of VPU on metabolic activity of NLCs determined by the XTT reduction assay and on neuronal survival determined by the trypan blue exclusion assay.....	47
5. Change in mitochondrial function, as measured by the XTT reduction assay, in 7-day-old cultured neurons treated with various concentrations of $A\beta_{1-42}$	52
6. Neurotoxicity in 7-day-old cultured neurons treated with various concentrations of $A\beta_{1-42}$, as measured by the trypan blue exclusion assay.....	53
7. Neurotoxicity in 7-day-old cultured neurons treated with various concentrations of $A\beta_{1-42}$, as measured by the LDH release assay into the supernatant.....	54
8. Concentration dependent $A\beta_{1-42}$ -induced neuronal damage.....	55
9. Evaluation of attenuation potential of VPA compared with VPU against $A\beta_{1-42}$ -induced toxicity in cultured neuronal-like cells (NLCs).....	56-57

10. Concentration dependent manner of VPA and VPU on the protection of neurotoxicity-induced by 5 μM of $\text{A}\beta_{1-42}$58
11. Photomicrographs showing $\text{A}\beta_{1-42}$ (5 μM)-induced neurotoxicity and neuroprotective effects of VPA and VPU.....59
12. Neuroprotective effect of VPA compared with VPU against $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced toxicity in cultured neuron-like cells in the pretreatment experiments.....62-63
13. Phase-contrast microscopy showing effect of VPA and VPU on the survival promotion in neuron-like cell cultures in the pretreatment experiments.....64-65
14. The post-treatment effect of VPA compared with VPU against $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced toxicity in cultured neuronal-like cells.....67-68
15. Photomicrographs showing the post-treatment effect of VPA or VPU on $\text{A}\beta_{1-42}$ (5 μM)-induced neurotoxicity.....69