

ความเป็นพิษของไซเตียมอานีในดีในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Balb/c 3T3):
ผลต่อการส่งสัญญาณในเซลล์และโครงร่างเซลล์ชนิดเอกติน

เรืออากาศโท อธิยุทธ สุระมานะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ หลักสูตรเภสัชศาสตร์ชีวภาพ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546
ISBN 974-171-935-3
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**THE TOXICITY OF SODIUM ARSENITE ON FIBROBLAST (BALB/C 3T3):
EFFECT ON SIGNAL TRANSDUCTION AND ACTIN CYTOSKELETON**

FLIGHT OFFICER TEERAYUT SURAMANA

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biopharmaceutical Sciences**

Program of Biopharmaceutical Sciences

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-171-935-3


Thesis Title The Toxicity of Sodium Arsenite on Fibroblast (Balb/c 3T3) :
Effect on Signal Transduction and Actin Cytoskeleton
By Flight Officer Teerayut Suramana
Field of Study Biopharmaceutical Sciences
Thesis Advisor Associate Professor Palarp Sinhaseni, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor John M. Murray, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree


..... Dean of Faculty of
Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tuntisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Palarp Sinhaseni, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor John M. Murray, M.D., Ph.D.)

..... Member

(Ratana Sindhuphak, Ph.D.)

..... Member

(Professor Maitree Suttajit, Ph.D.)

เรืออากาศโท ธีรยุทธ สุระมานะ : ความเป็นพิษของโซเดียมอาซีนิต์ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Balb/c 3T3): ผลต่อการส่งสัญญาณในเซลล์และโครงร่างเซลล์ชนิดแอกติน. (THE TOXICITY OF SODIUM ARSENITE ON FIBROBLAST (BALB/C 3T3): EFFECT ON SIGNAL TRANSDUCTION AND ACTIN CYTOSKELETON) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พาลาก สิงห์เสนี, อ.ที่ปรึกษาร่วม: Assoc. Prof. Dr. John M. Murray 160 หน้า. ISBN 974-17-1935-3

การปนเปื้อนของสารหนูในน้ำดื่มก่อให้เกิดปัญหาในหลายประเทศ ซึ่งรวมถึงในประเทศไทยด้วย มีการศึกษาทางระบาดวิทยา รายงานถึงปัญหาของสารหนูในรูปอนินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มก่อให้เกิดมะเร็งที่ผิวหนังและมะเร็งที่อวัยวะต่างๆ และยังเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าความเป็นพิษของอาซีนิต์ (As^{3+}) ต่อเซลล์ เกิดจากการที่อาซีนิต์ไปทำปฏิกิริยากับ dihydroliopoly moiety ของ pyruvate dehydrogenase ซึ่งนำไปสู่การยับยั้ง carbohydrate metabolism ใน citric acid cycle และการพ่วงของ acetyl coenzyme A ดังนั้นจึงไปลด oxygen consumption และรบกวนการสร้าง ATP ภายในเซลล์ และเป็นที่ยอมรับกันว่าในกระบวนการส่งสัญญาณกระตุ้น receptor tyrosine kinase (RTK) นำไปสู่การกระตุ้น mitogen-activated protein (MAP) kinase ซึ่งการกระตุ้น MAP kinase phosphorylation และกระตุ้น transcription นำไปสู่การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์

ผู้วิจัยทำการศึกษากลไกการเกิดพิษและสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนโครงร่างแอกติน โดยใช้สารยับยั้ง tyrosine kinase (genistein), สารยับยั้ง epidermal growth factor receptor (EGFR) (4,5-dianilinophthalimide), สารยับยั้ง phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (wortmannin), สารยับยั้งการสร้าง RNA (actinomycin D), สารยับยั้งการสร้างโปรตีน (cycloheximide)

ผู้วิจัยศึกษาโปรตีนโครงร่างเซลล์แอกตินและวินคูลินในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูถีบจักร (Balb/c 3T3) โดยใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ไมโครสโคปี ร่วมกับ คอลโฟคอล ไมโครสโคปี พบว่าเมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับอาซีนิต์ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แสดงลักษณะ lamellipodia แสดงว่ามีกิจกรรมกระตุ้นผ่าน Rac โปรตีน แต่เมื่อเซลล์ที่ได้รับอาซีนิต์ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีกิจกรรมสูญเสียของแอกตินฟิลาเมนต์และวินคูลิน และเซลล์เปลี่ยนเป็นรูปร่างกลม

นอกจากนี้ในการศึกษาใช้วิธี immunoblot เพื่อศึกษาการแสดงออกของ MAP kinase โดยเฉพาะ SAPK/JNK และ p38 MAP kinase ซึ่งชักนำให้เกิดได้โดยอาซีนิต์ พบว่าสารยับยั้งเหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK, p38 MAP kinase, phospho-p38 MAP kinase เมื่อถูกชักนำให้เกิดโดยอาซีนิต์ แสดงว่า downstream ของ Rac และ Cdc42 ไม่ได้มีบทบาทสำคัญในการเกิดพิษต่อโปรตีนโครงร่างแอกตินที่ถูกชักนำโดยอาซีนิต์

เนื่องจากมีผู้รายงานการยับยั้งที่ Rho kinase เกี่ยวข้องกับการเสีย cytoplasmic tension และแสดงออกโดยการสูญเสียของโปรตีนโครงร่างแอกตินและวินคูลิน ผู้วิจัยเสนอว่าการออกฤทธิ์ของสารหนูผ่านทางกลไกที่เกี่ยวข้องกับ Rho kinase โดยผ่านทาง การเกิด tyrosine phosphorylation ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ EGFR และ Src

ผู้วิจัยได้นำ apigenin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavone เพื่อศึกษาการต้านพิษของอาซีนิต์ โดยหนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ (n=6 ต่อกลุ่ม) ได้รับอาซีนิต์ในขนาด 2.5-10 mg/kg ทางปาก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการวัดระดับของ interleukin-6 (IL-6) ในเลือด พบว่ามีการลดลงของ IL-6 แบบที่มีการตอบสนองของสัมพันธ์กับขนาด แต่เมื่อให้ apigenin ในขนาด 30 mg/kg ก่อนทางปาก เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงให้อาซีนิต์ในขนาด 10 mg/kg ทางปาก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า apigenin สามารถต้านการลดลงของ IL-6 ที่ชักนำให้เกิดด้วยอาซีนิต์แบบมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value <0.05)

ภาควิชา เภสัชวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี
สาขา เภสัชศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....*ธีรยุทธ สุระมานะ*.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*John M. Murray*.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*John M. Murray*.....

4276954633 : MAJOR BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORD: SODIUM ARSENITE/ ACTIN CYTOSKELETON/ TYROSINE KINASE/ RHO GTPASES

TEERAYUT SURAMANA : THESIS TITLE. (THE TOXICITY OF SODIUM ARSENITE ON FIBROBLAST (BALB/C 3T3): EFFECT ON SIGNAL TRANSDUCTION AND ACTIN CYTOSKELETON) THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PALARP SINHASANI. Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. JOHN M. MURRAY, M.D., Ph.D., 160 pp. ISBN 974-17-1935-3

Contamination of drinking water with arsenic has created health problems in a number of countries including Thailand. Many epidemiological studies have indicated a causal relationship between exposure to inorganic arsenic via drinking water and not only skin cancer but also internal cancer. The cytotoxicity-induced by arsenite was thought to be based on its reaction with the dihydrolipoyl moiety of pyruvate dehydrogenase leading to the inhibition of carbohydrate metabolism in the citric acid cycle, acetyl coenzyme A depletion, and thereby reduced oxygen consumption and ATP formation. It is recognized that receptor tyrosine kinase (RTK) activation can lead to mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and then MAP kinase phosphorylation as well as transcription that causes cell growth and proliferation.

The mechanisms of toxicity and cell signaling related to the actin cytoskeleton disruption induced by arsenite were studied. We used tyrosine kinase inhibitor (genistein), epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor (4,5-dianilophthalimide), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor (wortmannin), RNA synthesis inhibitor (actinomycin D), protein synthesis inhibitor (cycloheximide),

The effects of arsenite on the actin cytoskeleton and vinculin in mouse fibroblasts (Balb/c 3T3) were studied by immunofluorescence microscopy and confocal microscopy. Lamellipodia were formed (Rac activation) when fibroblasts were exposed to arsenite at 5 μ M for 16 hours. At 25 μ M arsenite caused a severe loss of filamentous actin (F-actin) and vinculin and most cells became rounded.

MAP kinase expression especially SAPK/JNK and p38 MAP kinase which can be induced by arsenite were studied by immunoblotting assay. The inhibitors listed above can not block the expression of SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK, p38 MAP kinase and phospho-p38 MAP kinase induced by arsenite. We concluded that the downstream effectors of Rac and Cdc42 did not play an important role in actin cytoskeleton disruption induced by arsenite.

The inhibition of Rho kinase is related to loss of cytoplasmic tension and loss of stress fibers and focal adhesions were reported. We suggest that arsenite acts through mechanisms that involve Rho kinase via the tyrosine phosphorylation related to the EGFR and Src.

For the study of flavone apigenin as an antidote for arsenite, male Wistar rats (n=6/group) were exposed to arsenite at 2.5-10 mg/kg by oral for 24 hours. Arsenite decreased the plasma interleukin-6 (IL-6) level in a dose-dependent manner. But when the rats were pretreated with the apigenin at 30 mg/kg by oral for 1 hour and then treated with the arsenite at 10 mg/kg by oral for 24 hours, this toxic effect was completely blocked by apigenin (p value < 0.05).

Department Pharmacology, Physiology and Biochemistry
Field of Study Biopharmaceutical Sciences
Academic year 2003

Student's signature... *Teerayut Suramana*
Advisor's signature... *Palarp Sinhasani*
Co-advisor's signature... *John M. Murray*

ACKNOWLEDGEMENTS

This dissertation could not have been completed without funding from The Thailand Research Fund (TRF) and also his support for my research presentation.

First and foremost I would like to deeply thank my dear advisor, Associate Professor Dr. Palarp Sinhaseni, for her enthusiastic support, and encouragement in the development of this work during my years at Chulalongkorn University, and for providing me with an independent environment in which to cultivate and sharpen my scientific skills. She also gives me invaluable encouragement and inspires me to be a good toxicologist with her witty guidance, total support, and avid motivation. I am extremely thankful for her endless effort to provide invaluable guidance and inspired ideas.

I would like to deeply thank my dear co-advisor, Associate Professor Dr. John M. Murray, in the Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA. for providing me with wonderful facilities in his laboratory, and for his kindness, great help and good advice during my stay in USA. This dissertation would not be successful without the kindness, guidance and assistance from him.

I am deeply grateful to Dr. Ke Hu and Dr. Margaret M. Chou in the Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania School of Medicine. My work could not be completed without their great help and good advice.

I would like to acknowledge the contributions of the members of my committee: Associate Professor Dr. Sunanta Pongsamart, Dr. Ratana Sindhuphak, and Professor Dr. Maitree Suttjit. Their advice, criticism, and support are very helpful and greatly appreciated.

I wish to thank the Institute of Health Research, Chulalongkorn University especially Professor Dr. Nikorn Dusitsin and Professor Dr. Peerasak Chantarapateep for his kindness and support, and for providing me great facilities in the Institute.

I would like to express my thanks to the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, especially the Department of Pharmacology and staff, for providing me good facilities.

I would like to acknowledge the help of my lovely colleagues at the Faculty of Pharmaceutical Sciences and The Institute of Health Research, Chulalongkorn University: Dr. Tipicha Posayanonda, Ms. Nopparat Nuntharatanapong, Ms. Sasithorn Chamthaworn, Mr. Veerachai Taechakitiroj, and Miss Sutharuthai Chernkwuanma, who always stayed with me and help me in the laboratory. I am also grateful to them for their useful advice. I would like to thank my friends and all staffs in the Institute of Health Research, Chulalongkorn University, for their generous support and friendship.

Finally, I would like to dedicate this dissertation to my loving father, Mr. Fuke Suramana and my loving mother, Ms. Renu Suramana. Their love, understanding, guidance, encouragement, and support from the very beginning allow me to complete my Ph.D.

Teerayut Suramana

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
Problem Statement	1
Objectives	3
Hypothesis	3
Contributions of the Study	3
II LITERATURE REVIEW	4
Cytoskeleton	4
Microfilaments	6
Actin Cytoskeleton	8
Rho GTPases	12
Activation of Rho	13
Rho-Induced Actin Reorganization	16
Activation of Rac and Cdc42	19
Rac and Cdc42 Effectors Implicated in Actin Reorganization	22
Biological Roles of Rho GTPases	25
Arsenic	26
Effects of Arsenic on Human Health	26
Sodium Arsenite and Toxicity	28
Mechanism of Arsenite in Relation to Cell Signaling	35

	Page
III MATERIALS AND METHODS	39
Animals	39
Cells	39
Chemicals and Reagents	39
Equipment	40
<i>In Vitro Assays</i>	40
<i>In Vivo Assays</i>	48
Data Analysis	48
IV RESULTS	50
V DISCUSSION	79
REFERENCES	86
APPENDICES	112
APPENDIX A	113
APPENDIX B	115
APPENDIX C	118
APPENDIX D	130
APPENDIX E	133
VITAE	160

LIST OF TABLES

	Page
Table 1	Acute LD₅₀ of sodium arsenite.....28
Table 2	Cell area of mouse fibroblasts stained with anti-F-actin..... 66
Table 3	Cell area of mouse fibroblasts stained with anti-vinculin.....67
Table 4	Cell area of mouse fibroblasts stained with anti-mitochondrial HSP70.....68
Table 5	Cell fluorescence intensity of mouse fibroblasts stained with anti-F-actin.....69
Table 6	Cell fluorescence intensity of mouse fibroblasts stained with anti-vinculin.....70
Table 7	Cell fluorescence intensity of mouse fibroblasts stained with anti-mitochondrial HSP70.....71
Table 8	The plasma IL-6 levels in sodium arsenite-exposed rats.....77

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Actin microfilaments.....	7
Figure 2	Treadmilling in actin microfilaments.....	8
Figure 3	Signal pathways that lead to the assembly of the stress fibers of a focal adhesion.....	12
Figure 4	The dramatic effects of Rac, Rho, and Cdc42 on actin organization in fibroblasts.....	25
Figure 5	Actin cytoskeleton of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	50
Figure 6	Microtubule of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	51
Figure 7	Vinculin of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	52
Figure 8	α-Actinin of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	53
Figure 9	Mitochondrial localization of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	54
Figure 10	Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and genistein.....	55
Figure 11	Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and staurosporine.....	56
Figure 12	Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and 4,5-dianilinophthalimide.....	57
Figure 13	Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and wortmannin.....	58
Figure 14	Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and actinomycin D.....	59
Figure 15	Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and cycloheximide.....	60

LIST OF FIGURES (Continued)

	Page
Figure 16 Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite and apigenin.....	61
Figure 17 Mouse fibroblasts were exposed to sodium arsenite (<i>In situ</i> cell death detection kit, fluorescein).....	62
Figure 18 Actin cytoskeleton of HeLa cells exposed to sodium arsenite.....	63
Figure 19 Vinculin of HeLa cells exposed to sodium arsenite.....	64
Figure 20 Mitochondrial localization of HeLa cells exposed to sodium arsenite.....	65
Figure 21 SAPK/JNK expression of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	72
Figure 22 Phospho-SAPK/JNK expression of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	73
Figure 23 p38 MAP kinase expression of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	74
Figure 24 Phospho-p38 MAP kinase expression of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	75
Figure 25 PAK expression of mouse fibroblasts exposed to sodium arsenite.....	76
Figure 26 The plasma IL-6 levels in sodium arsenite-exposed rats.....	78