ผลของกรดปาล์มิติกต่อการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ และการตายของเซลล์ประสาทนิวโรบลาสโตมา

Effects of Palmitic Acid on the Expression of Alzheimer's-Related Proteins and Cell Death in Human Neuroblastoma Cell Lines

พรรษา พิทธยะพงษ์ (Phansa Phitthayaphong)* ดร.ศิรินาฏ คำฟู (Dr.Sirinart Kumfu)**
ดร.นิพนธ์ ฉัตรทิพากร (Dr.Nipon Chattipakorn)*** ดร.สิริพร ฉัตรทิพากร (Dr.Siriporn C. Chattipakorn)****

บทคัดย่อ

โรคอัลไซเมอร์ เป็นภาวะสมองเสื่อมที่พบมากที่สุด มีลักษณะเฉพาะ คือ มีการสร้างนิวโรไฟบริลลารีแทงเกิล และแอมีลอยด์พลากในสมอง การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าภาวะอ้วนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ กล่าวคือ การอักเสบของเซลล์ประสาทในสมอง และความบกพร่องของกระบวนการเรียนรู้และจดจำ มีความสัมพันธ์กับภาวะอ้วนจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง ซึ่งเป็นผลเกี่ยวเนื่องกับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิ่มตัวเช่น กรดปาล์มิติกในเซลล์ประสาท แต่อย่างไรก็ตามผลของกรดปาล์มิติกต่อการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ และการตายของเซลล์ประสาทยังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้จึงได้นำเซลล์ประสาท SH-SY5Y มาเลี้ยงในกรดปาล์มิติกที่ความเข้มข้น 400 และ 800 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการอยู่รอดของเซลล์และการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ เราพบว่ากรดปาล์มิติกทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ ประกอบด้วย แอมีลอยด์ บีตา, โปรตีนต้นกำเนิดแอมีลอย (เอพีพี) และฟอสโฟรีเลททา จึงสรุปได้ว่าการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง สามารถเพิ่มโอกาสในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยทำให้มีการตายของเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้น และพบพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ที่มากขึ้นด้วย

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease. One of the hallmarks of AD compose of neurofibrillary tangles and amyloid plaques. Obesity has been implicated in AD. Evidence found that neuroinflammation and cognitive impairment are associated with high-fat diet (HFD) consumption that involved in high concentration of saturated fatty acids like palmitic acid (PA) in neurons. However, it remains uncertain whether PA-targeted neuronal cells can initiate Alzheimer's-related protein or neuronal cell death. Therefore, neuronal cell model, SH-SY5Y, was used to determine the effect of PA at doses of 400 and 800 µM for 48 hrs on cell viability and Alzheimer's related protein expression. The results showed that PA is able to induce neuronal cell death and Alzheimer's-related proteins production including Amyloid-ß (Aß), Amyloid precursor protein (APP) and phosphorylated tau (P-tau) proteins. These findings suggested that the consumption of HFD is linked to the increased risk of AD leading to developed neuronal cell death and Alzheimer's related pathology.

คำสำคัญ: กรดปาล์มิติก โรคอัลไซเมอร์ นิวโรบลาสโตมา

Keywords: Palmitic acid, Alzheimer's disease, Neuroblastoma

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

**** ศาสตราจารย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

***** ศาสตราจารย์ ภาควิชาประสาทวิทยาศาสตร์-ชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์เป็นภาวะสมองเสื่อมที่พบได้บ่อยที่สุด มีการดำเนินของโรคอย่างช้า ๆ และรักษาไม่หาย ซึ่งอาการของโรคพบว่าผู้ป่วยมีการสูญเสียความสามารถด้านการเรียนรู้ สูญเสียความทรงจำระยะยาว ต่อมาจะสูญเสียการทำงานต่าง ๆ ของร่างกาย และเสียชีวิตในที่สุด ในปีพ.ศ. 2558 พบว่ามีประชากรซึ่งมีภาวะสมองเสื่อมประมาณ 46.8 ล้านคนทั่วโลก และสามารถประมาณการณ์ได้ว่าในปีพ.ศ. 2573 และ 2593 จำนวนประชากรที่มีภาวะสมองเสื่อมอาจสูงถึง 75 และ 131.5 ล้านคนตามลำดับ (Martin et al., 2016) โรคอัลไซเมอร์เกิดจากความผิดปกติของเซลล์สมอง ซึ่งถูกทำลายจากการสะสมของกลุ่มแผ่นหรือพลาก (plaque) ที่เกิดจากการรวมตัวของโปรตีนที่ผิดปกติภายในเซลล์ประสาท และระหว่างเซลล์ประสาท โดยการสะสมภายในเซลล์ประสาทนั้นจะพบการสะสมของนิวโรไฟบริลลารีแทงเกิล (neurofibrillary tangles) ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของโปรตีนเทา (Tau) ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (hyperphosphorylated tau) และเป็นผลทำให้ไมโครทิวบูลสลายตัว เกิดการทำลายระบบการขนส่งสารภายในเซลล์ประสาท (Iqbal et al., 2005) และเกิดความผิดปกติในการสื่อสารทางชีวเคมีระหว่างเซลล์ เซลล์จึงตายในเวลาต่อมา (Chun, Johnson, 2007) ส่วนการสะสมของพลากระหว่างเซลล์ประสาท เกิดจากการสะสมของแอมีลอยด์ บีตา (amyloid ß) ชนิดไม่ละลายน้ำ จนเกิดลักษณะเป็นคราบในสมองเรียกว่า แอมีลอยด์ พลาก (amyloid plaques) (Lee et al., 2001) โดยแอมีลอยด์ บีตาเป็นชิ้นส่วนหนึ่งของโปรตีนต้นกำเนิดแอมีลอย (Amyloid precursor protein: APP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท ซึ่งการสร้างและการสะสมของแอมีลอยด์ บีตา และนิวโรไฟบริลลารีแทงเกิลที่มากเกินไป เป็นปัจจัยเริ่มต้นของการเกิดโรคอัลไซเมอร์

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การบริโภคอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลานาน เป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดโรคอ้วนในประชากรทั่วโลก และเป็นผลให้เกิดความบกพร่องของความสามารถด้านการเรียนรู้และจดจำ ยิ่งไปกว่านั้น โรคอ้วนยังสามารถทำให้สมองเกิดการพัฒนาที่ผิดปกติ ซึ่งมีลักษณะทางสรีรวิทยาคล้ายกับสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Granholm et al., 2008) โดยพบว่า การรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวมากจนเกินไป เมื่อผ่านระบบย่อยอาหารจะทำให้ได้ผลผลิตของกรดไขมัน โดยกรดปาล์มิติกเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่พบเป็นอัตราส่วนมากที่สุด และสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษจากโมเลกุลไขมัน (lipotoxicity) (Plötz et al., 2016) เป็นเหตุให้เกิดภาวะเครียดของเอนโดพลาสมิค เรติคูลัม (endoplasmic reticulum stress) รวมถึงมีความบกพร่องของการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ จนทำให้เซลล์ประสาทและเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ประสาทเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสขึ้น (Park et al., 2011; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามกลไกการตายของเซลล์ประสาทที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นโดยอาหารไขมันสูงยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นในการศึกษานี้มีความต้องการจะศึกษาถึงผลของการได้รับกรดไขมันปาล์มิติกความเข้มข้นสูง ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท และการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ รวมถึงความสัมพันธ์ของการดำเนินโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของเซลล์ประสาท และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของภาวะไขมันสูงต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ แอมีลอยด์ บีตา, เอพีพี และฟอสโฟรีเลทเทา และความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของเซลล์รวมไปถึงการตายของเซลล์ประสาท

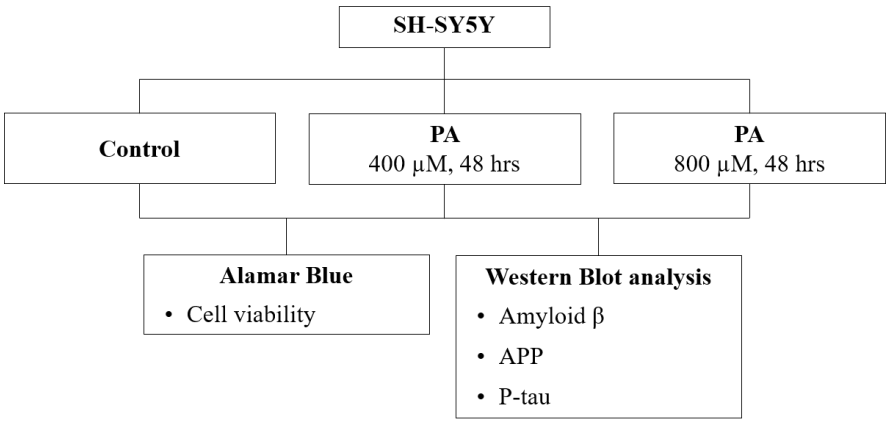
วิธีการวิจัย

แผนการทดลอง

แบ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัวอย่างทดลอง ดังแสดงแผนการทดลองในรูปที่ 1

1) Control = เซลล์ SH-SY5Y เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ
2) PA 400 μM = เซลล์ SH-SY5Y เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกรดปาล์มิติก ความเข้มข้น 400 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3) PA 800 μM = เซลล์ SH-SY5Y เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกรดปาล์มิติก ความเข้มข้น 800 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หลังจากนั้นเซลล์ในทุกกลุ่มการทดลองจะถูกนำมาวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้ Alamar Blue Assay และวัดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ประกอบด้วย แอมีลอยด์ บีตา, เอพีพี, ฟอสโฟรีเลทเทา โดยวิธี Western Blot analysis



รูปที่ 1 แสดงแผนการทดลองของการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์สายพันธุ์ SH-SY5Y ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของเนื้อเยื่อประสาท ที่นิยมใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาการทำงานและการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมถึงศึกษาการเกิดโรคการเสื่อมของระบบประสาท ในรูปแบบ *in vitro* หรือการทดลองภายนอกร่างกาย โดยนำเซลล์ SH-SY5Y มาจาก American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) ซึ่งมี Ham's F12 และ กลูตาแมกซ์ (1:1; v/v) และนำไปผสมกับ 10% ของซีรั่มที่ได้จากตัวอ่อนวัว (fetal bovine serum: FBS), โซเดียมไบคาร์บอเนต และ 1% ของเพนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน หลังจากนั้นเซลล์จะถูกนำไปเลี้ยงในตู้บ่ม (incubator) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส (°C) และมีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% โดยจะต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน

การเตรียมกรดปาล์มิติก

เตรียมสารละลายกรดปาล์มิติกจากบริษัท Sigma-Aldrich (Dorset, UK) ให้เป็นสารละลายความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ (mM) โดยชั่งกรดปาล์มิติก 10.26 mg ละลายใน 1 ml ของ 0.01 โมลาร์ (M) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในน้ำปราศจากไอออน และนำไปทำให้ละลายโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (dry block) ที่อุณหภูมิ 80 °C จากนั้นเตรียมสารละลาย 1%(w/v) BSA ชนิดปราศจากกรดไขมัน ใน DMEM ที่ถูกกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดของรูกรอง 0.2 ไมครอน โดยละลายที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำกรดปาล์มิติกที่เตรียมไว้ผสมกับ 1%(w/v) BSA ชนิดปราศจากกรดไขมันที่ละลายใน DMEM ให้มีความเข้มข้นของกรดปาล์มิติกที่ 16 mM และ 32 mM จากนั้นนำสารละลายผสมมาอุ่นที่ 37 °C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดการยึดเกาะกันระหว่างกรดปาล์มิติกกับ BSA โดยสารละลายผสมสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ -20 °C และจะต้องนำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการทดสอบ

การวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้ AlamarBlue Assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y ลงบนถาดเลี้ยงเซลล์ที่มี 96 หลุม โดยใช้ปริมาณเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยง DMEM แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน incubator ภายใต้สภาวะที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เซลล์เกาะถาดเลี้ยง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งทั้งหมด แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ และใส่กรดปาล์มิติกความเข้มข้น 16 mM และ 32 mM ด้วยอัตราส่วนกรดปาล์มิติกต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1:40 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดปาล์มิติก 400 μM และ 800 μM ในกลุ่มทดสอบ PA 400 μM และ PA 800 μM ตามลำดับ ในการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ทำได้โดยใส่น้ำยา alamarBlue โดยตรงในแต่ละหลุมทดสอบ แล้วนำมาเลี้ยงใน incubator เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง เมื่อน้ำยาเข้าไปในเซลล์ เซลล์ที่ยังมีชีวิตจะมีคุณสมบัติซึ่งสามารถเปลี่ยนสาร resazurin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำยา จากสีฟ้าและไม่สามารถเรืองแสงได้ ให้เป็นสาร resorufin ที่มีสีชมพูและสามารถเรืองแสงได้ จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นที่เวลา 4, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธีการวัดความเข้มของแสง โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ใช้ความยาวคลื่นแสงกระตุ้นที่ 530 นาโนเมตร และวัดปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนเข้าไปโดยใช้ความยาวคลื่นแสง 590 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาอัตราการอยู่รอดของเซลล์โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่ม control ในแต่ละช่วงเวลาเป็นค่าของปริมาณเซลล์เริ่มต้น 100% จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ทดสอบด้วยกรดปาล์มิติก 400 และ 800 μM มาเทียบดังสมการดังนี้

$$\%\text{การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มทดสอบด้วยกรดปาล์มิติกแต่ละช่วงเวลา}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่ม } Control \text{ ณ ช่วงเวลาเดียวกัน}} \times 100$$

การวัดการแสดงออกของโปรตีนโดยเทคนิค Western Blot

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y ลงบนถาดเลี้ยงเชื้อชนิด 6 หลุม ซึ่งมีปริมาณเซลล์ 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยง DMEM แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน incubator ภายใต้สภาวะที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เซลล์เกาะถาดเลี้ยง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งทั้งหมด แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ และใส่กรดปาล์มิติก ความเข้มข้น 16 mM และ 32 mM ด้วยอัตราส่วนกรดปาล์มิติกต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1:40 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดปาล์มิติก 400 μM และ 800 μM ในกลุ่มทดสอบ PA 400 μM และ PA 800 μM ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกนำมาทำให้แตกโดยใช้สารละลายไรปาบัฟเฟอร์ (RIPA buffer) ผสมกับตัวยับยั้งโปรตีเอส (protease inhibitor) เพื่อสกัดโปรตีนภายในเซลล์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปแยกตามขนาดโมเลกุล โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) แล้วย้ายโปรตีนบนเจลไปสู่แผ่น

ไนโตรเซลลูโลส หลังจากนั้นจะถูกนำไปยับยั้งโปรตีนที่ไม่จำเพาะโดยนำไปแช่ใน 5%(w/v) BSA หรือ นมปราศจากไขมันที่ละลายในสารละลาย TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) และมีค่าพีเอชที่ 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทสารละลาย 5%(w/v) BSA หรือ นมปราศจากไขมันทิ้ง แล้วนำไปตรวจวัดโปรตีนที่สนใจโดยการแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนติบอดีตัวที่หนึ่งซึ่งจำเพาะกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ประกอบด้วยแอมีลอยด์ บีตา, เอพีพี, ฟอสโฟรีเลทเทา และแอนติบอดีต่อโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ (housekeeping gene) ในการศึกษานี้จะใช้ GAPDH โดยนำแอนติบอดีมาผสมใน 5%(w/v) BSA หรือ นมปราศจากไขมัน ด้วยอัตราส่วนแอนติบอดีต่อ 5%(w/v) BSA หรือ นมปราศจากไขมัน 1:1000 แล้วให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายใต้อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C ระยะเวลา 1 คืน จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วยสารละลาย TBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 5 ครั้ง แล้วใส่แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดกับเอนไซม์ฮอร์สแรดิช เพอร์ออกซิเดส ผสมกับ 5%(w/v) BSA หรือ นมปราศจากไขมันด้วยอัตราส่วน 1:2000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ไปจับจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก เมื่อครบเวลานำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วยสารละลาย TBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ในสารละลาย Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories Ltd., City) เพื่อให้สารทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ฮอร์สแรดิช เพอร์ออกซิเดส จึงจะมีการเรืองแสงของแถบโปรตีนที่สนใจ แล้วนำแผ่นไนโตรเซลลูเลสไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System จะทำให้ได้รูปภาพชนิด .scn แล้วนำไปแปลงไฟล์ด้วยโปรแกรม Image lab ให้ได้รูปภาพชนิด .tiff ความละเอียด 600 dpi จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J

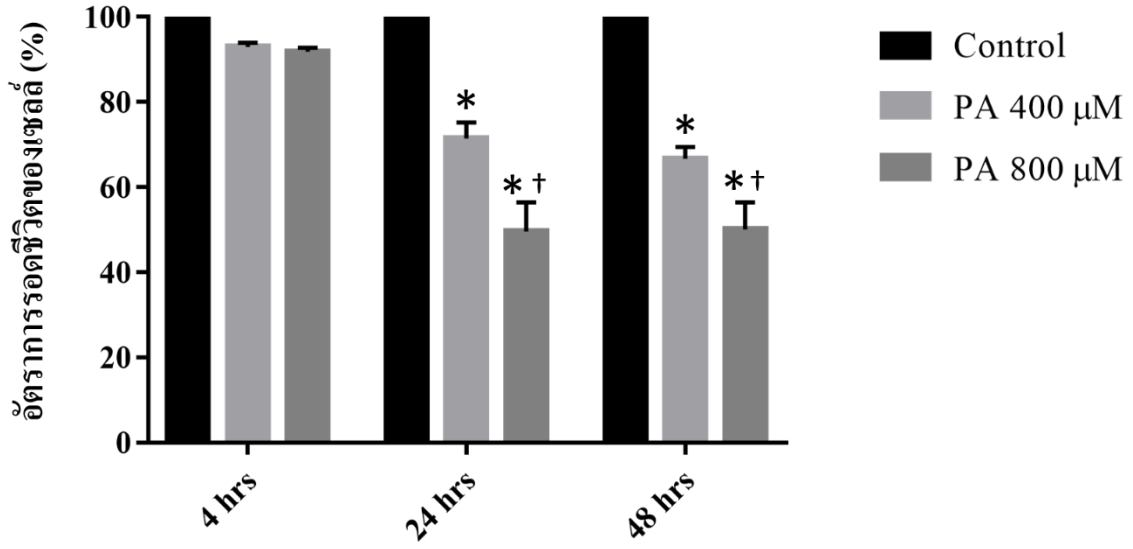
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำเสนอข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน โดยเปรียบเทียบข้อมูลแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism

ผลการวิจัย

ผลความเป็นพิษของกรดปาล์มิติก ต่อเซลล์ประสาท

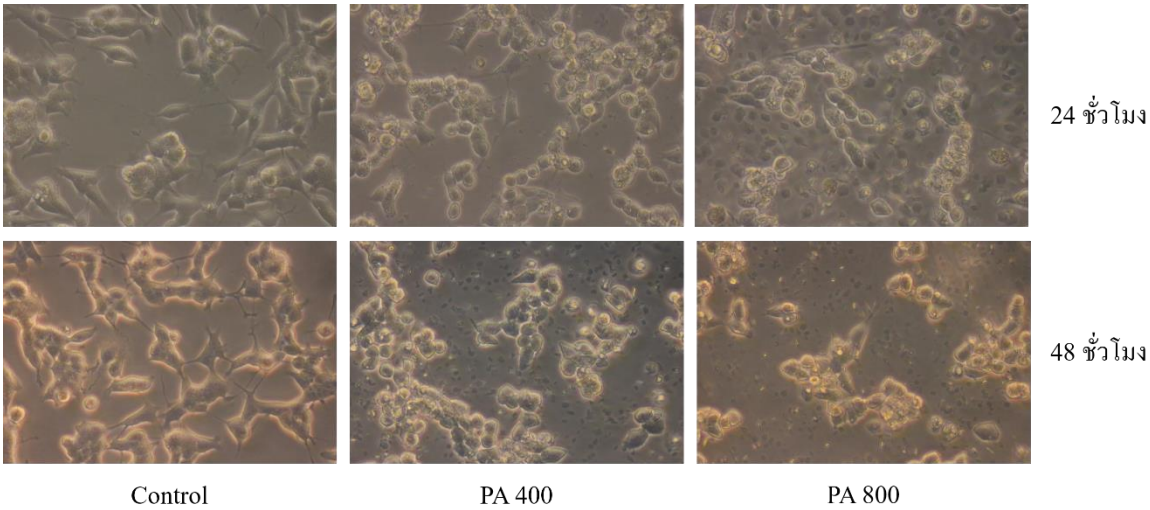
จากการทดสอบโดยใช้ Alamar Blue assay พบว่าเมื่อเซลล์ประสาท SH-SY5Y ได้รับกรดปาล์มิติกที่ความเข้มข้น 400 และ 800 μM มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับกรดปาล์มิติก เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของกรดปาล์มิติก แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตระหว่างการทดสอบที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ดังนั้นผลการทดสอบจึงชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดปาล์มิติก ที่ 400 และ 800 μM ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ SH-SY5Y และทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ภายหลังได้รับสารละลายผสมของกรดปาล์มิติก เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 2 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y จากผลของการให้กรดปาล์มิติก ด้วยความเข้มข้น 400 และ 800 µM เป็นเวลา 4, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยแต่ละความเข้มข้นต่อกลุ่มประกอบด้วย 4 ตัวอย่างทดลอง (n=4/group) ผลการทดลองแสดงค่า ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard Error of measurement: SEM)

หมายเหตุ * = significant เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ในแต่ละช่วงเวลา (P<0.0001)

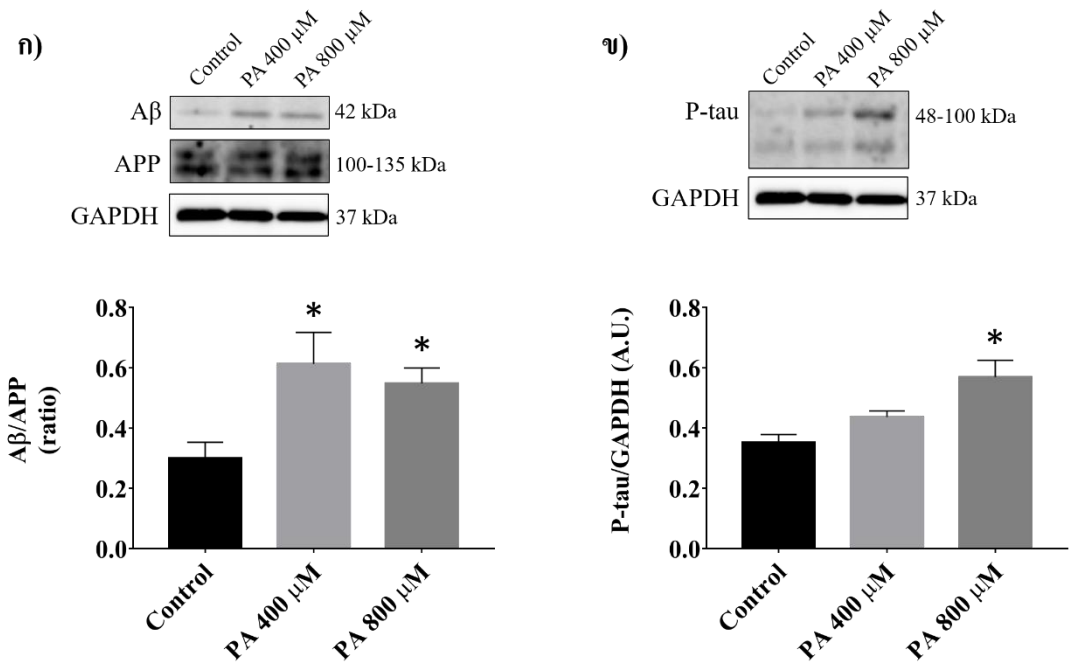
† = significant เมื่อเทียบกับกลุ่ม PA 400 ในแต่ละช่วงเวลา (P<0.0045)



รูปที่ 3 แสดงภาพเซลล์ SH-SY5Y กลุ่ม control และกลุ่มที่ได้รับกรดปาล์มิติกที่ความเข้มข้น 400 และ 800 µM โดยถ่ายภาพที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทรัส กำลังขยาย 40x

ผลของกรดปาล์มิติกต่อการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

จากผลการทดลองด้วยวิธี Western Blot เพื่อศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ แอมีลอยด์ บีตา, เอพีพี และฟอสโฟรีเลทเทา ภายหลังจากการให้กรดปาล์มิติก ความเข้มข้น 400 และ 800 μM แก่เซลล์ SH-SY5Y (รูปที่ 4) พบว่าสัดส่วนของโปรตีนแอมีลอยด์ บีตา ต่อโปรตีนเอพีพีของกลุ่มที่ได้รับกรดปาล์มิติก ความเข้มข้น 400 และ 800 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นแบบมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ดังแสดงในรูป 4ก อีกทั้งยังพบว่าเมื่อเซลล์ SH-SY5Y ได้รับกรดปาล์มิติก ความเข้มข้น 800 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีระดับโปรตีน ฟอสโฟรีเลทเทาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับกรดปาล์มิติก ที่ความเข้มข้น 400 μM เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ดังแสดงในรูป 4ข ทั้งนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่ 400 และ 800 μM ของกรดปาล์มิติก มีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีนแอมีลอยด์ บีตา ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแอมีลอยด์ พลาก อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูง 800 μM ของกรดปาล์มิติก มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของทั้งโปรตีนแอมีลอยด์ บีตา และ โปรตีนเทา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของกรดปาล์มิติกที่สูงจะส่งผลทำให้มีความรุนแรงของโปรตีนที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ที่มากกว่าความเข้มข้นต่ำ โดยแสดงออกในรูปของการเกิด tau hyperphosphorylation เพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 4 แสดงผลของการให้กรดปาล์มิติก ด้วยความเข้มข้น 400 และ 800 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ ประกอบด้วยโปรตีน แอมีลอยด์ บีตา, เอพีพี, ฟอสโฟรีเลทเทา และ GAPDH ดังแสดงแถบโปรตีนจากการทดลองด้วยวิธี Western Blot ดังนี้ (ก) แสดงแถบโปรตีนและสัดส่วนของโปรตีนแอมีลอยด์ บีตา, เอพีพี, และ GAPDH (ข) แสดงแถบโปรตีนและสัดส่วนของโปรตีนฟอสโฟรีเลทเทา และ GAPDH โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วย 4 ตัวอย่างทดลอง ผลการทดลองแสดงค่า ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard Error of measurement: SEM)

หมายเหตุ * = significant เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ($P<0.05$)

อภิปรายผลการวิจัย

อาหารไขมันสูงจำพวกที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว เป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถทำให้เกิดผลร้ายแรง จนทำให้เกิดโรคต่างๆ ที่สัมพันธ์กับความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญอาหารเมแทบอลิกซินโดรม (Metabolic Syndrome) จากการศึกษาย้อนกลับไปเมื่อ 20 ปีก่อน พบว่า โรคอ้วนที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงยังส่งผลกระทบต่อสมองอีกด้วย โดยมีผลทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์ประสาทและมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ microglia ในสมอง (Dorfman, Thaler, 2015) นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น โรคการเสื่อมของระบบประสาท เป็นต้น (Guillemot-Legris, Muccioli, 2017) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในมนุษย์ที่ประสบปัญหาภาวะของโรคอ้วนและภาวะเมแทบอลิกซินโดรม (Metabolic Syndrome) ถึงการได้รับกรดไขมันที่มากเกินและส่งผลให้เกิดการสะสมภายในสมอง (Karmi et al., 2010) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากรดไขมันอิ่มตัวสามารถผ่านตัวกรองกั้นระหว่างเลือดและสมอง หรือเรียกว่า blood brain barrier ได้ จนทำให้เกิดการสะสมกรดไขมันโดยเซลล์ของสมอง และการศึกษาก่อนหน้ายังพบว่าสัดส่วนของกรดไขมันในสมองซึ่งวัดจากน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง แปลตามปริมาณกรดไขมันในกระแสเลือด (Guest et al., 2013) และยังพบว่ากรดไขมันสายยาวชนิดปาล์มิติก เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุด และสามารถทำให้เกิดโรคทางสมอง โดยเฉพาะในระดับที่เพิ่มขึ้นสูงในตำแหน่งสมองส่วนข้าง หรือ parietal cortex ซึ่งพบลักษณะนี้ได้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Fraser et al., 2010) นำมาซึ่งการศึกษาถึงผลของการได้รับกรดปาล์มิติกในความเข้มข้นสูง ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาท โดยการทดลองนี้ได้เลือกความเข้มข้นของกรดปาล์มิติกจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Hsiao et al., 2014) ซึ่งพบว่าการให้กรดปาล์มิติกที่ความเข้มข้น 200-500 μM ต่อเซลล์ SH-SY5Y เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จะทำให้มีการตายของเซลล์ SH-SY5Y ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้กรดปาล์มิติกที่ความเข้มข้น 200, 400 และ 800 μM ทั้งนี้ในการศึกษานี้พบว่าเมื่อให้กรดปาล์มิติกความเข้มข้น 200 μM แก่เซลล์ SH-SY5Y ไม่พบการตายของเซลล์ จึงได้นำเสนอผลการทดลองเฉพาะการให้กรดปาล์มิติกที่ความเข้มข้น 400 และ 800 μM โดยความแตกต่างของผลการทดลองที่พบอาจเกิดจากการใช้ตัวทำละลายกรดปาล์มิติกที่แตกต่างกัน ทำให้ได้ผลการทดลองที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มีการตายแปรผันตามความเข้มข้นของกรดปาล์มิติก แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากการมีอัตราการตายอยู่ในระดับสูงสุด คือ เมื่อเซลล์ได้รับกรดปาล์มิติก และเกิดความเป็นพิษจนถึงจุดหนึ่ง ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปแล้ว ความเป็นพิษนั้นไม่เพิ่มขึ้นจนสามารถทำให้เซลล์ตายได้ (Forcina et al., 2017) จึงพบว่าเซลล์ไม่ตายเพิ่มขึ้นเมื่อทำการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง เทียบกับ 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ากรดปาล์มิติกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทสายพันธุ์ SH-SY5Y ซึ่งพบว่ามีระดับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงภายหลังจากการได้รับกรดปาล์มิติกความเข้มข้นสูง นอกจากนี้พบว่ายังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้กรดไขมันอิ่มตัวปาล์มิติก เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนแอมีลอยด์ บีตา ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีนฟอสโฟรีเลทเทา ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำให้ทราบว่าการที่เซลล์ประสาท SH-SY5Y ได้รับกรดปาล์มิติกความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้มีความสัมพันธ์ต่อระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ คือ สัดส่วนโปรตีนแอมีลอยด์ บีตา ต่อโปรตีนเอพีพี ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนฟอสโฟรีเลทเทา เมื่อได้รับกรดปาล์มิติกความเข้มข้นสูง จากผลการศึกษาทั้งหมดจึงกล่าวได้ว่าการตายของเซลล์ประสาทและระดับโปรตีนซึ่งเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ที่เพิ่มขึ้น เป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงเริ่มต้นที่สามารถพัฒนาให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้ป่วยโรคอ้วนได้

สรุปผลการวิจัย

กรดปาล์มิติก สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทสายพันธุ์ SH-SY5Y และทำให้เกิดการตายของเซลล์ โดยสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ คือ โปรตีนแอมีลอยด์ บีตา และโปรตีนเทา ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลทำให้เกิดรอยโรคของสมอง และเป็นลักษณะสำคัญของรอยโรคที่พบในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ทั้งนี้การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลานานสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ประสาทได้ โดยสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งนำไปสู่การเกิดภาวะการอักเสบของเซลล์ประสาท และนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.): MRG6180239 (SK) และ RTA6080003 (SCC), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) (NC) และ Chiang Mai University Center of Excellence Award (NC) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านเงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Chun W, Johnson GV. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. Front Biosci 2007; 12: 733-56.

Dorfman MD, Thaler JP. Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2015; 22: 325-30.

Fraser T, Tayler H, Love S. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. Neurochem Res 2010; 35: 503-13.

Granholm AC, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. J Alzheimers Dis 2008; 14: 133-45.

Guest J, Garg M, Bilgin A, Grant R. Relationship between central and peripheral fatty acids in humans. Lipids Health Dis 2013; 12: 79.

Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. Trends Neurosci 2017; 40: 237-53.

Hsiao YH, Lin CI, Liao H, Chen YH, Lin SH. Palmitic acid-induced neuron cell cycle G2/M arrest and endoplasmic reticular stress through protein palmitoylation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Int J Mol Sci 2014;15(11): 20876-99.

Iqbal K, Del C Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C-X, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2005; 1739: 198-210.

Karmi A, Iozzo P, Viljanen A, Hirvonen J, Fielding BA, Virtanen K, et al. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. Diabetes 2010; 59: 2171-7.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. Annu Rev Neurosci 2001; 24: 1121-59.

Park HR, Kim JY, Park KY, Lee J. Lipotoxicity of palmitic Acid on neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. Toxicol Res 2011; 27: 103-10.

Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016.

Plötz T, Hartmann M, Lenzen S, Elsner M. The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. Nutr Metab 2016; 13: 16.

Wang Z, Liu D, Wang F, Liu S, Zhao S, Ling EA, et al. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-kappaB signalling. Br J Nutr 2012; 107: 229-41.

Wang Z, Liu D, Zhang Q, Wang J, Zhan J, Xian X, et al. Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. J Neurosci Res 2014; 92: 574-86.