

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี โทรสาร: 2554A10862002

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

ภาษาไทย: บทบาทของการสังเคราะห์เอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทใน  
ภาวะที่มีการให้สาร inflammatory cytokines แก่เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7  
hippocampal neuron

ภาษาอังกฤษ: A role of local estrogen production in inflammatory cytokines-  
treated H19-7 hippocampal neuron

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

นางสาวศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

- 6 ส.ค. 2556

๕๐155068

316537

AQ 0094609

แจ้งบริการ

14 ส.ย. 2556

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

อภิรักษ์นันทนาการ

## บทคัดย่อ

### ภาษาไทย

เอสโตรเจนคือสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีการสังเคราะห์มากในต่อมเพศ ก่อนส่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย รวมถึง ระบบประสาท โดยมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท และส่งเสริมกระบวนการเรียนรู้และการสร้างความจำ นอกจากนี้เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศแล้วยังมีการสังเคราะห์เอสโตรเจนขึ้นภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสโดยตรง การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าหากไม่มีเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในฮิปโปแคมปัส เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจะไม่สามารถตอบสนองต่อเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในฮิปโปแคมปัสมีหน้าที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อเอสโตรเจนปริมาณมากในกระแสเลือด งานวิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาบทบาทของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ประสาทต่อการปรับตัวของเซลล์ผ่านการแสดงออกของ estrogen receptor ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ประสาทเพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  เพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  โดยอาศัยการกระตุ้น basal ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในขณะที่ local estrogen ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ ER $\alpha$

### ภาษาอังกฤษ

Estrogen is a steroid hormone that mainly synthesized in the gonad and reaches its target organs via blood circulation. It plays an important role in several body systems including nervous system, such as neuroprotection and memory function. In addition to gonadal estrogen, the localization of endogenous estrogen has been clearly shown in hippocampus. Hippocampal estrogen has a direct effect on hippocampal neuronal functions. In vitro study demonstrated that hippocampal neuron can not respond to gonadal estrogen when hippocampal estrogen is not present. Therefore, hippocampal estrogen may exist to prime hippocampal neurons for further activation by systemic estrogen. The present study aims to investigate the role of local estrogen on the cellular adaptation via the expression of estrogen receptor. It clearly shows that local estrogen increases the expression of ER $\beta$  via basal ER $\alpha$  and ER $\beta$  activation. While, there is no effect on ER $\alpha$  expression.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน และการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. เนื้อเรื่อง	
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
2.1.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron	4
2.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	4
2.1.4 Quantitative-real time PCR (qRT-PCR)	5
2.1.5 Western blot analysis	5
2.1.6 Immunocytochemistry	6
2.1.7 การประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล	6
2.2 ผลการทดลอง	6
2.2.1 การสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal	6
2.2.2 ผลของต่อการแสดงออกของ estrogen receptor ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal	7
2.2.3 กลไกการทำงานของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ ER $\beta$ ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal	8
3. อภิปราย/วิจารณ์	9
4. สรุปและเสนอแนะ	10
5. ผลผลิต	11

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงระดับการหลั่งของ local estrogen จากเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal	7
รูปที่ 2 แสดงการแสดงออกของ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ Anastrozole 8	
รูปที่ 3 แสดงการแสดงออกของ ER $\beta$ เมื่อได้รับการในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ Anastrozole 9	

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
DHEA	dehydroepiandrosterone
DPN	estrogen receptor beta agonist
GnRH	gonadotrophin releasing hormone
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	estrogen receptor
GPR30	G-protein coupled receptor 30
PCR	polymerase chain reaction
PI-3K	phosphoinositide Kinase-3
PPT	estrogen receptor alpha agonist

## ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

### 1. บทนำ

#### 1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน และการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เอสโตรเจน (estrogen) เป็นฮอร์โมนในกลุ่มของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (McEwen & Alves, 1999) กระตุ้นและส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010) งานวิจัยจำนวนมากจึงพยายามศึกษาและพัฒนาเอสโตรเจนเพื่อนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ และ โรคพาร์กินสัน เป็นต้น (Vegeto *et al.*, 2008; Purohit & Reed, 2002) ในร่างกายมนุษย์ เอสโตรเจนส่วนใหญ่ถูกสร้างจากต่อมเพศก่อนหลังเข้าสู่กระแสเลือด (gonadal estrogen) เพื่อไปควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมาย (Fang *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์เป้าหมาย (endogenous estrogen) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์นั้น ๆ อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูง (Purohit & Reed, 2002) เช่น เอสโตรเจนที่ถูกสร้างภายในเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampal estrogen) และมีอิทธิพลโดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ จึงเป็นไปได้ว่าการทำงานของเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกควบคุมด้วย hippocampal estrogen และน่าจะเป็นอิสระจาก gonadal estrogen แต่ในความเป็นจริงโรคทางระบบประสาทต่าง ๆ มักเกิดขึ้นกับหญิงชราวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีระดับ gonadal estrogen ต่ำลงอย่างมาก แสดงให้เห็นว่า gonadal estrogen ยังคงมีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส จึงเป็นที่น่าสนใจว่าโดยแท้จริงแล้วการทำงานของเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสนั้นขึ้นกับเอสโตรเจนจากแหล่งใดเป็นสำคัญ และมีกลไกการออกฤทธิ์อย่างไร

#### การสังเคราะห์เอสโตรเจน

เอสโตรเจน ส่วนมากในร่างกายถูกสร้างขึ้นจากต่อมเพศ (gonadal estrogen หรือ exogenous estrogen) และหลังเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อไปควบคุมการทำงานของอวัยวะเป้าหมาย (McEwen & Alves, 1999) นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนซึ่งถูกสังเคราะห์ที่บริเวณอื่นนอกเหนือจากต่อมเพศ เรียกเอสโตรเจนในกลุ่มนี้ว่า extragonadal estrogen หรือ endogenous estrogen อวัยวะที่สามารถสังเคราะห์ เอสโตรเจนได้เอง ได้แก่ ต่อมหมวกไต รก เต้านม และ สมอง (Fester *et al.*, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซึ่งมีการค้นพบในปี 1995 โดย Robel และคณะ แสดงให้เห็นว่ามีการคงอยู่ของเอสโตรเจนในสมองสัตว์ทดลองขณะที่ยับยั้งการสร้าง gonadal estrogen โดยการตัดรังไข่ (Robel *et al.*, 1995) ต่อมาในปี 2003 Prange-Kiel และคณะได้ตรวจพบเอสโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ primary hippocampal neuron (1 pg/ml) และในปี 2004 Kretz และคณะ พบเอสโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ

hippocampal slice (24 pg/ml) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสังเคราะห์และการหลั่งเอสโตรเจนของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

การสังเคราะห์เอสโตรเจนเริ่มจากการเปลี่ยนโคเรสเตอรอลเป็น pregnenolone โดยอาศัยเอนไซม์ cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) ภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งการส่งผ่านข้ามเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียต้องอาศัยโปรตีนตัวพาที่สำคัญคือ steroidogenic acute regulatory protein (StAR) และจัดเป็นขั้นตอนกำหนดอัตรา (rate-limiting step) ของกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน จากนั้น pregnenolone จะถูกเปลี่ยนเป็น dehydroepiandrosterone (DHEA) และ DHEA ถูกเปลี่ยนเป็น testosterone ตามลำดับสุดท้ายเอนไซม์ aromatase จะเปลี่ยน testosterone ไปเป็นเอสโตรเจนภายใน endoplasmic reticulum (Fang *et al.*, 2001; Saldanha *et al.*, 2009) ดังนั้นการพบเอนไซม์ aromatase และ P450scc จึงบ่งชี้ว่ามีการสังเคราะห์เอสโตรเจน ขึ้นภายในเซลล์นั้น ๆ เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีการแสดงออกของ steroidogenic enzymes ที่สำคัญจำนวนมาก อาทิเช่น StAR (Wehrenberg *et al.*, 2001), P450scc (Do Rego *et al.*, 2009) และ aromatase (Fester *et al.*, 2011; Yague *et al.*, 2010) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส คือ steroidogenic cell ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอสโตรเจนและใช้ศึกษากันอย่างแพร่หลายทั้ง primary hippocampal neuron (Prange-Kiel *et al.*, 2003) และ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H19-7 hippocampal neuron (Chamniansawat & Chongthammakun, 2012)

### กลไกการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน

นอกจากจะมีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์แล้วเอสโตรเจนยังมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท ได้แก่ การปกป้องและรักษาเซลล์ประสาท ด้านการอักเสบในสมอง ตลอดจนกระตุ้นกระบวนการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2009, 2010, 2012; Vegeto *et al.*, 2008) ทั้งนี้เอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่านตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมาย ในปัจจุบันนี้มีการจำแนกตัวรับเอสโตรเจนออกเป็น 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งการแสดงออก คือ ตัวรับเอสโตรเจนในนิวเคลียส (nuclear ER) และ ตัวรับเอสโตรเจนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane ER) เมื่อเอสโตรเจนจับกับ nuclear ER ภายในเซลล์ nuclear ER ที่จับกับเอสโตรเจนจะมีการเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสของเซลล์เป้าหมายเพื่อกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยจับกับตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงบนสายดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย (estrogen responsive element) เพื่อการสังเคราะห์ยีนและโปรตีนชนิดใหม่ เรียกกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวว่า กลไกผ่านยีน (genomic action) หากเอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่าน membrane ER จะนำสู่การกระตุ้นกลไกการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมายอย่างรวดเร็ว เรียกกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวว่า กลไกไม่ผ่านยีน (non-genomic action) (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010) แต่หากพิจารณาจากโครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจนจะสามารถจำแนกตัวรับเอสโตรเจนออกเป็น 3 ชนิด คือ ตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา (ER $\alpha$ ), ตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบตา (ER $\beta$ ) และ G-protein coupled receptor 30

(GPR30) (Raz *et al.*, 2008) ซึ่งตัวรับเอสโตรเจนทั้ง 3 ชนิดนี้มีหน้าที่และการแสดงออกในอวัยวะที่ต่างกัน ER $\alpha$  มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ และระบบต่อมไร้ท่อ โดยมีรายงานว่าหนูทดลองที่ไม่มียีน ER $\alpha$  (ER $\alpha$  knockout mice) ไม่สามารถสืบพันธุ์และแพร่พันธุ์ได้ ในขณะที่หนูทดลองที่ไม่มียีน ER $\beta$  (ER $\beta$  knockout mice) ไม่มีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ (Rissman *et al.*, 1997; Kreye *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาต่อมาแสดงให้เห็นว่าทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  มีการแสดงออกในสมอง บริเวณที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ER $\alpha$  มีการแสดงออกมากในเซลล์ประสาทชนิด cholinergic บริเวณ basal forebrain bundle (BFB) ซึ่งเป็นส่วนของสมองที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมทางอารมณ์ ในขณะที่ ER $\beta$  มีการแสดงออกมากบริเวณฮิปโปแคมปัส และ ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (Shughrue *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นส่วนของสมองที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ และการสร้างความจำ (Ter Horst, 2010) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chamniansawat และ Chongthammakun ในปี 2010 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่าน ER $\beta$  ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010) ส่วนการทำงานของ GPR30 นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

### 1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 ศึกษาการสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

1.3.2 ศึกษาผลของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ estrogen receptors ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

1.3.3 ศึกษากลไกการทำงานของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ estrogen receptors ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

### 1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยทั้งหมดในโครงการนี้ครอบคลุมการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ตลอดจนผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ estrogen receptor ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อการได้รับ systemic estrogen

### 1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

#### สมมุติฐาน

Local estrogen สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ estrogen receptor เพื่อเตรียมตัวสำหรับการตอบสนองต่อการได้รับ systemic estrogen

#### กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



เนื่องจากเอสโตรเจนที่ถูกสร้างภายในเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีอิทธิพลโดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity ซึ่งเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ จึงเป็นไปได้ว่าการทำงานของเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกควบคุมด้วย hippocampal estrogen และน่าจะเป็นอิสระจาก gonadal estrogen แต่ในความเป็นจริงโรคทางระบบประสาทต่าง ๆ มักเกิดขึ้นกับหญิงชราวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีระดับ gonadal estrogen ต่ำลงอย่างมาก แสดงให้เห็นว่า gonadal estrogen ยังคงมีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส จึงเป็นที่น่าสนใจว่าโดยแท้จริงแล้วการทำงานของเซลล์ประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสนั้นขึ้นกับเอสโตรเจนจากแหล่งใดเป็นสำคัญ และมีกลไกการออกฤทธิ์อย่างไร

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ ทำให้เข้าใจบทบาทของ local estrogen ที่มีต่อการแสดงออกของ estrogen receptor ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน hippocampus นำไปสู่ความสามารถในการสนองต่อการได้รับ systemic estrogen

## 2. เนื้อเรื่อง

### 2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 2.1.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ H19-7 hippocampal neuron (ATCC<sup>®</sup> Number; CRL-2526<sup>™</sup>) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) ที่ประกอบด้วย 1.5 g/l sodium bicarbonate, 0.2 mg/ml G418, 0.001 mg/ml puromycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) และ 10% fetal bovine serum (Gibco) ใน poly-L-lysine-coated T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 25 cm<sup>2</sup> ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 33°C และความเข้มข้น CO<sub>2</sub> ที่ 5% ภายใต้สภาวะแวดล้อมและอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron (cell proliferation)

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron จะถูกเลี้ยงด้วย estrogen-free culture medium ที่ประกอบด้วย 0.01% N2 supplement (Gibco) และ 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (Sigma) ใน 6-well plate (Corning) ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 39°C และ ความเข้มข้น CO<sub>2</sub> ที่ 5% ซึ่งในสภาวะนี้เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neurons จะถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) กลายเป็น mature hippocampal neuron

#### 2.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ทำการวัดปริมาณ local estrogen ใน culture media ด้วยวิธี ELISA แบบวิธี double sandwich เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวของ 96-well plate ด้วย anti-E2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติม ELISA Blocking Buffer (R&D systems) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding จากนั้นจึงเติม culture media ที่ได้จากกลุ่มการทดลองต่างๆ เพื่อทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงล้าง antigen ส่วนเกินด้วย 0.01M PBS แล้วเติม anti-E2 antibody (ตัวเดียวกับที่ใช้เคลือบ 96-well-plate) บ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงบ่มด้วย secondary antibody ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ horseradish peroxidase (HRP) (R&D systems) เพื่อทำปฏิกิริยาอีกขั้นหนึ่ง จากนั้นจึงล้าง antibody ส่วนเกินด้วย 0.01M PBS แล้วเติม Tetramethylbenzidine (TMB) substrate (R&D systems) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1M HCl ซึ่งหากมี estrogen สารน้ำจากการทดลองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่น 450 nm

#### 2.1.4 Quantitative-real time PCR (qRT-PCR)

นำเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron ที่ได้จากการทดลองมาสกัด RNA โดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) แล้ววัดความเข้มข้นของ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการคำนวณเพื่อปรับปริมาณของ RNA ให้เท่ากันทุกกลุ่ม แล้วเปลี่ยนกลับไปเป็น cDNA ด้วยเครื่อง thermocycle โดยใช้ high capacity cDNA reverse transcription kit (Apply Biosystems, CA, USA) จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ER $\alpha$ , ER $\beta$ , กับ ยีน housekeeping (GAPDH) ด้วยเครื่อง real-time PCR (Applied biosystems) โดยใช้ TaqMan<sup>®</sup> gene expression assay kit (Apply Biosystems) ซึ่งประกอบด้วย customized primer design และ DNA-probe ที่ถูกติดฉลากด้วย FAM<sup>TM</sup> dye และคำนวณปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี threshold cycle (Ct method) โดยใช้ SDS software v. 1. 4 (Apply Biosystems) [3]

#### 2.1.5 Western blot analysis

หลังจากให้สารต่าง ๆ แก่เซลล์เพาะเลี้ยงเรียบร้อยแล้วสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, EDTA 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, NaF 50 mM) นำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปบ่มใน 5% non-fat milk เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนนำไปบ่มด้วย anti-ER $\alpha$  antibody หรือ anti-ER $\beta$  antibody (Abcam, Cambridge, UK) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA)

ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ chemiluminescent detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image [3]

### 2.1.6 Immunocytochemistry

ศึกษาการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี immunocytochemistry [3] เริ่มจากการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron บน coverslip ใน 24-well plate หลังจากให้สารต่าง ๆ แก่เซลล์เพาะเลี้ยงเรียบร้อยแล้วทำการบ่มเซลล์ด้วย 4% cold-paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มด้วย 0.2 M glycine เป็นเวลา 25 นาที แล้วตามด้วย 10% normal goat serum เป็นเวลา 30 นาที เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนที่จะบ่มด้วย anti-ER $\alpha$  antibody หรือ anti-ER $\beta$  antibody (Abcam, Cambridge, UK) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วตามด้วย fluorescent-conjugated secondary antibody ตามลำดับ และทำการศึกษาภายใต้กล้อง Leser confocal microscopy (Model FV 1000; Olympus, Tokyo, Japan)

### 2.1.7 การประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means  $\pm$  SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's *t*-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของการทดสอบต้องมีค่า  $P \leq 0.05$  ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

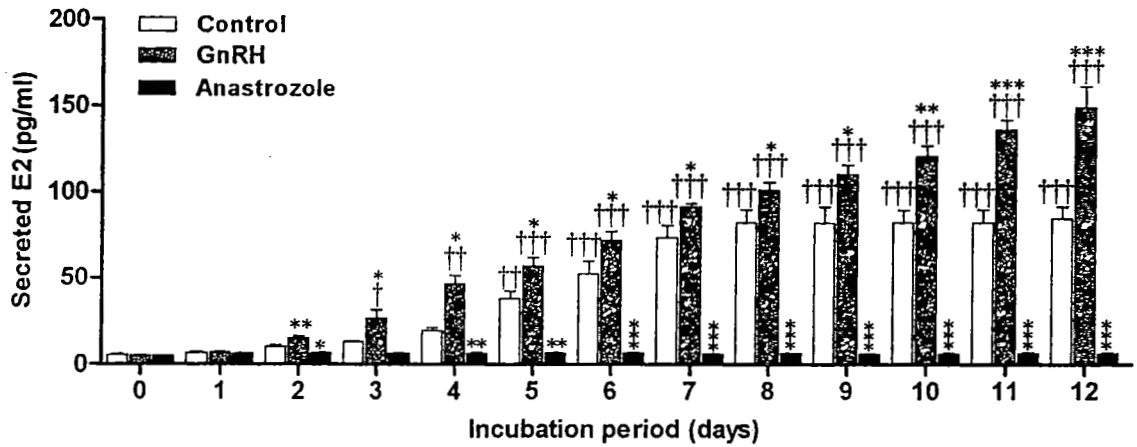
## 2.2 ผลการทดลอง

### 2.2.1 การสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

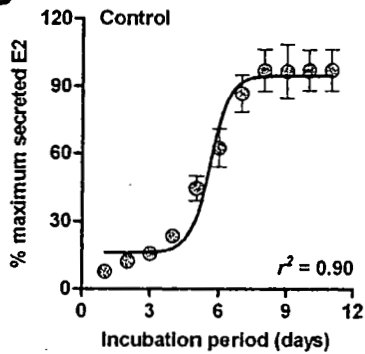
เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการสังเคราะห์ estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการสังเคราะห์ estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ในภาวะปกติ (control) เทียบกับการให้ anastrozole (aromatase inhibitor) และการให้ Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ และกลุ่มควบคุมเชิงบวกตามลำดับ โดยการวัดปริมาณการหลั่งในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในภาวะปกติสามารถวัดปริมาณ estrogen ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป ส่วนกลุ่มที่ได้รับ GnRH นั้นสามารถวัดได้ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถตอบสนอง GnRH ได้ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ Anastrozole สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ได้ตลอดการทดลอง (รูปที่ 1A) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการศึกษารูปแบบของการสังเคราะห์ local estrogen (รูปที่ 1B-D)

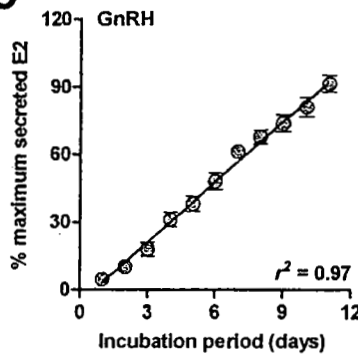
A



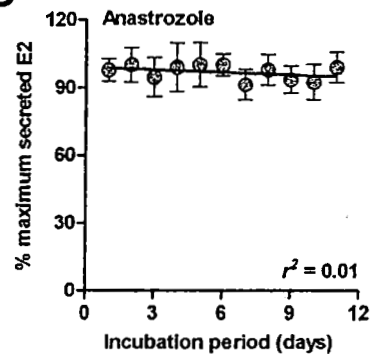
B



C



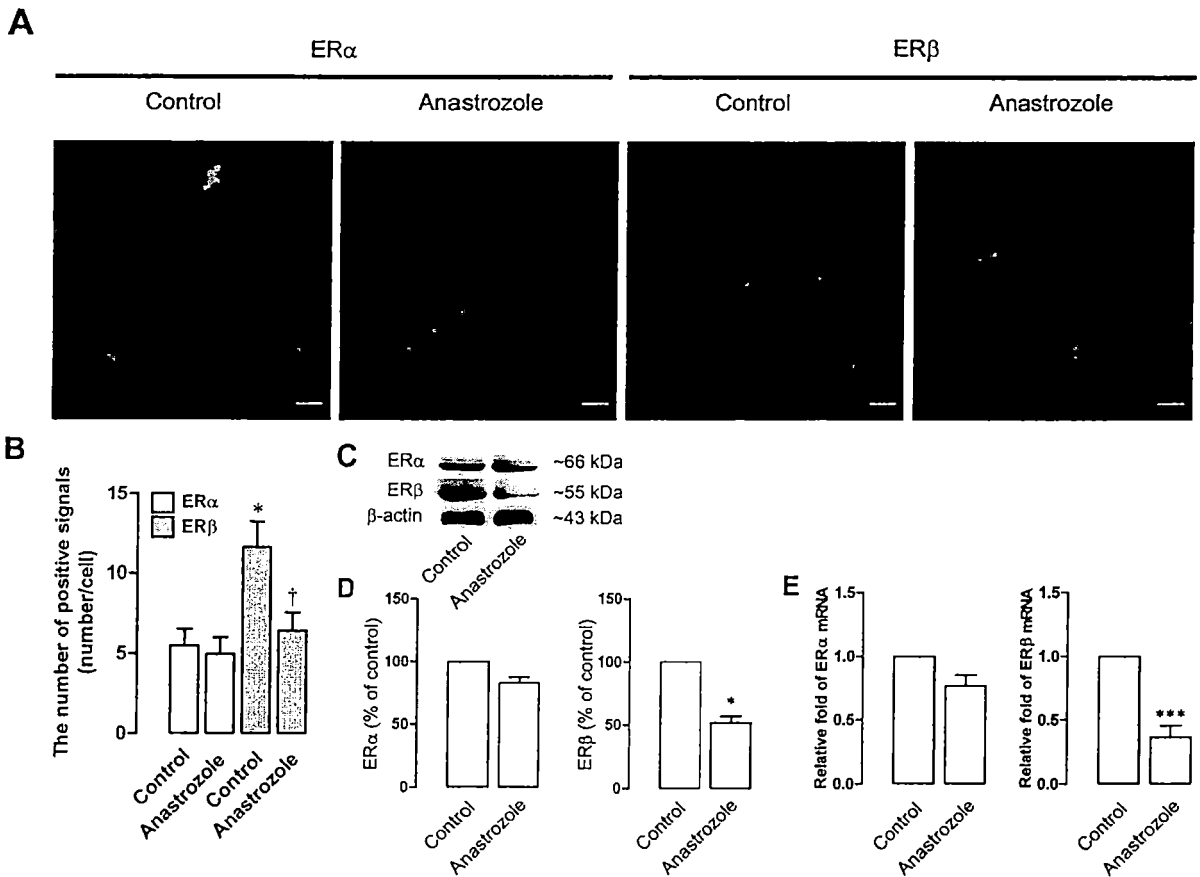
D



รูปที่ 1 แสดงระดับการหลั่งของ local estrogen จากเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal (n = 3)

## 2.2.2 ผลของต่อการแสดงออกของ estrogen receptor ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

ผู้วิจัยทำการศึกษาผลของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ estrogen receptor ทั้งสองชนิด คือ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ด้วยวิธี western blot real time PCR และ immunocytochemistry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กลุ่มที่ยับยั้ง local estrogen ด้วย anastrozole มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ ER $\alpha$  ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 2A-E)

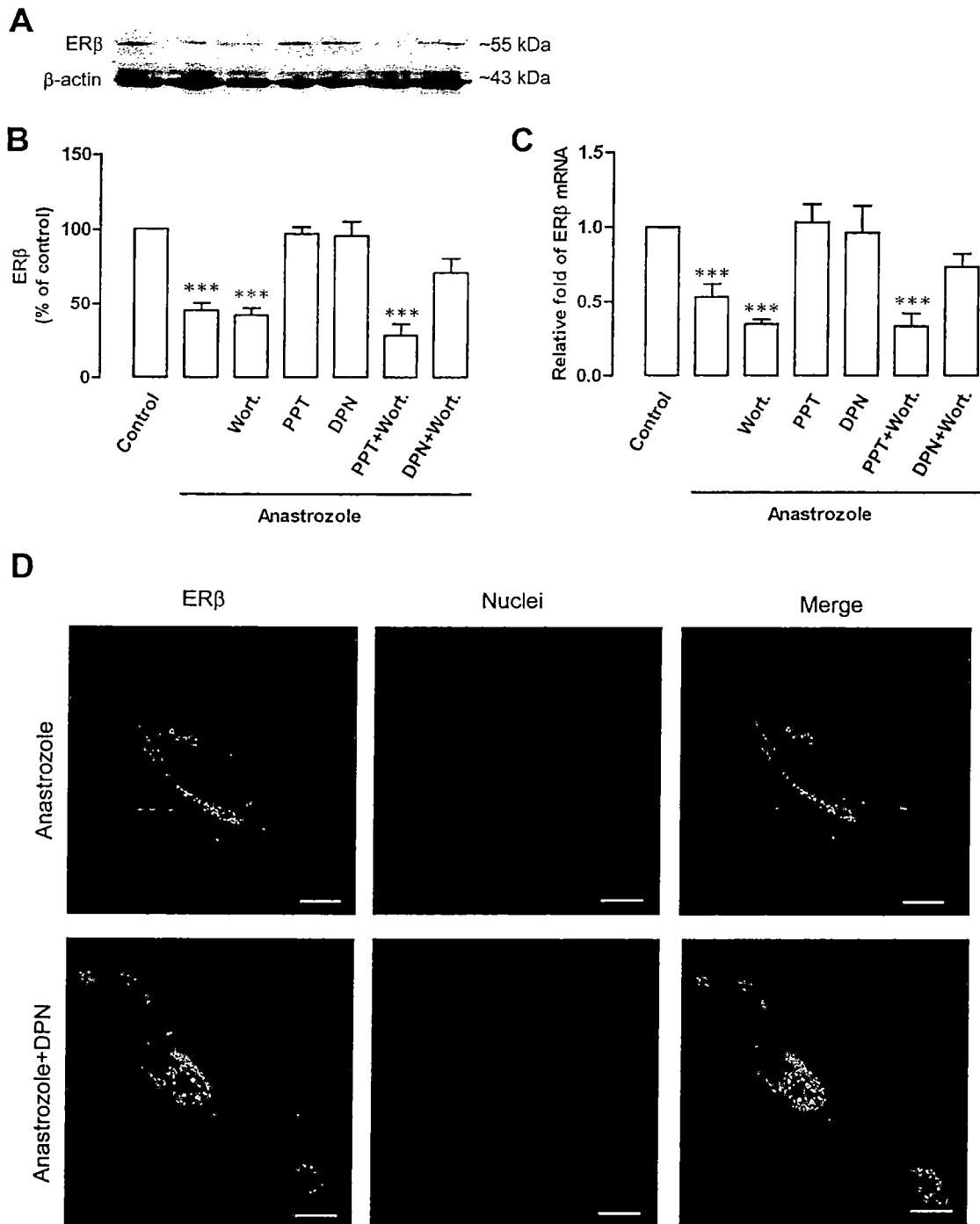


รูปที่ 2 แสดงการแสดงออกของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ Anastrozole \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

### 2.2.3 กลไกการทำงานของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ ER $\beta$ ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของ local estrogen ต่อการแสดงออกของ ER $\beta$  ด้วยวิธี real time PCR และ western blot ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า DPN (ER $\beta$  agonist) สามารถเพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  กลับมาได้ถึงแม้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจะได้รับ anastrozole ก็ตาม ในขณะที่ PTT (ER $\alpha$  agonist) ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  กลับมาได้ แสดงให้เห็นว่า local estrogen เพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  อาศัยการกระตุ้น basal ER $\beta$  (รูปที่ 3A-C)

นอกจากนี้การยับยั้ง PI-3K signaling pathway ด้วย wortmannin ทำให้ PTT ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ER $\beta$  ได้ เป็นการยับยั้งการ basal ER $\alpha$  แสดงให้เห็นว่าการทำงานของ basal ER $\alpha$  ต้องการการกระตุ้น PI-3K signaling pathway (รูปที่ 3A-C) เป็นลักษณะที่บ่งชี้ว่าการทำงานเป็นแบบ nongenomic ในขณะที่ การกระตุ้น ER $\beta$  ทำให้มีการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส บ่งชี้ว่าการทำงานเป็นแบบ genomic (รูปที่ 3D)



รูปที่ 6 แสดงการแสดงออกของ ERβ เมื่อได้รับการในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ Anastrozole \*  
 $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

### 3. อภิปราย/วิจารณ์

#### 3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ

จากชื่อของโครงการวิจัย “บทบาทของการสังเคราะห์เอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทในภาวะที่มีการให้สาร inflammatory cytokines แก่เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron” ทำให้ผู้วิจัยพิจารณาแบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วน คือ 1) การสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะปกติ และ 2) ในภาวะที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยการให้ inflammatory cytokines ในขณะที่ทำการทดลองได้ผลการทดลองส่วนแรกเป็นที่น่าพึงพอใจและมีศักยภาพในการตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ ผู้วิจัยจึงส่ง manuscript (ภาคผนวก) ที่เขียนกิตติกรรมประกาศแก่สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร experimental and molecular medicine ซึ่งมีค่า impact factor 2.4 และในขณะนี้อยู่ระหว่างการพิจารณาของบรรณาธิการภายหลังการปรับแก้จากผู้วิจัย (revised) หลักฐานแสดงในภาคผนวก

จากการที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเชิงลึกถึงกลไกการทำงานของ local estrogen ซึ่งต้องใช้งบประมาณวิจัยส่วนที่เหลือในการจัดซื้อสารเคมีเพิ่มเติม ได้แก่ ER $\alpha$  agonist (PPT), ER $\beta$  agonist (DPN), และ PI-3K inhibitor (wortmannin) ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่มีงบประมาณวิจัยเพียงพอในการศึกษาส่วนที่สองได้

### 3.2 อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ได้แสดงปริมาณการสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยมีปริมาณการแสดงออกเท่ากับที่มีการรายงานในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยง และ primary hippocampal neuron แสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ถึงศักยภาพในการนำไปใช้ในการศึกษาทดลองเกี่ยวกับบทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ นอกจากนี้การที่ปริมาณของ local estrogen เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ GnRH และลดลงในกลุ่มที่ได้รับ anastrozole แสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal สามารถตอบสนองดังกล่าวเป็นคุณสมบัติของเซลล์ในกลุ่ม steroidogenic

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า local estrogen เพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  ผ่านการกระตุ้น ER $\alpha$  และ ER $\beta$  เริ่มต้น (basal ER $\alpha$  และ ER $\beta$ ) โดยที่ basal ER $\alpha$  ทำงานผ่าน PI-3K signaling pathway ส่วน ER $\beta$  อาศัยการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสซึ่งเป็นการทำงานแบบผ่านไม่ผ่านยีนและผ่านยีนตามลำดับ ในขณะที่ local estrogen ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ ER $\alpha$  ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chamniansawat & Chongthammakun (2010) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ER $\beta$  เป็นตัวรับที่ทำหน้าที่หลักในการทำงานของเซลล์ประสาทต่อการสร้างความจำซึ่งเกิดขึ้นที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

### 4. สรุปและเสนอแนะ

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นการสังเคราะห์ local estrogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal ซึ่งในภาวะปกติจะหลั่ง estrogen ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่า local estrogen เพิ่มการแสดงออกของ ER $\beta$  โดยอาศัยการกระตุ้น basal ER $\alpha$  และ ER $\beta$  โดยที่ basal ER $\alpha$  ทำงานผ่าน PI-3K

signaling pathway ส่วน ER $\beta$  อาศัยการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสซึ่งเป็นการทำงานแบบผ่านไม่ผ่านยีนและผ่านยีนตามลำดับในขณะที่ local estrogen ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ ER $\alpha$

## 5. ผลผลิต

โครงการวิจัยกำลังดำเนินการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

เรื่อง A priming role of local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity and neuroprotection



ภาคผนวก

**A priming role of local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity and neuroprotection.**

Siriporn Chamniansawat<sup>1,3</sup>, Sukumal Chongthammakun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Rd., Saensook, Muang, Chonburi 20131, Thailand

<sup>2</sup>Department of Anatomy and Center for Neuroscience, Faculty of Science, Mahidol University, 272 Rama VI Road, Ratchathewi District, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>Corresponding author: Tel & Fax, +66-38-393-497; E-mail address, siripornc@buu.ac.th

Abbreviations: Arc, Activity-regulated cytoskeleton associated protein; Bcl2, B cell lymphoma 2; DPN, Estrogen receptor  $\beta$  agonist; E2, Estrogen; ER, Estrogen receptor; GnRH, Gonadotrophin releasing hormone; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hydrogen peroxide; OVX, Ovariectomized; PI-3K, Phosphoinositide kinase-3; PPT, Estrogen receptor  $\alpha$  agonist; PSD-95, postsynaptic density protein 95; Wort, Wortmannin

**Abstract**

The localization of estrogen (E2) has been clearly shown in hippocampus, called local hippocampal E2. It enhanced neuronal synaptic plasticity and protected neuron from cerebral ischemia, similar to those effects of exogenous E2. However, the interactive function of hippocampal and exogenous E2 on synaptic plasticity activation and neuroprotection is still elusive. By using hippocampal H19-7 cells, we demonstrated the local hippocampal E2 that totally suppressed by aromatase inhibitor anastrozole. Anastrozole also suppressed estrogen receptor (ER) $\beta$ , but not ER $\alpha$ , expression. Specific agonist of ER $\alpha$  (PPT) and ER $\beta$  (DPN) restored ER $\beta$  expression in anastrozole-treated cells. In combinatorial treatment with anastrozole and Phosphoinositide Kinase-3 (PI-3K) signaling inhibitor wortmannin, PPT could not improve hippocampal ER $\beta$  expression. On the other hand, DPN induced basal ER $\beta$  translocalization into nucleus of anastrozole-treated cells. Exogenous E2 increased synaptic plasticity markers expression in H19-7 neurons. However, exogenous E2 could not enhance synaptic plasticity in anastrozole-treated group. Exogenous E2 also increased cell viability and B-cell lymphoma 2 (Bcl2) expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. In combined treatment of anastrozole and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, exogenous E2 failed to enhance cell viability and Bcl2 expression in hippocampal H19-7 cells. Our results provided the evidence of the priming role of local hippocampal E2 on exogenous E2-enhanced synaptic plasticity and viability of hippocampal neurons.

**Keywords:**

estrogen receptor; exogenous estrogen; local estrogen; synaptic plasticity; neuroprotection; hippocampal cell

## Introduction

E2 is mainly synthesized in the gonad, called gonadal or exogenous E2, and reaches its target organ via blood circulation. It has been reported to influence memory function (Henderson, 2010; Gorenstein *et al.*, 2011) and neuroprotection (McCullough *et al.*, 2003) through estrogen receptor (ER), which highly expressed in cerebral cortex and hippocampus (Henderson, 2010). In menopausal women, E2 replacement therapy relieved memory impairment (Gorenstein *et al.*, 2011). Previous study demonstrated the decreasing of hippocampal dendritic spine in ovariectomized (OVX) rats that restored by an administration of exogenous E2 (Gould *et al.*, 1990). During estrous cycle, the hippocampal spine density is varied in response to fluctuating level of E2 in female rats (Woolley and McEwen, 1992). Moreover, our previous studies demonstrated that a variety of synaptic marker proteins is up-regulated after exogenous E2 application (Chamniansawat and Chongthammakun 2009;2010), confirming the positive role of exogenous E2 on synaptic plasticity and memory consolidation. E2 also prevents neuronal death from ischemic brain injury (Dubal *et al.*, 1999). It regulated neuronal viability through Bcl2 expression, but not other member of Bcl2 family (Dubal *et al.*, 1999).

In addition to gonad, endogenous E2 production and secretion in hippocampus were well demonstrated (Prange-Kiel and Rune, 2006). The presence of all enzymes responsible for endogenous E2 biosynthesis and a sixfold higher E2 concentration in hippocampus than that in plasma (Hojo *et al.*, 2004) strongly indicate the potential roles of local hippocampal E2 on hippocampal functions. Previous studies revealed that inhibition of the local E2 biosynthesis by aromatase inhibitor significantly reduced the density of hippocampal synapses and down-regulated synaptic proteins, including

spinopholin and synaptophysin (Kretz *et al.*, 2004; Mukai *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Local hippocampal E2 also regulated the expression of ER (Prange-Kiel *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2003). In addition to synaptic plasticity, the neuroprotective role of local hippocampal E2 had been demonstrated by using aromatase knockout mice (McCullough *et al.*, 2003). Loss of endogenous or local E2 exhibited an increase in the severity of ischemic injury compared with the normal as well as OVX mice. These evidences indicated that the neuronal functions are mainly affected by local hippocampal E2. However, the decreased in synaptic plasticity was presented in OVX rats (Woolley and McEwen, 1992), which local hippocampal E2 should be intact. Therefore, hippocampal neuronal function is depended on both endogenous and exogenous E2. We hypothesized in the present study that the mechanism of exogenous E2 action is an endogenous E2-dependent manner. The aims of this study were to investigate the effects and mechanisms of endogenous E2 action on the modulation of synaptic plasticity and neuroprotection in hippocampal H19-7 cells.

## Results

### Local E2 production in hippocampal H19-7 cell

To determine the production and secretion of E2 in hippocampal H19-7 cells, we measured E2 concentration in culture media of untreated, gonadotrophin releasing hormone (GnRH)-treated or anastrozole-treated hippocampal H19-7 cells by using ELISA kit. At day 0, basal E2 levels of untreated, GnRH-treated, and anastrozole-treated cells were  $5.46 \pm 0.51$ ,  $5.11 \pm 0.25$ , and  $4.89 \pm 0.25$  pg/ml, respectively (Figure 1A). In untreated hippocampal H19-7 cells, secreted E2 significantly increased from days 5

through 12 ( $37.52 \pm 4.58$  pg/ml to  $80.04 \pm 7.40$  pg/ml) (Figure 1A). Maximum secreted E2 level in untreated hippocampal H19-7 cells was comparable to those report in hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). GnRH increased hippocampal E2 secretion from days 3 through 12 ( $26.81 \pm 4.55$  to  $148.72 \pm 12.47$  pg/ml) (Figure 1A). Moreover, when compared with the untreated group, GnRH significantly increased E2 levels from days 2 through 12 (Figure 1A). However, when the activity of aromatase was inhibited by anastrozole, the E2 levels were not changed throughout 12 days of experimental period.

The hippocampal E2 secretion profile of control, GnRH-treated, and anastrozole-treated hippocampal H19-7 neurons were demonstrated by the percent maximum secreted E2-experimental period relationship. The data of control cells were best fitted with the non-linear regression equation that revealed the sigmoidal line ( $r^2 = 0.90$ , Figure 1B). In the first three days, E2 levels slowly increased, while it rapidly increased from 4<sup>th</sup> day and to the maximum level in 8<sup>th</sup> day (Figure 1B). The half maximum E2 secretion was presented in 5<sup>th</sup> day to 6<sup>th</sup> day and the maximum E2 secretion with the plateau phase was showed in day 8 though 12 (Figure 2A). Therefore, we selected 8<sup>th</sup> day as a suitable culture condition in next experiments for studied the effect of local E2 on hippocampal H19-7 neuron. GnRH changed the secretory profile form sigmoid function to linear function ( $r^2 = 0.97$ , Figure 1C). The E2 levels of GnRH-treated group rapidly increased form day 1 through 12 (Figure 1C), whereas E2 levels of anastrozole-treated group showed relatively constant throughout 12 days of experimental period (Figure 1D).

#### **Local E2 regulates ER $\beta$ expression in hippocampal H19-7 cell**

It is well known that ER, including ER $\alpha$  and ER $\beta$ , expression is upregulated by E2 (Oliveira *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2003). We therefore investigated the effects of the local E2 on ER expression by using the confocal immunocytochemistry and Western blot techniques. To determine those effects, hippocampal H19-7 cells were cultured in either steroid-deprived media with or without anastrozole for 8 days. In control group, ER $\beta$  expression was significantly higher than ER $\alpha$  (Figure 2A, B, and C). In the presence of anastrozole, the level of ER $\beta$  expression was significantly decreased, whereas ER $\alpha$  expression was not changed (Figure 2A-E). These results indicated that the local E2 up-regulated ER $\beta$ , but not ER $\alpha$ , expression in hippocampal H19-7 cells.

#### **Local E2-increased ER $\beta$ expression is a basal ER $\alpha$ - and ER $\beta$ -dependent mechanism**

We further examined the underlying mechanism of local E2-induced ER $\beta$  expression by using Western blotting analysis. Hippocampal H19-7 cells exposed to anastrozole for 8 days had significantly lower ER $\beta$  expression than control group (Figure 3A and B.). The level of ER $\beta$  expression could be restored by administration of specific agonist of ER $\alpha$  (100 nM PTT) and ER $\beta$  (100 nM DPN) in day 7<sup>th</sup> of experimental period. This result indicates that the local E2-induced ER $\beta$  expression is a basal ER $\alpha$  and ER $\beta$ -dependent mechanism. Wortmannin (200 nM Wort.), a specific PI-3K inhibitor, had no additive effect on anastrozole-suppressed ER $\beta$  expression (Figure 3A and B.). Wortmannin attenuated PPT-, but not DPN-, induced ER $\beta$  expression. Therefore, local hippocampal E2 enhanced ER $\beta$  expression in basal ER $\alpha$ -PI-3K dependent mechanism.

We further examined the effect of local E2 on ER $\beta$  activation by determining the translocation of basal ER $\beta$  in hippocampal H19-7 cells by using laser confocal microscopy (Figure 4C). In anastrozole treated group, the basal ER $\beta$  localized in cytoplasmic and membranous regions of hippocampal H19-7 cells. After DPN treatment, basal membranous and cytoplasmic ER $\beta$  decreased, but the nuclear ER $\beta$  increased. This findings suggest that the membranous and cytoplasmic ER $\beta$  translocalize into nucleus in ligand-dependent mechanism, indicating a characteristic of classical genomic action.

### **Local E2 mediates exogenous E2-induced synaptic plasticity**

Although local hippocampal E2- and exogenous E2-enhanced hippocampal synaptic plasticity had been explained (Prange-Kiel and Rune, 2006), the role of the local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity is still unclear. By using synaptic plasticity markers, activity-regulated cytoskeleton associated protein (*Arc*) and postsynaptic density (*PSD-95*), we observed the interactive effect of local and exogenous E2 on synaptic plasticity using qRT-PCR and Western blot analysis in hippocampal H19-7 cells. As shown in Figure 3A and 3B, exogenous E2 treatment for 30 min and 6 h significantly increased *Arc* and *PSD-95* mRNA expression, respectively. Anastrozole unaltered the basal *Arc* and *PSD-95* mRNA expression. Interestingly, exogenous E2 could not enhance *Arc* and *PSD-95* mRNA expression when hippocampal H19-7 cells were cultured in anastrozole-containing media (Figure 3A, B).

Similar to those mRNA, administration of exogenous E2 (1 h and 48 h for *Arc* and *PSD-95*, respectively) also induced *Arc* and *PSD-95* proteins expression (Figure 3C, D, and E). Anastrozole had no effect on basal *Arc* and *PSD-95* proteins expression. Exogenous E2 failed to enhance *Arc* and *PSD-95* protein expression in anastrozole-



treated neurons (Figure 3D, E). These findings indicated that hippocampal E2 was prerequisites for exogenous E2-enhanced hippocampal synaptic plasticity.

### **Local E2 mediates neuroprotective effect of exogenous E2**

The neuroprotective effects of E2 have been well demonstrated. However, the involvement of local E2 on neuroprotective effect of exogenous E2 is still elusive. As demonstrated in Figure 4A, 1 h of 200  $\mu$ M hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) exposure significantly decreased hippocampal H19-7 cell viability.  $H_2O_2$ -induced cell death was enhanced by anastrozole. Preincubation of the cells with exogenous E2 for 24 h prior to addition of  $H_2O_2$  attenuated  $H_2O_2$ -induced cell death. However, therapeutic effect of exogenous E2 on  $H_2O_2$ -induced H19-7 cell death was absent when cells were exposed to anastrozole (Figure 4A).

We also observed the effect of local E2 and exogenous E2 on anti-apoptotic protein Bcl<sub>2</sub>, the specific target of E2 (Dubal *et al.*, 1999). While 24 h of exogenous E2 preincubation significantly enhanced Bcl<sub>2</sub> expression,  $H_2O_2$  significantly suppressed its expression (Figure 4B). Additional effect of anastrozole on  $H_2O_2$ -suppressed Bcl<sub>2</sub> expression was demonstrated. Similar to those cell viability studies, exogenous E2 totally rescued Bcl<sub>2</sub> expression in  $H_2O_2$ -treated H19-7 neurons. Exogenous E2 could not restore  $H_2O_2$ -suppressed Bcl<sub>2</sub> expression in anastrozole treated neurons (Figure. 4B). These findings suggest the prerequisite role of local hippocampal E2 on neuroprotective function of exogenous E2.

### **Discussion**

De novo E2 production and secretion in hippocampus has been demonstrated in both primary hippocampal neurons (Prange-Kiel *et al.*, 2003) and hippocampal slice

cultures (Kretz *et al.*, 2004). In the present study, we showed the production and secretion of local E<sub>2</sub> in hippocampal H19-7 cells. Our findings demonstrate the sigmoidal secretory profile of H19-7 hippocampal E<sub>2</sub>. In first 3 days after seeding the secreted E<sub>2</sub> levels relatively constant probably due to the preparation of intracellular machinery that responsible for production and secretion of E<sub>2</sub>, we named this period as “the preparation state”. In days 4 to 7, secreted E<sub>2</sub> rapidly increased form 16.2% to 90.6% of maximum secreted E<sub>2</sub>; it was named “the active state”. Finally, secreted E<sub>2</sub> reached the maximum plateau state in days 8 to 12. However, secreted E<sub>2</sub> levels were relatively unaltered when hippocampal H19-7 cells were incubated with anastrozole. This finding indicates that E<sub>2</sub> production and secretion in hippocampal H19-7 cells required aromatase activity similar to those reported in primary hippocampal neurons (Prange-Kiel *et al.*, 2003) and hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). In addition, the maximum secreted E<sub>2</sub> levels in hippocampal H19-7 cells were comparable to that report in hippocampal slice cultures (Kretz *et al.*, 2004). Therefore, H19-7 hippocampal cells were a suitable model for studying the effect and mechanism of hippocampal E<sub>2</sub> on hippocampal neuronal functions.

It has clearly been demonstrated that GnRH receptor expressed in hippocampus (Chu *et al.*, 2008; Schang *et al.*, 2011), thus, hippocampal neuron can selectively respond to GnRH treatment. In the present study, we reported the activating effect of GnRH on local hippocampal E<sub>2</sub> level, indicating that GnRH enhanced endogenous E<sub>2</sub> biosynthesis in hippocampal H19-7 neuron. Similar to previous study, that demonstrated the activating effect of GnRH on E<sub>2</sub> biosynthesis and secretion in SH-SY5Y neurons (Rosati *et al.*, 2011). GnRH enhanced the expression of enzymes involved in E<sub>2</sub> biosynthesis, including seladin-1, steroidogenic acute regulatory protein

(StAR), and cytochrome P450 (Attar and Bulun, 2006), indicated the feasibility of using hippocampal H19-7 cell for investigating the role of local E2 on hippocampal function.

There are two ER subtypes, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which are expressed in hippocampus (Bliss and Collingridge, 1993). Expressions of those ERs are regulated by its ligand, E2 (Oliveira *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2003). In the present study, we showed the direct activating action of local hippocampal E2 on ER $\beta$  expression. Suppression of the local E2 by aromatase inhibitor led to downregulation of ER $\beta$  expression in hippocampal neurons. Local hippocampal E2 had no effect on ER $\alpha$  expression. In hippocampus, ER $\beta$  play an important role in long-term potentiation (LTP) enhancement, memory improvement (Liu *et al.*, 2008; Day *et al.*, 2005), and neuroprotection (Zhao *et al.*, 2004; Dubal *et al.*, 1999]. The autocrine and paracrine actions of hippocampal E2 on an enhancement of ER $\beta$  expression are suggested to prime hippocampal neurons for further activation by exogenous E2.

We also demonstrated that hippocampal E2 acted through basal ER $\alpha$ -PI-3K-dependent pathway to enhance ER $\beta$  expression, which classified as a non-genomic pathway. Membrane ER $\alpha$  directly interacted with PI-3K (Simoncini *et al.*, 2002), therefore ER $\alpha$  agonist PPT failed to activate wortmannin-treated cells. On the other hand, local hippocampal E2 activated nuclear translocation of basal ER $\beta$  in H19-7 hippocampal cells, which was consistent with our previous report (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010). Exogenous E2 activated ER $\beta$  translocation into nucleus to enhance synaptic plasticity (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010), hence local hippocampal and exogenous E2 regulated neuronal function in classical genomic ER $\beta$ -dependent mechanism.

Previously, the potential action of hippocampal and exogenous E2 on hippocampal synaptic plasticity has been reported (Gould *et al.*, 1990; Prange-Kiel and Rune, 2006). Little is known about the interactive function of local hippocampal and exogenous E2 on synaptic plasticity. Exogenous E2 upregulated synaptic plasticity marker expression in hippocampal H19-7 cells. However, when endogenous E2 synthesis was inhibited by aromatase inhibitor anastrozole, exogenous E2 could not enhance synaptic plasticity in hippocampal H19-7 cells, suggesting that exogenous E2 function is endogenous E2-dependent mechanism. Previously, ER $\beta$  knockout mice exhibited attenuation of hippocampal plasticity and memory impairment (Liu *et al.*, 2008; Day *et al.*, 2005) although exogenous E2 is still present. Since the downregulation of ER $\beta$  expression is demonstrated in anastrozole-treated hippocampal H19-7 cells, E2 could not enhance hippocampal synaptic plasticity similar to those transgenic mice. The priming action of local hippocampal E2 on ER $\beta$  expression is suggested to be essential for exogenous E2-enhanced hippocampal synaptic plasticity.

Neuroprotective function of both exogenous E2 and endogenous E2 has been identified (McCullough *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004; Dubal *et al.*, 1999). Exogenous E2 exclusively mediated Bcl2 expression, but not other Bcl2 family, including Bax, Bcl-xl, Bcl-xs, and Bad, to prevent neuronal death in ischemic brain injury model (Dubal *et al.*, 1999). On the other hand, aromatase knockout mice exhibited higher brain damage than the wild type-OVX mice after cerebral artery occlusion (McCullough *et al.*, 2003), indicated an important role of local E2 on neuronal viability. In the present study, we reported the priming action of hippocampal E2 on exogenous E2 enhanced hippocampal H19-7 cell viability and Bcl<sub>2</sub> expression. Local hippocampal E2 influenced ER $\beta$  expression that **required** for exogenous E2-enhanced Bcl2 expression

and neuronal viability (Dubal *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Therefore, neuroprotective action of exogenous E2 requires autocrine and paracrine actions of hippocampal E2-induced ER $\beta$  expression.

In conclusion, our study demonstrated the priming action of hippocampal E2 on systemic E2 functions. The hippocampal E2 upregulates hippocampal ER $\beta$  expression, which is necessary for systemic E2 functions. However, the molecular mechanism of hippocampal E2 enhanced ER $\beta$  expression and mediated synaptic plasticity and neuroprotection requires further study.

## Methods

### Cell culture

H19-7 cells of hippocampal origin (H19-7 hippocampal cells; ATCC<sup>®</sup> Number, CRL-2526<sup>™</sup>) were grown on poly-L-lysine-coated dishes, in Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 33 °C as described previously (Bhargava *et al.*, 2000). Hippocampal H19-7 cells are transformed with a temperature-sensitive mutant of simian virus 40 T antigen and are conditionally differentiated. For differentiation, cells were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 39 °C in DMEM and N<sub>2</sub> supplements (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the process was accelerated by adding 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (Sigma, St. Louis, MO, USA). To find out the optimal level of E2 secretion, hippocampal H19-7 cells were incubated with culture media, 25 nM anastrozole-containing culture; or 0.01 uM GnRH-containing culture media for 12 days. To investigate the effect and mechanisms of local hippocampal E2 on exogenous E2, cells were treated with 10 nM E2, 25 nM anastrozole, 100 nM PPT, 100 nM DPN,

or 200 nM wortmannin according to the need of each experiment. All stimulant drugs are purchased from Sigma.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

To evaluate secreted E2 levels in culture media, colorimetric rat E2 ELISA kits (TSZ ELISA; Framingham, MA, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, culture medium were pipetted into micro-assay well which had been precoated with monoclonal antibody against E2, followed by incubation at 37°C for 30 min. And then washing buffer was added to wash an excess binding before added HRP-conjugated reagent to each well. To develop the reaction, chromogen substrate was added and incubated at 37°C for 15 min in light protection. The reaction were stopped by add 50 ml stop solution into each well. Absorbance was read at 540 nm on a microplate reader (Bio-Tek). Samples were quantified by interpolation with standard curve.

### **Immunocytochemistry**

For immunocytochemistry, hippocampal H19-7 cells were seeded on 12-mm glass coverslips at a density of 10,000 cells/coverslip and cultured overnight as previously described (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). At the end of all treatments, cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde at 4 °C, followed by permeabilization in 0.2 M glycine. After blocking of nonspecific binding, cells were incubated overnight at 4 °C with 1:100 mouse anti-ER $\alpha$  or 1-100 mouse anti-ER $\beta$  antibodies (Abcam, Cambridge, UK). After washing away excess primary antibodies, cells were then incubated with 1:1000 fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-mouse IgG secondary antibody (Zymcd), and subsequently stained for nuclei with 1:500 TROPO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). We used a confocal laser-scanning

microscope (model FV 1000; Olympus, Tokyo, Japan) to analyze the fluorescent signals.

### **Western blot analysis**

Western blot analysis was performed as described previously (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). H19-7 hippocampal cells were lysed with RIPA buffer. Equal amounts of protein were separated on 10% SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with 1:1000 mouse anti-ER $\alpha$ , -ER $\beta$ , -Arc (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), rabbit anti-PSD-95 (Abcam), or -Bcl<sub>2</sub> (Abcam) antibodies, and then incubated with a HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA). The signal was detected with ECL Western blotting substrate (Pierce, Rockford, IL) and captured on Hyperfilm<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

### **Quantitative real time-PCR (qRT-PCR)**

To determine mRNA levels of *Arc* and *PSD-95* in H19-7 hippocampal neuron, total RNA was extracted by using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol as previously described (Chamniansawat and Chongthammakun, 2009). A 2 $\mu$ g total RNA was converted to cDNA with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on the Applied Biosystems PRISM 7700 Sequence Detection System using TaqMan-Gene Expression Assays with FAM<sup>TM</sup> dye-labeled TaqMan<sup>®</sup> MGB probes, which contained customized primer design according to the manufacturer's protocol. The positive endogenous control was GAPDH and the negative control was water. The relative expression of mRNA was calculated using the comparative Ct method by using SDS software v.1.3.1 (Applied Biosystems).

All data were normalized with the endogenous reference gene GAPDH expression (Applied Biosystems).

### **MTT reduction assay**

The cell viability was determined by the quantitative colorimetric with MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma). Cells were plated on 96-well culture plates at a density of 10,000 cells per well. Cells were cultured in media or media containing anastrozole for 8 days, then, treated with 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or culture media for 1 h. The medium was removed and mixed with a solution of 1 mg/ml MTT for 3 h in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37 °C. The supernatant was then removed, and the formazan crystals in the cells were solubilized with DMSO. Absorbance was read at 570 nm on a microplate reader.

### **Data analysis**

All data were expressed as mean $\pm$ SEM. Two sets of data were compared using the unpaired Student's *t*-test. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's posttest was employed for multiple sets of data. The level of significance of all statistical tests was  $P < 0.05$ . Linear regression and non-linear regression analysis were performed to obtain the % maximum secreted E2-incubation period relationship. All data were analyzed by GraphPad Prism version 5.0 for Window (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund and Higher Education Commission (No. MRG5480211) and Higher Education Commission (No.



44496) to S. Chamniansawat. We also thanks Dr. Narongrit Thongon for a kind technical assistance.

## References

- Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006;12:49–56
- Bhargava A, Meijer OC, Dallman MF, Pearce D. Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus, *J Neurosci* 2000;20:3129–3138
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31–39
- Chamniansawat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2009;452:130–135
- Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2010;470:49–54
- Chu C, Gao G, Huang W. A study on co-localization of FSH and its receptor in rat hippocampus. *J Mol Histol* 2008;39:49–55
- Day M, Sung A, Logue S, Bowlby M, Arias R. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 2005;164:128–131

- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 1999;19:6385-6393
- Gorenstein C, Rennó J, Vieira Filho AH, Gianfaldoni A, Gonçalves MA, Halbe HW, Fernandes CE, Demétrio FN. Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: a randomized trial. *Arch Womens Ment Health* 2011; In press
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 1990;10:1286-1291
- Henderson VW. Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800: 1077-1083
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:865-870
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 2004;24:5913-5921
- Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen

- receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 2008;11:334–343
- McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Oz OK, Hurn PD. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci* 2003;23:8701–8705
- Murata T, Narita K, Honda K, Matsukawa S, Higuchi T. Differential regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNAs in the rat uterus during pregnancy and labor: possible involvement of estrogen receptors in oxytocin receptor regulation. *Endocr J* 2003;50:579–587
- Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, Kawato S, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:1030–1044
- Oliveira CA, Mahecha GA, Carnes K, Prins GS, Saunders PT, França LR, Hess RA. Differential hormonal regulation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction* 2004;128:73–86
- Prange-Kiel J, Rune GM. Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 2006;138:765–772
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 2003;13:226–234
- Rosati F, Sturli N, Cungi MC, Morello M, Villanelli F, Bartolucci G, Finocchi C, Peri A, Serio M, Danza G. Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;124:77–83

- Schang AL, Ngô-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut MC, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN. GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity. *Endocrinolo* 2011;152:568–580
- Simoncini T, Rabkin E, Liao JK. Molecular Basis of Cell Membrane Estrogen Receptor Interaction With Phosphatidylinositol 3-Kinase in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:198-203
- Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 1992;12:2549–2554
- Zhao L, Wu TW, Brinton RD. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res* 2004;1010:22–34.
- Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM. Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of OVX mice. *Endocrinolo* 2010;151:1153–1160

### Figure legends;

**Figure 1.** Secreted local E2 in culture media of hippocampal H19-7 neurons. Secreted E2 of control (open bars), GnRH-treated (gray bars) and anastrozole-treated (black bars) in H19-7 hippocampal cells (A). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs day-matched control group, † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , ††† $P < 0.001$  vs corresponding day 0 group. Percent maximum secreted E2 of control (B), GnRH-treated (C) and anastrozole-treated (D) in H19-7 hippocampal cells. Dark line represented the best-fitted sigmoid line (non-linear regression) in B and straight line (linear regression) in C and D. (n=5)

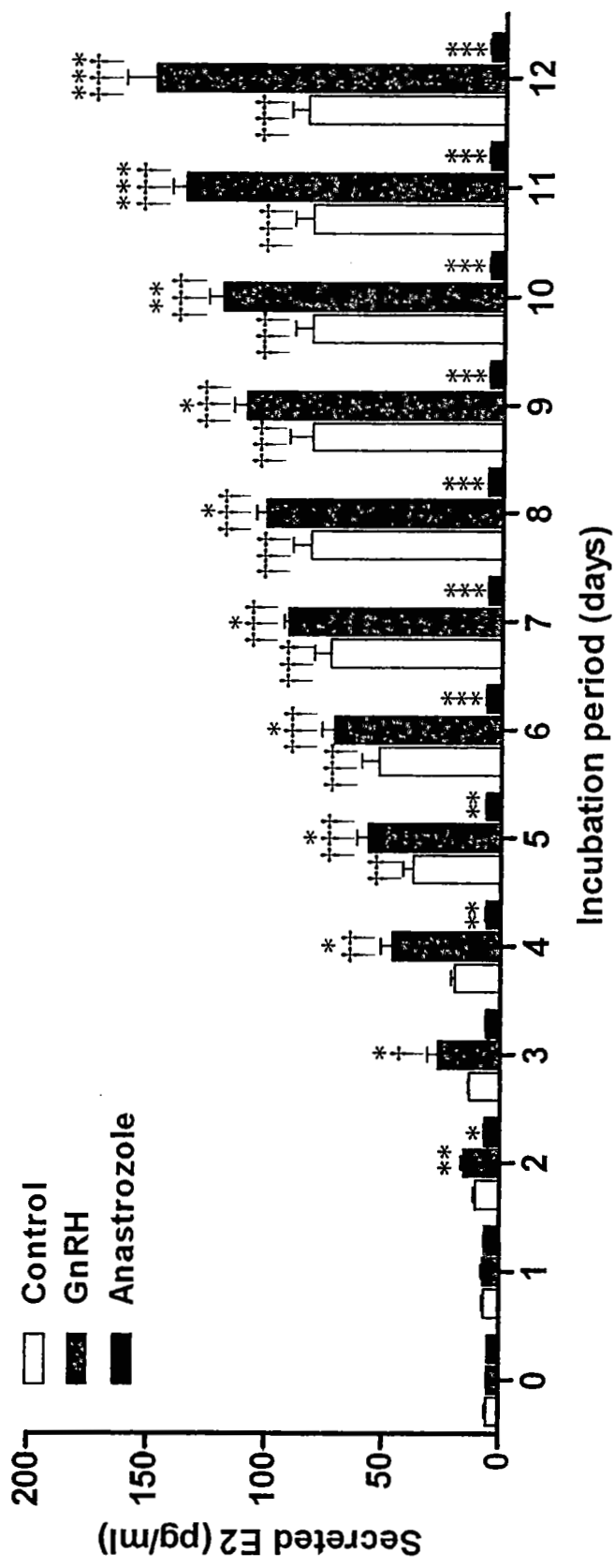
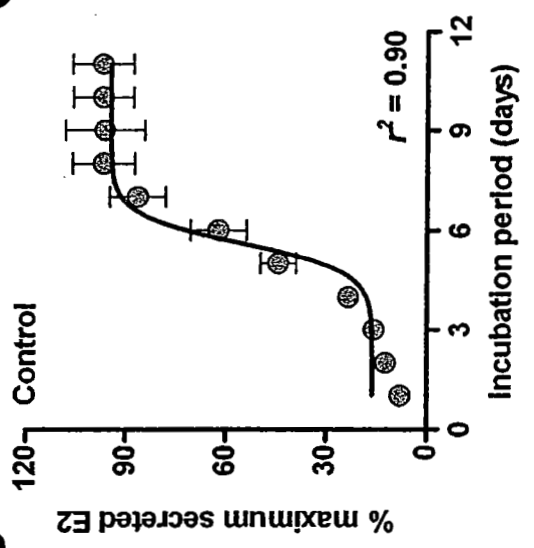
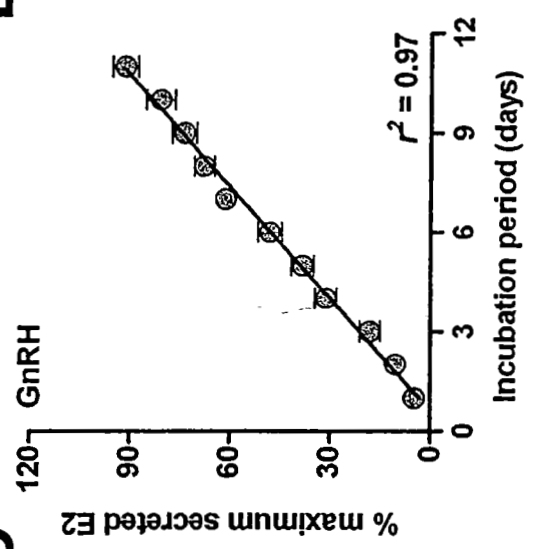
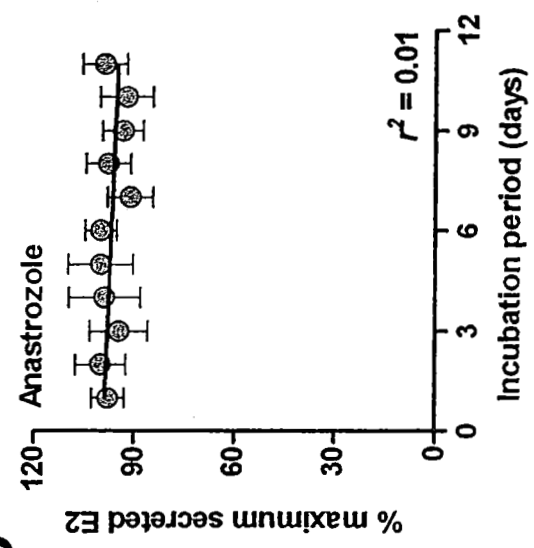
**Figure 2.** Endogenous H19-7 hippocampal E2 regulates ER $\beta$  expression. Representative immunofluorescent images of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression of control, and anastrozole-treated H19-7 hippocampal neurons (A). Red signal represented nuclear-staining and green signal represented ER $\alpha$  or ER $\beta$  (scale bars = 10  $\mu$ m). The number of ER $\alpha$  or ER $\beta$  positive green signal was counted and presented (B). Quantitative immunoblot analysis of ER $\alpha$  and ER $\beta$  proteins expression in control and anastrozole-treated H19-7 hippocampal neurons (C).  $\beta$ -actin was the housekeeping protein. \* $P < 0.05$  vs control group, † $P < 0.05$  vs anastrozole-treated group. (n=5)

**Figure 3.** The mechanism of local hippocampal E2 regulated ER $\beta$  expression. the quantitative immunoblot analysis of ER $\beta$  in control and 8 days-anastrozole exposed neuron (A). 100 nM PPT, 100 nM DPN, or 200 nM Wortmannin (Wort.) was added to the culture media of anastrozole-treated neuron in 7-8 days prior to harvested cells. Representative densitometric analysis of ER $\beta$  expression in H19-7 cells (B). Representative immunofluorescent image of ER $\beta$  (green signal) and nucleus (red signal)

of anastrozole and anastrozole plus DPN-treated cells (C). Scale bar = 10  $\mu$ M. B-actin was the housekeeping protein. \*\*\*  $p < 0.001$  vs control group.

**Figure 4.** The effect of endogenous E2 on exogenous E2-induced H19-7 hippocampal synaptic plasticity. Representative quantitative real-time PCR (A, B) and Western blotting analysis (C, D, E) of Arc and PSD-95 expression in H19-7 hippocampal neurons. Densitometric analysis of Arc (D) and PSD-95 (E) protein in H19-7 cells. GAPDH was the housekeeping mRNA in real-time PCR.  $\beta$ -actin was the housekeeping protein. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group. (n=5)

**Figure 5.** The effect of endogenous E2 on neuroprotective effect of exogenous E2. Representative cell viability data from MTT assay (A). Anti apoptotic Bcl<sub>2</sub> expression in H19-7 hippocampal neurons.  $\beta$ -actin was the housekeeping protein. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group. (n=5)

**A****B****C****D**

A

ER $\beta$

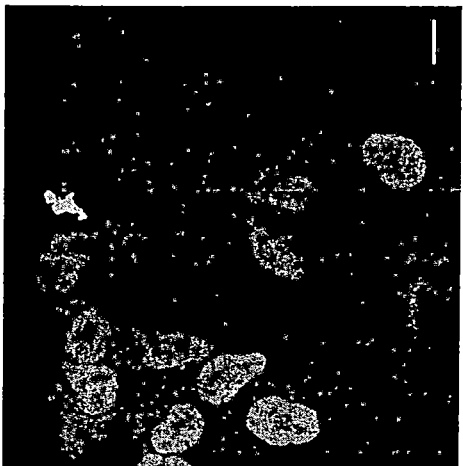
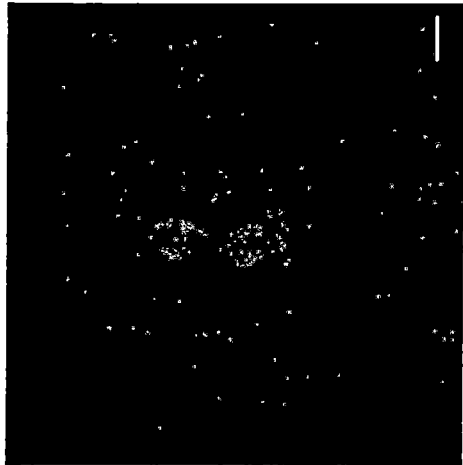
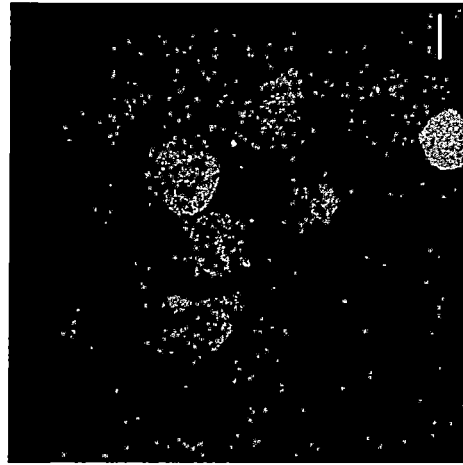
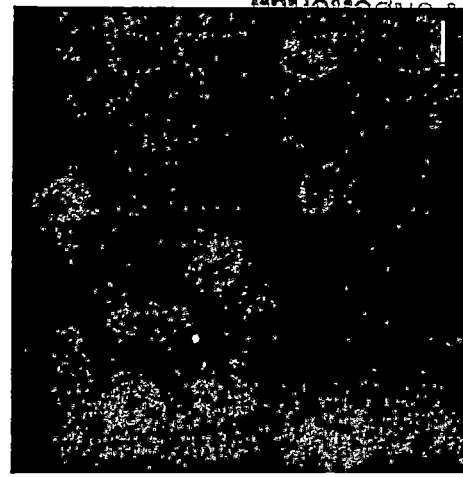
ER $\alpha$

Anastrozole

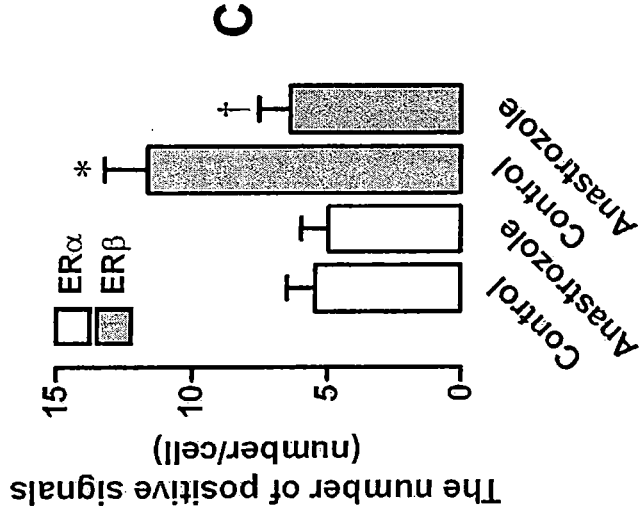
Control

Anastrozole

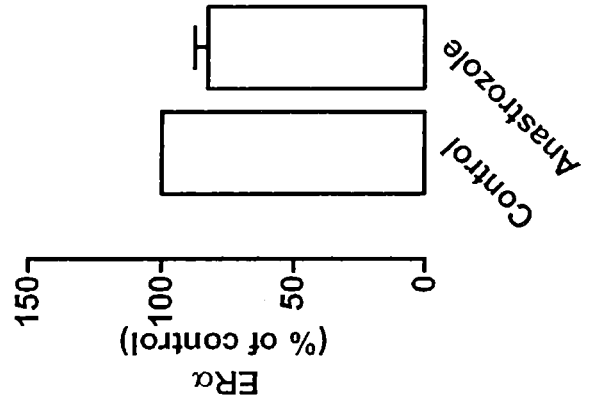
Control



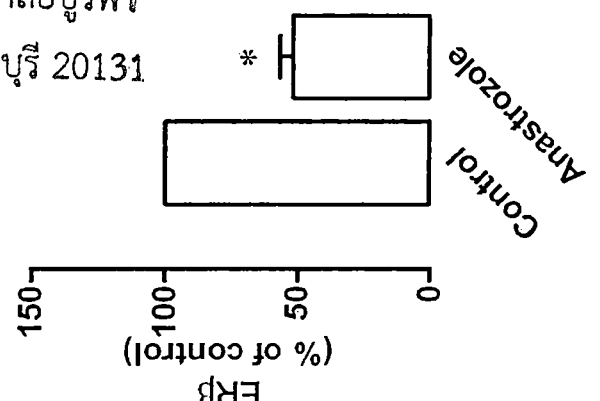
B



D



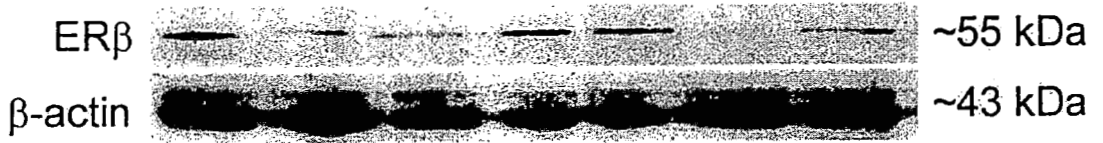
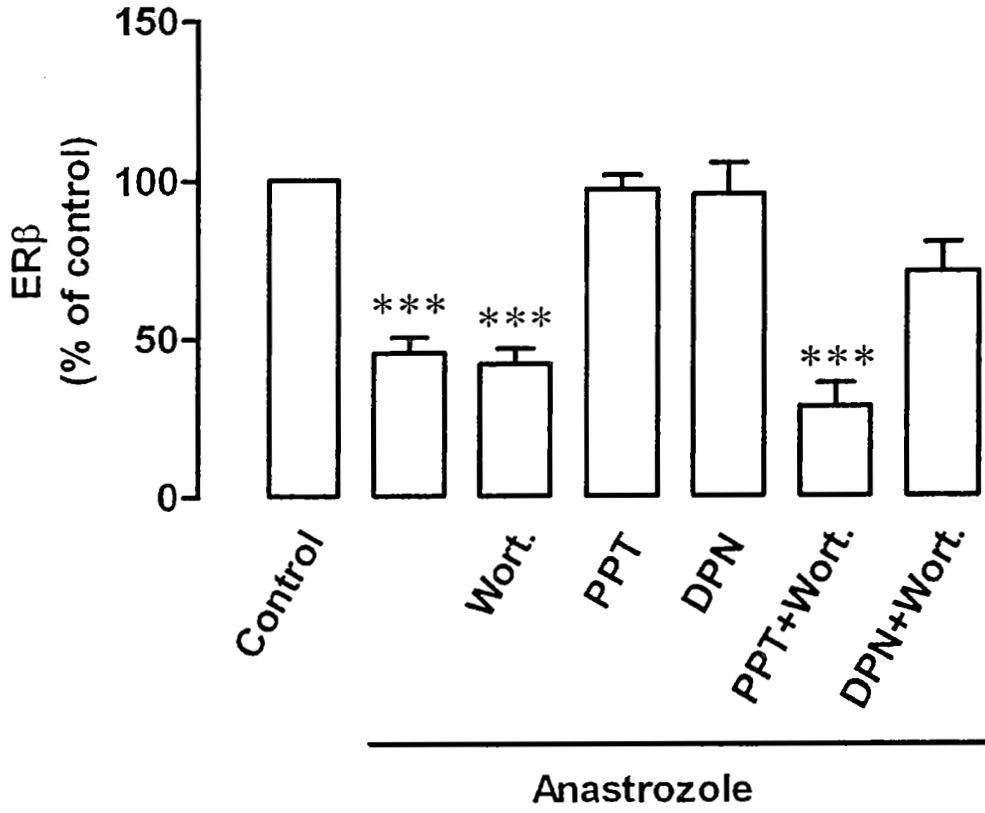
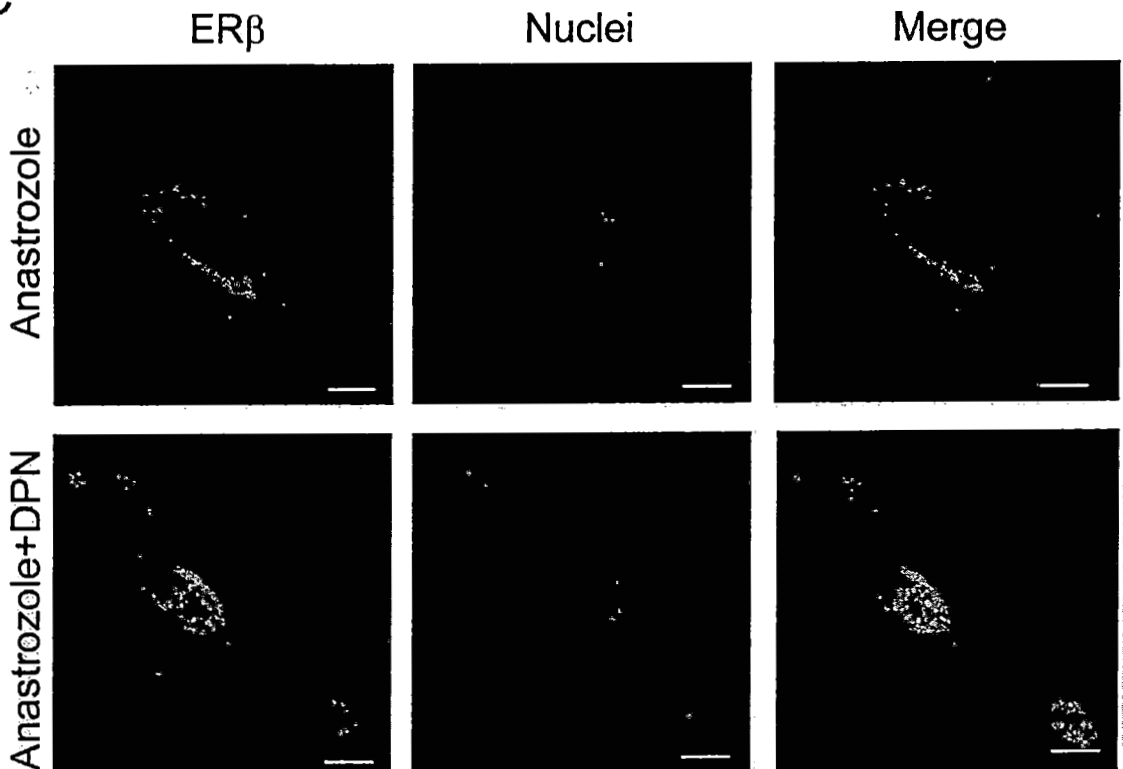
E

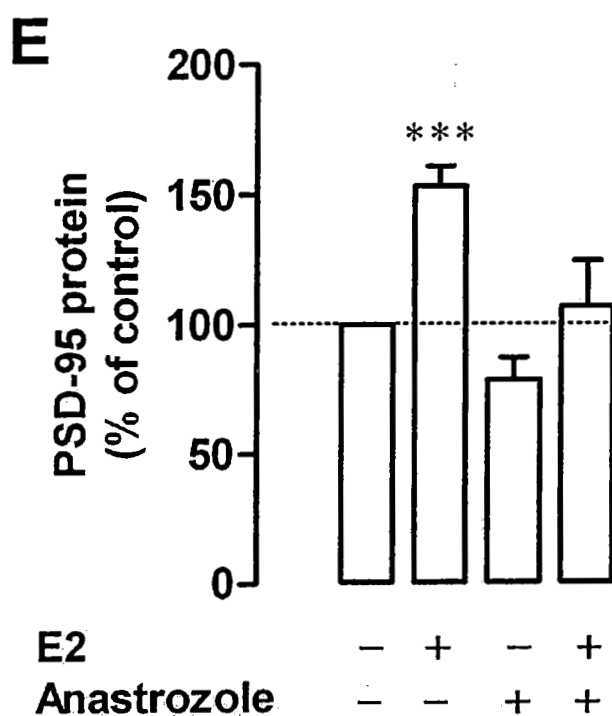
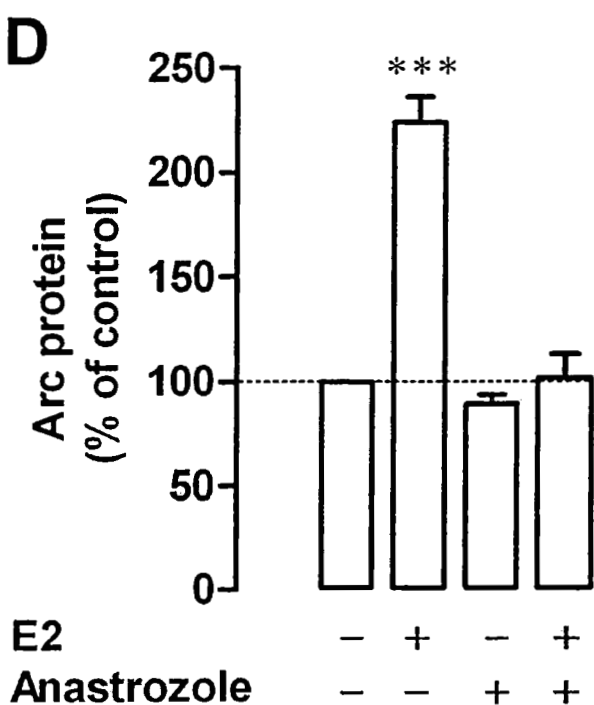
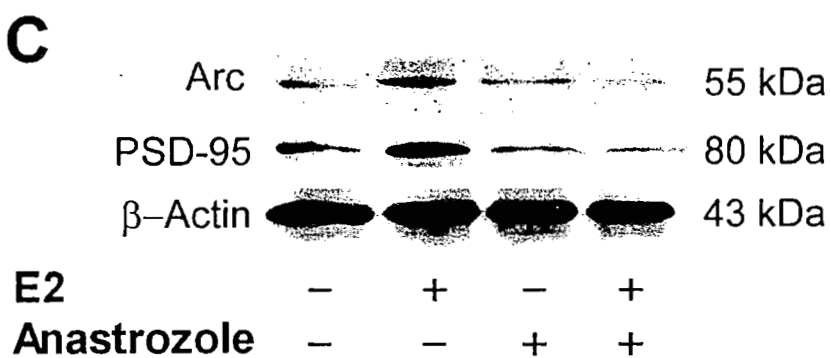
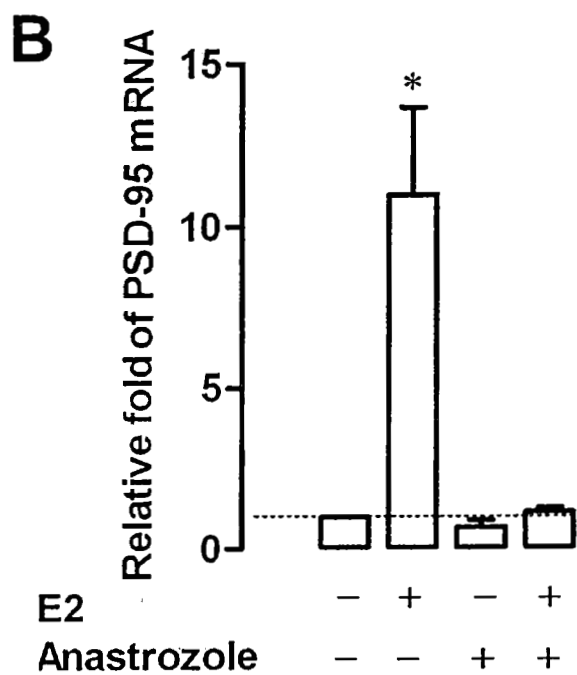
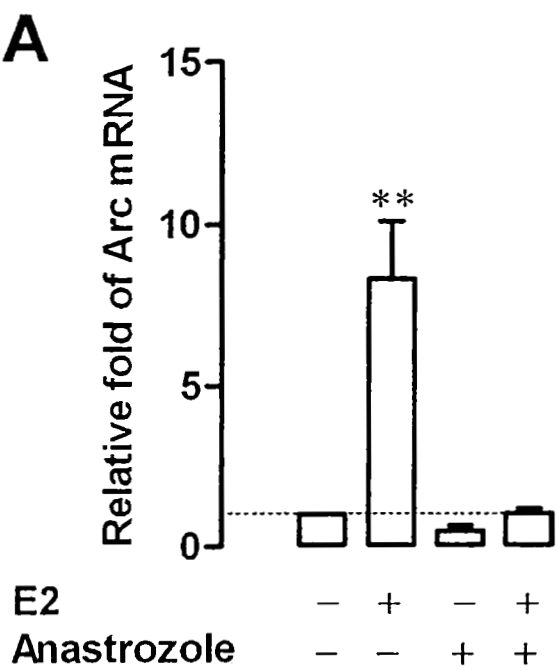


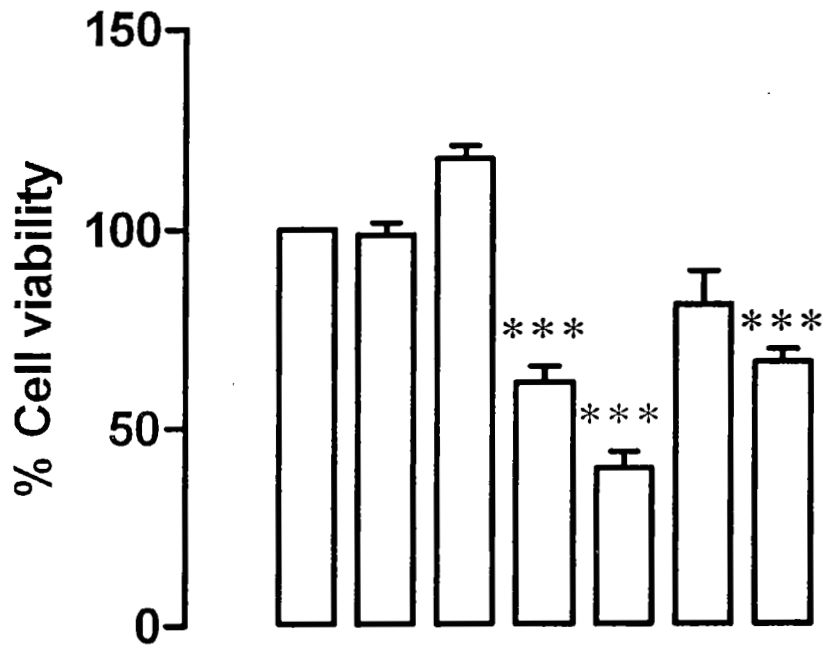
316537

616.8  
8/6/30

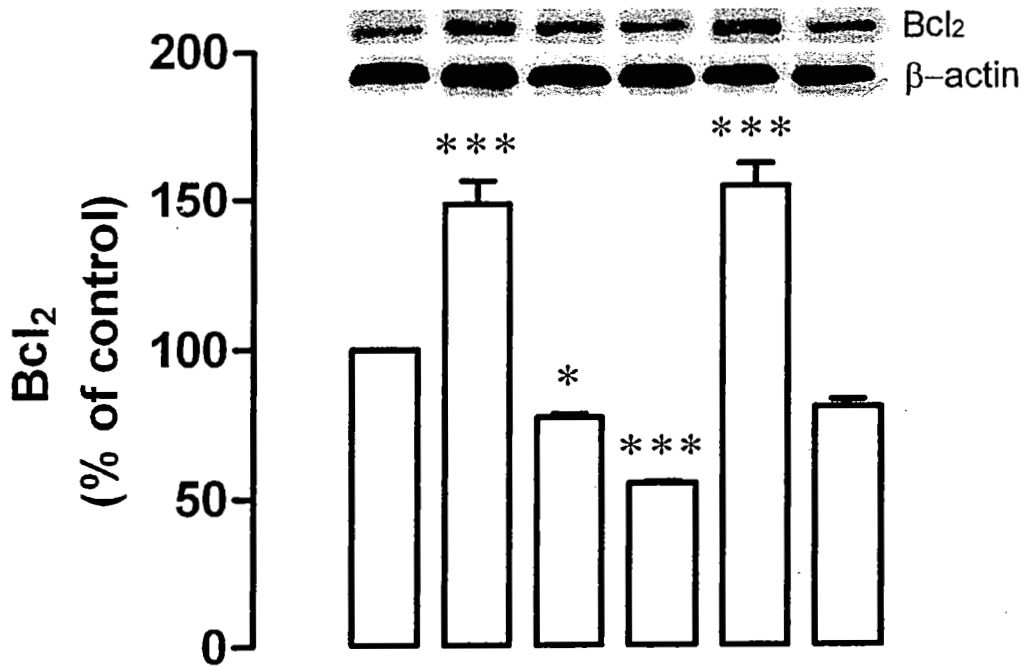


**A****B****C**



**A**

E2	-	-	+	-	-	+	+
Anastrozole	-	+	-	-	+	-	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	+	+	+	+

**B**

E2	-	+	-	-	+	+
Anastrozole	-	-	-	+	-	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	+	+	+	+

## Manuscript Review

### Author Information

Author ID                   chamniansawat  
Author Name                Siriporn Chamniansawat  
  
Corresponding  
Author                        Siriporn Chamniansawat  
Institute                    Burapha University  
Phone                        +66-38-393497  
E-mail                        siripornc@buu.ac.th

### Manuscript Information

Type                         Regular Article  
Title Of Article            A priming role of local E2 on exogenous E2-mediated synaptic  
                                  plasticity and neuroprotection  
Cover Letter  
Keywords                    estrogen receptor; exogenous estrogen; local estrogen; synaptic  
                                  plasticity; neuroprotection; hippocampal cell

### Review

Status                       to be reviewed after revision

Dear Dr. Siriporn ~~an~~<sup>am</sup>hamniansawat,

Please find the comments from editors and reviewers in the attached MS word file.

Please upload your revised manuscript and your response letter within 3 months of the date of this decision letter.

If you upload your manuscript after the time-limit, your manuscript will be regarded as new and will be reviewed again.

If you need more time for the revision, please ask the Editorial committee to extend the time-limit. This request should be placed one month before the due date.

Comment

If you have any questions, please feel free to contact us.

Sincerely yours,

Yun-hwan Jung  
Manager  
Experimental and Molecular Medicine  
Email: ksmb3@ksmb.or.kr

File                         [Chamniansawat manuscript adm Array.doc](#)

## บรรณานุกรม

- Carswell, H.V., Dominiczak, A.F., & Macrae, I.M. (2000). Estrogen status affects sensitivity to focal cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 278, H290-H294.
- Carswell, H.V., Macrae, I.M., Gallagher, L., Harrop, E., & Horsburgh, K.J. (2004). Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287, H1501-H154.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2009). Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 452, 130-135.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2010). Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 470, 49-54.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2012). A priming role of local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Experimental and Molecular Medicine* (Submitted).
- Do Rego, J.L., Seong, J.Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon, M.C., Pelletier, G., Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 259-301.
- Fang, H., Tong, W., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S., Xie, Q., Dial, S.L., Moland, C.L., & Sheehan, D.M. (2001). Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 280-294.
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., & Rune, G.M. (2011). Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 345, 285-294.

- Henderson, V.W. (2010). Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800, 1077-1083.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson J.A., & Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 15677-15682.
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., & Rune, G.M. (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Neuroscience*, 24, 5913-5921.
- McCullough, L.D., Blizzard, K., Simpson, E.R., Oz, O.K., & Hurn, P.D. (2003). Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *Journal of Neuroscience*, 23, 8701-8705.
- McEwen, B.S., & Alves, S.E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews*, 20, 279-307.
- Meng, Y., Wang, R., Yang, F., Ji, Z.J., Fang, L., & Sheng, S.L. (2010). Amyloid precursor protein 17-mer peptide ameliorates hippocampal neurodegeneration in ovariectomized rats. *Neuroscience Letters*, 468, 173-137.
- Miller, K.L. (1996). Hormone replacement therapy in the elderly. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 39, 912-932.
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., & Rune, G.M. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13, 226-234.
- Purohit, A., & Reed, M.J. (2002). Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids*, 67, 979-983.
- Raz, L., Khan, M.M., Mahesh, V.B., Vadlamudi, R.K., & Brann, D.W. (2008). Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 16, 140-153.

- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Taylor, J.A., & Lubahn, D.B. (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Hormones and Behavior*, 31, 232–243.
- Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simon, H., & Baulieu, E.E. (1995). Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 355–360.
- Saldanha, C.J., Duncan, K.A., & Walters, B.J. (2009). Neuroprotective actions of brain aromatase. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 106–118.
- Sherwin, B.B. (1994). Estrogenic effects on memory in women. *New York Academy of Sciences*, 743, 213–230.
- Shughrue, P.J., Scrimo, P.J., & Merchenthaler, I. (2000). Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ERalpha and ERbeta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*, 96, 41–49.
- Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J., Bodor, N., & Day, A.L. (1997). Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *Journal of Neurosurgery*, 87, 724–730.
- Smith, C.C., Vedder, L.C., & McMahon, L.L. (2009). Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1:S130–42.
- Ter Horst, G.J. (2010). Estrogen in the limbic system. *Vitam Horm*, 82, 319–338.
- Vegeto, E., Benedusi, V., & Maggi, A. (2008). Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 507–519.

- Wehrenberg, U., Prange-Kiel, J., Rune, G.M. (2001). Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1879-1886.
- Yague, J.G., Azcoitia, I., DeFelipe, J., Garcia-Segura, L.M., & Muñoz, A. (2010). Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Research*, 1315, 41–52.
- Zhou, L., Fester, L., von Blittersdorff, B., Hassu, B., Nogens, H., Prange-Kiel, J., Jarry, H., Wegscheider, K., & Rune, G.M. (2010). Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology*, 151, 1153–1160.