อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง

The expression of enzyme AChE in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 8 - มี.ค. 2557
เลขทะเบียน 1.668536
เลขเรียกหนังสือ QP 604 W1645 2556

โดย ผศ.ดร.แพรวพรรณ สุวรรณกิจ

รศ.ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล

สิงหาคม 2556

สัญญาเลขที่ R2555C060

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง

The expression of enzyme AChE in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.แพรวพรรณ สุวรรณกิจ
2. รศ.ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากหลายหน่วยงานดังนี้ ขอขอบคุณ ดร.จันทนา บุญรัตน์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำ Gel electrophoresis และการทำ Transfer และกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อนุมัติงบวิจัยประจำปีงบประมาณ 2555 ทำให้การดำเนินงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ผศ.ดร.แพรวพรรณ สุวรรณกิจ

รศ.ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล

บทคัดย่อ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	**การแสดงออกของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสใน** เซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง
(ภาษาอังกฤษ)	The expression enzyme AChE in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells
ชื่อผู้วิจัย	ผศ.ดร.แพรวพรรณ สุวรรณกิจ
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาเทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
หมายเลขโทรศัพท์	089-6393113
ชื่อผู้ร่วมวิจัย	รศ.ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
หมายเลขโทรศัพท์	081-7855993
แหล่งทุนที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนงานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ	2555
จำนวนเงิน	150,000 บาท
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2555 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2556

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ AChE protein และ AChE activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง วิธีการทดลองเซลล์ NG108-15 ในกลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะถูกเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน กลุ่มที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จะเติมสาร Dibutyryl cyclic AMP และ 12-o-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นสกัดโปรตีน ทำ Western blot เพื่อตรวจวัดปริมาณ AChE protein และวัด AChE activity โดยวิธีของ Ellman's method ผลการทดลองพบว่าปริมาณ AChE protein ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 แนวโน้มมีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างแต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วไม่ต่างกัน สำหรับปริมาณ AChE activity ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นงานวิจัยนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสารที่รักษาโรคอัลไซเมอร์ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เกี่ยวกับ AChE protein และ AChE activity

ส่วนที่ 3 บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The purpose of this study was to compare the expression of AChE protein and AChE activity in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells. Methods: The NG108-15 cells as undifferentiated cells were cultured for 1, 2 and 3 days. To induce neuronal differentiation, dibutyryl cAMP and 12-o-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate were added to the culture medium. Extraction protein and Western blot were performed for determination AChE protein. The AChE activity was done by Ellman's method. Results: The AChE protein in differentiated cells at day 2 and 3 tend to be increase but it was not significantly higher than the undifferentiated cells at the same day. The AChE activity in differentiated cells at day 2 and 3 was significantly higher than the undifferentiated cells at the same day. Conclusion: This in vitro model may be useful as a primary screening tool for potential AD therapeutic agents related to AChE protein และAChE activity.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อ	ข
ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย	ข
ส่วนที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย	ค
ส่วนที่ 3 บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
สมมุติฐานของโครงการวิจัย	3
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
เนื้อเรื่อง	4
วัสดุ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	4
วิธีการทดลอง	6
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล	9
ผลการทดลอง	16
ข้อวิจารณ์	21
สรุปและข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม	**24**

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	สรุปวิธีการเลี้ยงเซลล์และศึกษาการแสดงออกของ AChE protein โดยใช้เซลล์ NG108-15	10
รูปที่ 2	วิธีการสกัดโปรตีนเพื่อหา AChE protein จากเซลล์ NG 108-15	11
รูปที่ 3	การทำ Gel electrophoresis สำหรับโปรตีน	12
รูปที่ 4	การย้ายโปรตีน	13
รูปที่ 5	การแช่ Antibody และการประกบฟิลม์	14
รูปที่ 6	สรุปวิธีการเลี้ยงเซลล์และศึกษาการแสดงออกของ AChE activity โดยใช้เซลล์ NG108-15	15
รูปที่ 7	แสดงลักษณะของเซลล์ NG108-15 กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างและกลุ่มที่ทำให้ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	17
รูปที่ 8	ปริมาณ GAPDH protein ในเซลล์ NG108-15 หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน	18
รูปที่ 9	ปริมาณ AChE protein ในเซลล์ NG108-15 หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน	19
รูปที่ 10	ปริมาณ AChE Activity ในเซลล์ NG108-15 หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน	20

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Alzheimer's disease (AD) เป็นโรคที่เกิดในผู้สูงอายุ พยาธิสภาพของโรคพบว่ามีการสะสมของ β-Amyloid plaques ภายนอกเซลประสาทและเกิด Neurofibrillary tangles ภายในเซลประสาท นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดลงของเนื้อสมองและมีการสูญเสียเซลล์ประสาทโดยเฉพาะที่สมองส่วน Hippocampus และ basal forebrain ซึ่งเป็นสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทหลายชนิด สารสื่อประสาทที่ลดลงอย่างมากคือ Acetylcholine (ACh) โดยพบการสูญเสียเซลล์ประสาท Cholinergic ในสมองส่วน basal forebrain nuclei หรือ nuclear basalis of Meynert และ medial septal nuclear กับdiagonal band of Broca ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของ Cholinergic pathway ที่จะส่งกระแสประสาทไปยังสมองส่วนที่ทำหน้าที่ในการเรียนรู้และความจำ ได้แก่ neocortex และ hippocampus (Whitehouse et al., 1982) (Vogel, et al., 1990) จากพยาธิสภาพดังกล่าวทำให้ระดับของ ACh และ cholinergic markers ต่างๆ เช่น เอนไซม์ Choline acetyltransferase (CAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ACh และ AChE activity ลดลง (Gil-Bea, et al., 2005)

ACh เป็นสารสื่อประสาทที่หลั่งมาจากปลายประสาทจากสารตั้งต้น 2 ตัวคือ acetyl CoA และ choline โดยมีเอนไซม์ choline acetyl transferase (CAT) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนี้

$$\text{Acetyl CoA + choline} \xrightarrow{\text{CAT}} \text{Acetylcholine + CoA}$$

ACh จะถูกปล่อยจาก vesicles และไปจับกับ postsynaptic membrane และถูกทำลายโดยเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) โดยที่ AChE จะไปทำลายเอนไซม์ ACh ให้เป็น acetate และ Choline ดังนี้

$$\text{Acetylcholine} \xrightarrow{\text{AChE}} \text{acetate + choline}$$

AChE มีคุณสมบัติ catalytic activity เป็นอย่างมาก พบส่วนใหญ่ที่ neuromuscular junctions และcholinergic synapses ในระบบประสาทส่วนกลาง โดยที่ AChE 1 โมเลกุลสามารถทำลายเอนไซม์ ACh 2,500 โมเลกุลต่อวินาที ได้ Choline และ acetate

เซลล์ NG108-15 cells ซึ่งเป็นเซลล์ลูกผสมระหว่าง mouse neuroblastoma (N18TG-2) และ rat glioma (C6BU-1) (Tohda and Nomura, 1988) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเลี้ยงง่าย

เซลล์มีรูปร่างเหมือนกันทุกเซลล์และเป็นเซลล์ที่มีการใช้ทดลองศึกษาหลายรูปแบบ มีการศึกษา NG108-15 cells พบว่าเซลล์นี้มี endogenous CAT activity สามารถสร้างและหลั่ง Acetylcholine เมื่อเลี้ยงเซลล์นี้ร่วมกับเซลล์กล้ามเนื้อจะมีการสร้าง Synapse (Nelson, Christian, and Nirenberg, 1976) เซลล์ NG108-15 ยังใช้ศึกษาถึงคุณสมบัติของ opioid receptor-like receptor (ORL_1) (Ma, et al., 1997), $5HT_{2C}$ receptor (Sukma, Tohda, and Watanabe, 2003) and $5HT_3$ receptor (Ronde and Nichols, 2001) ดังนั้นจึงคาดว่า NG108-15 cells น่าจะใช้ศึกษาหาปริมาณ AChE ได้ในการทดลองนี้ เนื่องจากรูปร่างลักษณะของ NG108-15 cells ต่างกัน กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ประสาท (undifferentiation) จะมีรูปร่างแบน กลม ไม่เหมือนเซลล์ประสาท กลุ่มที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ประสาท (differentiation) จะมีรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาท การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 พบว่าการแสดงออกของ AChE mRNA ในกลุ่มที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ประสาท (differentiation) จะมีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ประสาท (undifferentiation) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 2 (Suwanakitch et al., 2008) อย่างไรก็ตามเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาถึง AChE protein และ AChE enzyme activity ดังนั้นคณะวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของ AChE protein และ AChE enzyme activity ว่ามีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากที่ศึกษาใน AChE mRNA หรือไม่โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15

Cholinesterase inhibitors เป็นยากลุ่มแรกที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในสหรัฐอเมริกาและยุโรปในการรักษาอาการของโรคอัลไซเมอร์ ยากลุ่มนี้ทำให้การเรียนรู้ สติปัญญาและความทรงจำของผู้ป่วย AD ดีขึ้น เนื่องจากยาไปลดการทำลาย ACh จากการยับยั้งเอนไซม์ Cholinesterase ทำให้การดำเนินของโรคช้าลง ยาตัวแรกที่ใช้ได้แก่ Tacrine แต่มีพิษต่อตับทำให้การใช้ลดลง (Watkins et al., 1994) ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้ตัวอื่นที่นิยมใช้ได้แก่ Donopezil, Rivastigmine และ Galantamine (Scarpini et al., 2003) การศึกษาของ AChE protein และ AChE enzyme activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 น่าจะเป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการศึกษาหาสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการลดการทำลายของเอนไซม์ AChE ในผู้ที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ในงานวิจัยอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ AChE protein และเปรียบเทียบ AChE enzyme activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการวิจัยแบบทดลองโดยศึกษารูปแบบการแสดงออกของ AChE โปรตีนและ AChE enzyme activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง

สมมุติฐานของโครงการวิจัย

สมมุติฐานในการทดลองนี้ คือปริมาณของ AChE protein และคุณสมบัติของ AChE enzyme activity ในเซลล์ปกติและเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างจะมีความแตกต่างกัน

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

NG108-15 cells ได้ถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยต่างๆดังต่อไปนี้ Nelson และ Nirenberg (1976) พบว่าเซลล์นี้มี endogenous CAT activity สามารถสร้างและหลั่ง Acetylcholine และเมื่อเลี้ยงเซลล์นี้ร่วมกับเซลล์กล้ามเนื้อจะมีการสร้าง Synapse นอกจากนี้เซลล์ NG108-15 ยังใช้ศึกษาถึงคุณสมบัติของ opioid receptor-like receptor (ORL_1) (Ma, et al., 1997), $5HT_{2C}$ receptor (Sukma, Tohda, and Watanabe, 2003) และ $5HT_3$ receptor (Ronde and Nichols, 2001) อีกด้วย การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 พบว่าการแสดงออกของ AChE mRNA ภายหลังการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ประสาท (differentiation) จะมีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Suwanakitch et al., 2008) นอกจากนี้เซลล์ NG108-15 ยังมีคุณสมบัติที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เซลล์มีลักษณะที่เหมือนกันทุกเซลล์ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึง AChE protein และ AChE enzyme activity ในผู้ที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ เนื่องจากยาที่ใช้รักษา AD จะไปยับยั้งการทำลายของเอนไซม์ AChE หรือกระตุ้นให้มีการสร้าง AChE เพิ่มขึ้น ดังนั้นเซลล์นี้จึงน่าจะมีประโยชน์นำมาใช้ศึกษาปริมาณของ AChE protein และคุณสมบัติของ AChE enzyme activity ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำผลการทดลองที่ได้ไปศึกษาหาสมุนไพรที่ยับยั้งการสร้าง AChE protein ในระดับโมเลกุลและหาสมุนไพรที่ยับยั้งการทำงานของ AChE enzyme activity
2. การเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการ

เนื้อเรื่อง

วัสดุ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย มีดังต่อไปนี้

วัสดุ ได้แก่

- Amersham hybondTM-P (PVDF transfer membrane) (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK)
- Amersham hyperfilmTM ECL (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK)
- Culture flask (Nunc A/S, Roskilde, Denmark)
- HybondTM blotting paper (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK)
- Millipore express® membrane 0.22 µm (Millipore corporation, Bedford, USA)
- 96 well plate (Greiner bio-one, Solingen Germany)

สารเคมี ได้แก่

- Acetylthiocholine-iodide (ATCI) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- 30% Acrylamide/Bis solution, 19 : 1 (5% C) (Bio-Rad, California, USA)
- Ammonium persulfate (Bio-Rad, California, USA)
- Dibutyryl cyclic AMP (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- di-Sodium hydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 5,5'-dithiobis-(2 nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- Dulbecco's Medified Eagle Medium (Invitrogen, California, USA)
- ECL plus western blotting detection reagents (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK)
- Foetal bovine serum (Invitrogen, California, USA)
- Glycine (Bio-Rad, California, USA)
- HAT supplement (50x) (Invitrogen, California, USA)
- 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad, California, USA)
- Methanol (RCI Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Phorbol 12-myristate 13- acetate (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit
- Ponceau S solution (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- Potassium chloride (RFCL, New delhi, India)

- Potassium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- Precision plus proteinTM standard (Bio-Rad, California, USA)
- Quant-iT™ protein assay kit (Invitrogen, California, USA)
- SimplyblueTM safe stain (Invitrogen, California, USA)
- Sodium chloride (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Sodium dodecyl sulfate ((Bio-Rad, California, USA)
- Sodium hydrogen carbonate (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sterile water (Thai Otsuka Pharmaceutical, Samutsakorn, Thailand)
- TEMED (Fisher Scientific International, New Hampshire, USA)
- Tris [hydroxymethyl] aminomethane (USB Corporation, Ohio, USA)
- Trypan blue stain 0.4% (Invitrogen, California, USA)
- UltraPureTM Tris (Invitrogen, California, USA)

เครื่องมือ ได้แก่

- Balance (Mettler-Toledo, Leicester, England)
- Centrifuge (Heraeus Sepatech, Michigan, USA)
- CO_2 Incubator (Shel Lab, Oregon, USA)
- Digital Dry Bath (Labnet International, New Jersey, USA)
- Electrophoresis Power Supply (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK)
- EnSpire™ Microplate Reader (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland)
- Heat and stirrer (Barnstead, Iowa, USA)
- Hemocytometer (Boeco, Hamburg, Germany)
- Hot air oven (Memmert, Schwabach, Germany)
- Gel documentation (Bio-Rad, California, USA)
- Centrifuge (Abbott Laboratories, Illinois, USA)
- Laminar Flow (NuAire, Minnesota, USA)
- Microprocessor pH meter (Missenschaftlich – Technische Werkstatten, Weilheim, Germany)
- Microscope (Nikon, Tokyo, Japan)

- Pipette controllers (Jencons (Scientific), Bedfordshire, England)
- Power supply (Bio-Rad, California, USA)
- Shaker (Major Science, California, USA)
- Spectrophotometer (Varian Australia, Victoria, Australia)
- Stirring hotplate (Barnstead, Iowa, USA)
- Vortex (Scientific Industries, New York, USA)
- Water-bath (Lauda, Lauda-Königshofen, Germany)

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท NG108-15

เซลล์ NG108-15 จะถูกเพาะเลี้ยงในขวดพลาสติกภายในบรรจุ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และเติมสาร HAT ซึ่งประกอบด้วย 0.1 mM Hypoxanthine, 10.8 µM Aminopterine, 0.016 mM Thymidine และ 4% Foetal bovine serum (FBS) เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ CO_2 5% (Tohda et al., 1991) เซลล์ถูกแบ่งไปเลี้ยงจำนวน 3 x 10^5 เซลล์ต่อขวด เลี้ยงไว้ 1 วันหลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ในเซลล์กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์จะถูกเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน วิธีการเลี้ยงเซลล์สรุปดังรูปที่ 1 ในเซลล์กลุ่มที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จะเติมสาร Dibutyryl cyclic AMP (Bt_2cAMP) 1 mM และ Phorbol 12-myristate 13- acetate (TPA) 100 nM ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ สรุปวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ NG108-15 ดังรูปที่ 1

2. การศึกษาปริมาณของ AChE protein

2.1 วิธีการสกัดโปรตีน

นับจำนวนเซลล์ที่นำมาจากขวดพลาสติกและย้ายมาใส่ในหลอดทดลอง นำหลอดทดลองไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาทีเทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติม PBS (Phosphate buffer saline) 1 ซีซี เพื่อล้างเซลล์ และย้ายมาใส่ใน eppendorf นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง การสกัดโปรตีนสามารถทำได้โดยใช้เซลล์ NG108-15 จำนวน 1 x 10^6 เซลล์ เติมสาร RIPA buffer 100 µl และ Protease inhibitor 0.1 µl แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนที่เป็นน้ำใส ๆ คือโปรตีนไปใส่ที่ eppendorf ใหม่ วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Quant-iT™ protein assay kit วิธีการสกัดโปรตีนสรุปดังรูปที่ 2

2.2 การทำ Gel electrophoresis

การทำเจลจะทำเป็น 2 ชนิดคือ Separating gel และ Loading gel, Separating gel จะใช้ Polyacrylamide ที่ความเข้มข้น 10% ซึ่งสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10-150 kDa ส่วนประกอบมีดังนี้ น้ำกลั่น (Deionized water) 4 ซีซี 30% Acrylamide/bis solution 19:1 3.3 ซีซี Tris 1.5 M pH 8.8 2.5 ซีซี Sodium dodecyl sulfate (SDS) 100 µl 10% Ammonium persulfate (APS) 100 µl และเติม TEMED 4 µl ตัวสุดท้ายเขย่าให้เข้ากัน เทเจลลงในกระจก 2 แผ่นที่ประกบกันทิ้งไว้นาน 15 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว สำหรับ Loading gel จะใช้ Polyacrylamide ที่ความเข้มข้น 4% โดยมีส่วนผสมคือน้ำกลั่น (Deionized water) 3.05 ซีซี 30% Acrylamide/bis solution 19:1 650 µl Tris 0.5 M pH 6.8 1.25 ซีซี SDS 50 µl 10% APS 50 µl และเติม TEMED 5 µl ตัวสุดท้ายเขย่าให้เข้ากัน เทเจลลงบน Seaprating gel ใส่หวี ทิ้งเจลไว้นาน 1 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัวและเอาหวีออก เท Running buffer ในกล่องเจล หลังจากนั้นหยอดโปรตีน 20 µg Marker 3 µl ตั้งเครื่องที่ 30 mA 40 นาที หลังจากโปรตีนเคลื่อนผ่าน Loading gel แล้วปรับเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 50 mA นาน 1.5 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งสีเคลื่อนลงมาที่ด้านล่างของเจล วิธีการทำ Gel electrophoresis สรุปดังรูปที่ 3 การทดสอบดูว่าโปรตีนอยู่ที่เจลหรือไม่ โดยการย้อมสี Coomasie ลงบนเจล

2.3 การย้ายโปรตีนจากเจลไปที่ PVDF membrane

การย้ายโปรตีนสามารถทำได้โดยวิธี wet หรือ semi-dry การทดลองนี้ใช้วิธี Wet เพราะว่าโปรตีนมีขนาดใหญ่มากกว่า 100 kDa มีขั้นตอนดังนี้ เจลแช่ใน Towbin buffer ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที PVDF membrane แช่ใน Methanol นาน 2 นาทีล้างในน้ำกลั่นและแช่ใน Towbin buffer ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที กระดาษกรองแช่ใน Towbin buffer ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ประกบเจลและ PVDF memebrane เข้าด้วยกันให้แน่นในกล่องโดยไม่ให้มีฟองอากาศ การประกบเจลให้วางเป็นชั้นดังนี้ ฟองน้ำ / กระดาษกรอง / เจล / PVDF membrane / กระดาษกรอง / ฟองน้ำ ด้านเจลให้วางใกล้ขั้วลบ PVDF membrane ให้วางใกล้ขั้วบวก ตั้งเครื่องที่ 25 volts นาน 55 นาที ดังรูปที่ 4 การตรวจสอบว่าโปรตีนได้ย้ายมาที่ PVDF membrane หรือไม่ ทำได้โดยล้าง membrane ด้วย TBST แช่และเขย่าใน 2% Ponceau S นาน 5 นาที หลังจากนั้นล้าง membrane ด้วยน้ำกลั่นจะสามารถมองเห็นแถบโปรตีนได้อย่างชัดเจน

2.4 ขั้นตอนการ Blocking membrane

การ Blocking membrane มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเกิด non-specific background โดยการนำ PVDF membrane แช่ 8% nonfat dry-PBST buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียสทิ้งไว้ 1 คืน การเตรียม 8% nonfat dry-PBST buffer ทำได้โดยชั่งนมผง 8 กรัมละลายใน PBST 100 ซีซี

2.5 การแช่ Primary antibody

หลังจากผ่านขั้นตอนการ Blocking membrane แล้ว ล้าง membrane ด้วย PBST นำ membrane แช่ใน AChE primary antibody (Rabbit, Polyclonal Antibody, MW 82 kDa) ที่ความเข้มข้น 1:300 ใน PBST นาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าตลอดเวลา โดยใช้ GAPDH primary antibody (Mouse, Monoclonal Antibody, MW 36 kDa) เป็นตัวควบคุม หลังจากนั้นล้าง membrane ด้วย PBST buffer นาน 5 นาที 3 ครั้งโดยเขย่าตลอดเวลา

2.6 การแช่ Secondary antibody

นำ membrane แช่ใน secondary antibody ที่ความเข้มข้น 1:10,000 ใน PBST นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นล้าง membrane ด้วย PBST buffer นาน 5 นาที 3 ครั้งโดยเขย่าตลอดเวลา

2.7 วิธีการ Development

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนจะใช้หลักการ Chemiluminescent ทำให้มองเห็นความสว่างที่เกิดขึ้นโดยใช้ตามข้อแนะนำของบริษัท Amersham โดยใช้ Solution A และ Solution B ในอัตราส่วน 40:1 (Solution A 500 µl + Solution B 12.5 µl ต่อ membrane 1 แผ่น) วาง blot ในภาชนะและใส่ Substrate ให้ทั่วทิ้งไว้นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำ Blot วางบนพลาสติกไล่อากาศออก ประกบกับฟิลม์ในห้องมืดนาน 10 นาที วิธีการทำสรุปดังรูปที่ 5 ตรวจวัดปริมาณโปรตีนจากการถ่ายรูปความเข้มของ band ที่อยู่บนฟิลม์และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (ImageJ) อ่านค่าความเข้มที่ปรากฏ

3. การศึกษาปริมาณของ AChE enzyme activity

3.1 วิธีการสกัดโปรตีน

นับจำนวนเซลล์ที่นำมาจากขวดพลาสติกและย้ายมาใส่ในหลอดทดลอง นำหลอดทดลองไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาทีเทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติม PBS (Phosphate buffer saline) 1 ซีซี เพื่อล้างเซลล์ และย้ายมาใส่ใน eppendorf นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง การสกัดโปรตีนสามารถทำได้โดยใช้เซลล์ NG108-15 จำนวน 1 x 10^5 เซลล์ เติมสาร RIPA buffer 100 µl หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนที่เป็นน้ำใส ๆ (supernatant)

ไปใส่ที่ eppendorf ใหม่ เพื่อใช้วัด AChE activity จากเซลล์ NG108-15 วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Pierce™ BCA Protein Assay Kit วิธีการสกัดโปรตีนสรุปดังรูปที่ 6

3.2 การวัด AChE activity

การวัด AChE activity ใช้วิธีของ Ellman's method ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เติม 50 mM PBS 260 µl ลงใน 96 well plate หลังจากนั้นเติม Acetylthiocholine-iodide (ATCI) ความเข้มข้น 30 mM ปริมาณ 10 µl/well เติม 5,5'-dithiobis-(2 nitrobenzoic acid) (DTNB) ความเข้มข้น 10 mM ปริมาณ 10 µl/well และเติม supernatant ปริมาณ 20 µl/well เป็นตัวสุดท้าย ปริมาณทั้งหมด 300 µl เซทเครื่อง Microplate reader ระบุตำแหน่งที่ต้องการให้อ่านค่าใน well plate โดยให้ Shake เป็นเวลา 10 วินาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ตั้งค่าการวัดการดูดกลืนแสงเป็น kinetic ทุก 10 วินาที ปฏิกิริยาทั้งหมดใช้เวลาไม่เกิน 10 นาที โดยวัดซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) คำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง / นาที จากเครื่อง Microplate reader นำค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง / นาที ที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราการทำงานของเอนไซม์จากสูตร (Ellman, et al., 1961)

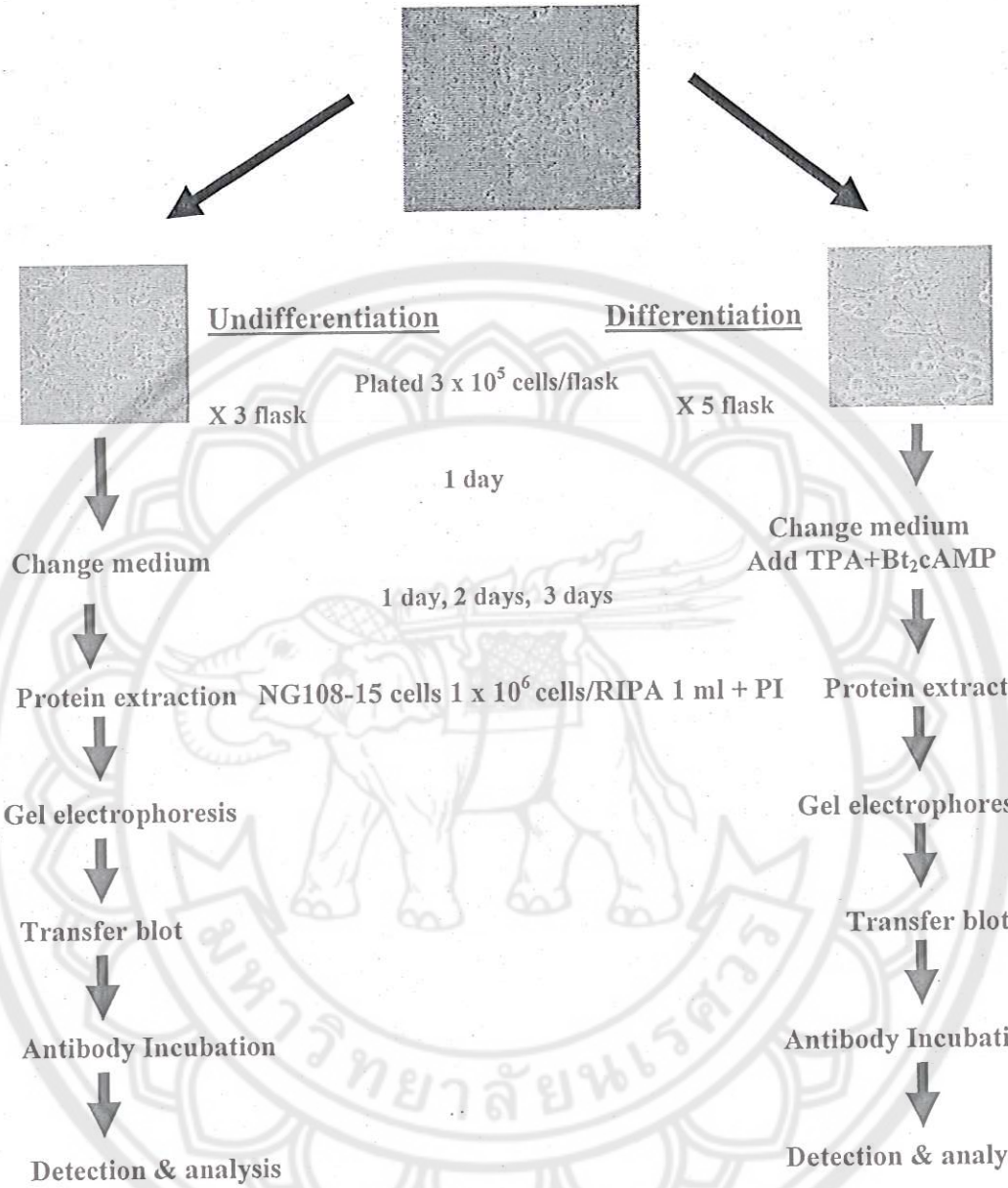
$$\text{อัตราการทำงานของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง / นาที} \times 0.3 \text{ ml}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)} \times 13{,}600}$$

อัตราการทำงานของเอนไซม์ แสดงหน่วยเป็น

nmole of acetylcholine iodide hydrolyzed/minute/mg of protein

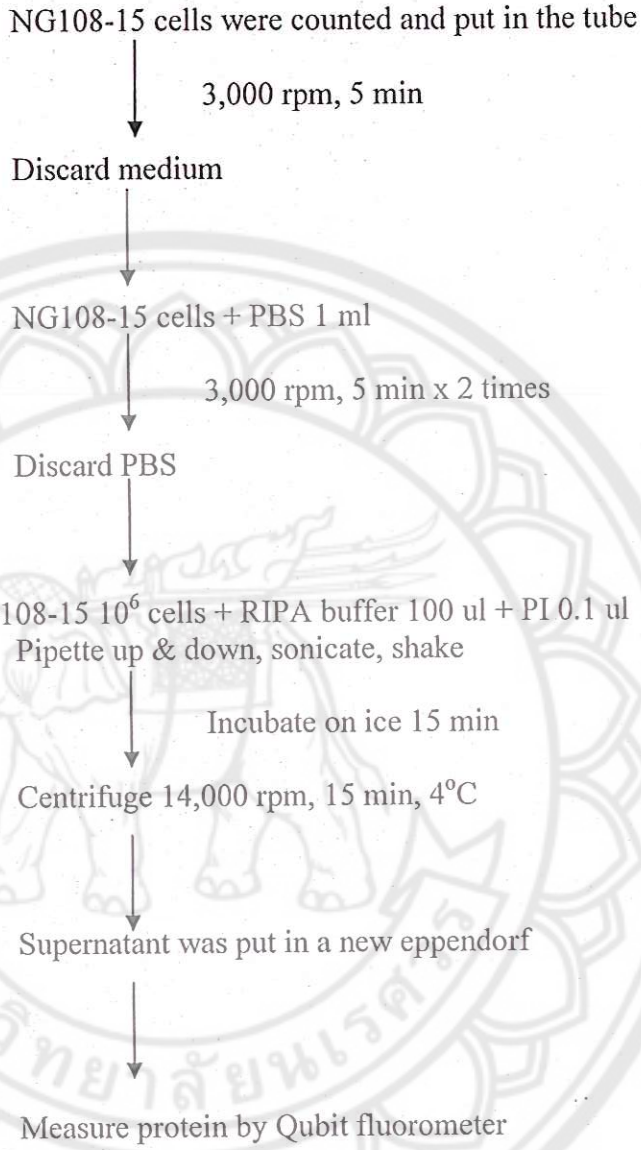
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะอ่านเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of mean) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ Student' t-test ค่า $P \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



เซลล์ NG108-15 จะถูกเลี้ยงไว้ 1 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 1, 2 และ 3 วัน กลุ่มที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะเติมสาร Bt_2cAMP และ TPA จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 1, 2 และ 3 วัน หลังจากนั้นสกัดโปรตีนโดยใช้ RIPA buffer และ Protease inhibitor ทำ Gel electrophoresis ย้ายโปรตีนจากเจลไปที่ PVDF membrane และแช่ Antibody ใช้สารที่เรืองแสงเป็นตัวจับกับ Antibody และนำไปประกบฟิลม์

รูปที่ 1 สรุปวิธีการเลี้ยงเซลล์และศึกษาการแสดงออกของ AChE protein โดยใช้เซลล์ NG108-15



วิธีการสกัดโปรตีนจากเซลล์ NG108-15 ใช้ RIPA buffer และ Protease inhibitor วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Qubit fluorometer

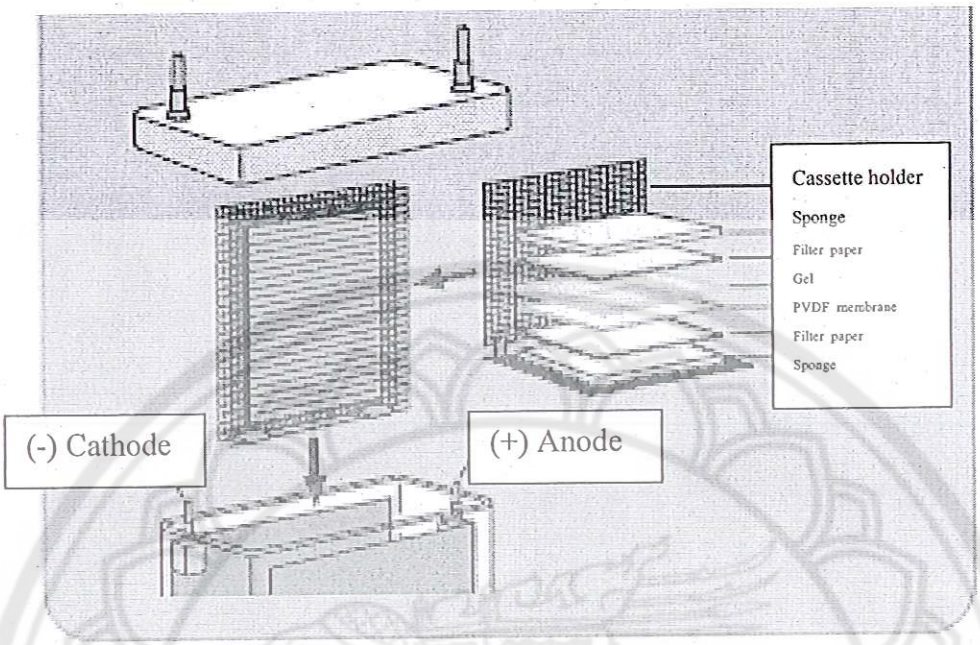
รูปที่ 2 วิธีการสกัดโปรตีนเพื่อหา AChE protein จากเซลล์ NG108-15

Separating gel 10% 4,000 µl DI water
3,300 µl 30% Acrylamide/Bis solution, 19 : 1
2,500 µl Tris 1.5 M pH 8.8
100 µl 10% SDS
100 µl 10% Ammonium persulfate
4 µl TEMED
↓ Swirl gently
Pour the gel
↓ Leave for 15 min

Loading gel 4% 3,050 µl DI water
650 µl 30% Acrylamide/Bis solution, 19 : 1
1,250 µl Tris 0.5 M pH 6.8
50 µl 10% SDS
50 µl 10% Ammonium persulfate
5 µl TEMED
↓ Swirl gently
Pour the gel and insert a comb
↓ Leave for 1 hr
Apply sample onto the gel
↓ Marker 3 µl
↓ Sample 20 µg
Run at 30 mA for 40 min, increase to 50 mA for 1.30 hr
↓
Until the front line reach the bottom

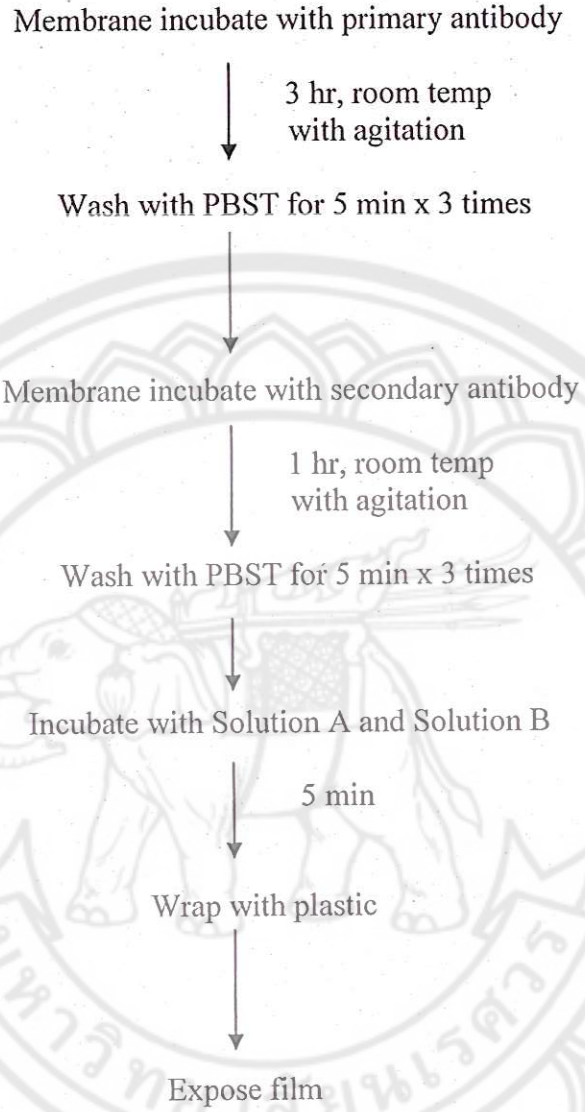
10% Separating gel เทในกระจกที่ประกบกันทิ้งไว้นาน 15 นาที หลังจากนั้นเท 4% Loading gel ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง หยอดโปรตีนและ marker ตั้งเครื่อง 30 mA นาน 40 นาที ปรับเพิ่ม 50 mA นาน 1.30 ชั่วโมงจนกระทั่งสีเคลื่อนลงมาที่ด้านล่างของเจล

รูปที่ 3 การทำ Gel electrophoresis สำหรับโปรตีน



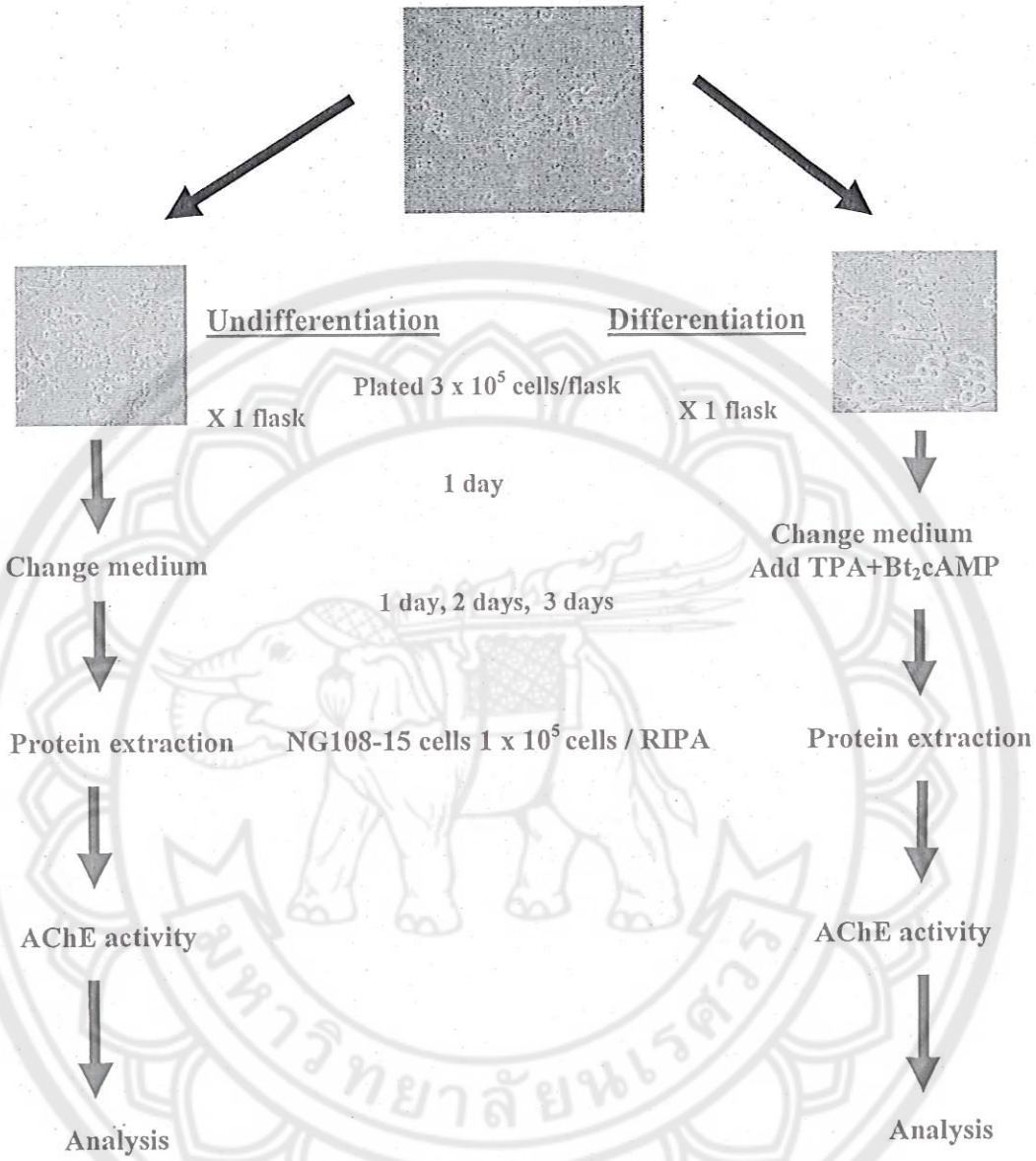
การย้ายโปรตีนทำโดยวิธี Wet ประกบเจลและ PVDF membrane ให้แน่น เท Towbin buffer ที่ 4 องศาเซลเซียส ตั้งเครื่องที่ 25 volts นาน 55 นาที

รูปที่ 4 การย้ายโปรตีน



แผ่น membrane จะถูกแช่ใน Primary antibody นาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นล้าง Membrane ด้วย PBST นาน 5 นาที 3 ครั้ง นำแผ่น membrane ไปแช่ Secondary antibody นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นล้าง Membrane ด้วย PBST นาน 5 นาที 3 ครั้ง แช่สารที่ทำให้เกิดการเรืองแสงนาน 5 นาที แล้วนำไปวางบนพลาสติกและประกบฟิลม์ในห้องมืด

รูปที่ 5 การแช่ Antibody และการประกบฟิลม์



เซลล์ NG108-15 จะถูกเลี้ยงไว้ 1 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 1, 2 และ 3 วัน กลุ่มที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะเติมสาร Bt_2cAMP และ TPA จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 1, 2 และ 3 วัน หลังจากนั้นสกัดโปรตีนโดยใช้ RIPA buffer และนำไปหา AChE activity โดยใช้เครื่อง Microplate reader

รูปที่ 6 สรุปวิธีการเลี้ยงเซลล์และศึกษาการแสดงออกของ AChE activity โดยใช้เซลล์ NG108-15

ผลการทดลอง เป็นดังนี้

1. เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะระหว่างเซลล์ NG108-15 กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างและกลุ่มที่ทำให้ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

รูปร่างลักษณะของเซลล์ NG108-15 ทั้ง 2 กลุ่มแสดงดังรูปที่ 7 กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จะมีลักษณะกลมแบนหลังจากเพาะเลี้ยงไป 1 วันดังรูป 7 (A) จำนวนเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 บางเซลล์จะมีรูปร่างเป็นแฉกคล้ายดาว ดังรูป 7 (B) บางเซลล์มีการยื่นแขนขาออกมาดังรูป 7 (C) สำหรับกลุ่มที่ทำให้ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาท จะทำโดยการเติมสาร Bt_2cAMP และ TPA แสดงดังรูป 7 (D) หลังจากเพาะเลี้ยงไป 2 วันจะมีการงอกของเซลล์ดังรูป 7 (E) จำนวนและการงอกของเซลล์จะเห็นอย่างเด่นชัดในวันที่ 3 ดังรูป 7 (F)

2. การศึกษาปริมาณของ AChE protein

ผลการศึกษาการแสดงออกของ AChE protein ในเซลล์ NG108-15 เป็นดังนี้

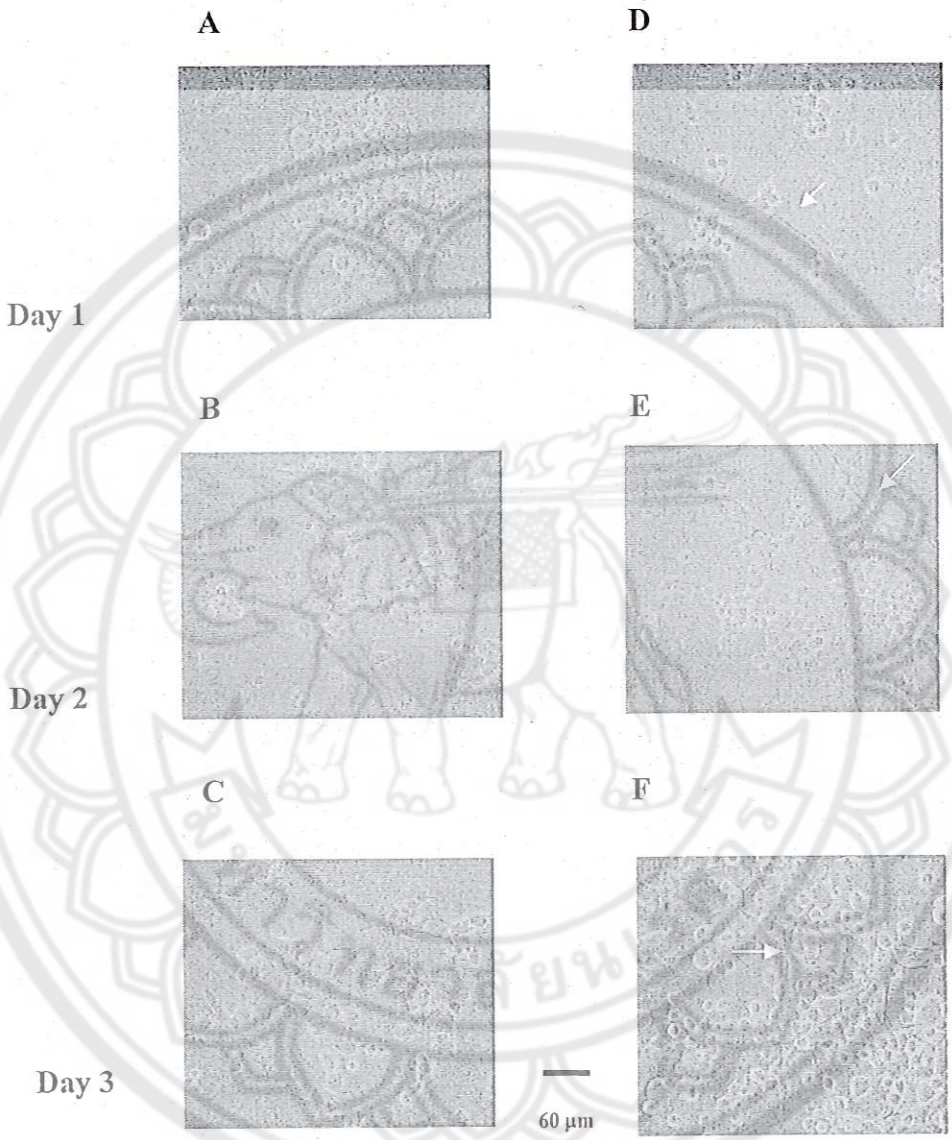
GAPDH จะเป็นโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมแสดงดังรูปที่ 8 ปริมาณโปรตีนในเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มในวันที่ 1, 2 และ 3 มีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงว่า GAPDH สามารถใช้เป็นโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมได้

ปริมาณ AChE protein ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 แนวโน้มจะมีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกัน แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 9

3. การศึกษาปริมาณของ AChE Activity

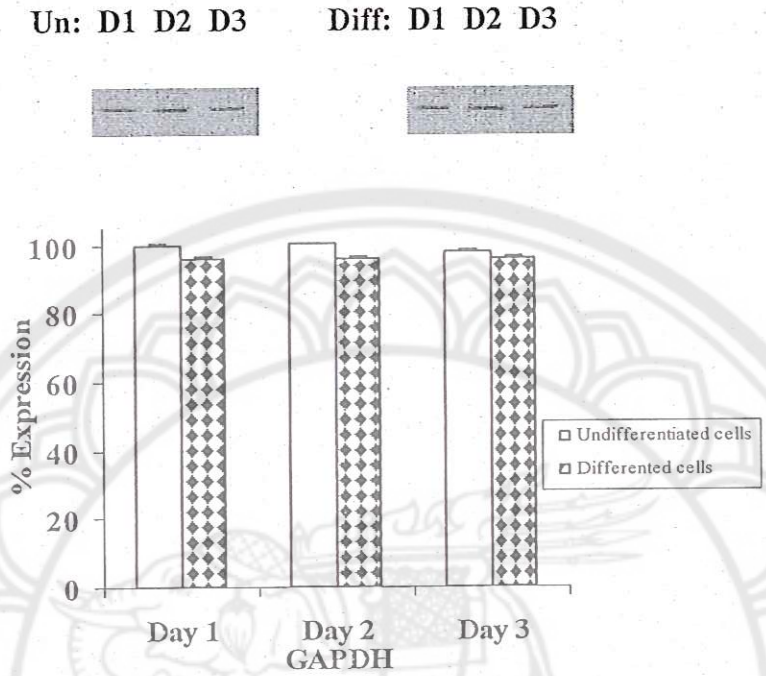
ผลการศึกษาการแสดงออกของ AChE activity ในเซลล์ NG108-15 เป็นดังนี้

ปริมาณ AChE activity ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และมากกว่ากลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง พบว่า AChE activity ในวันที่ 3 มีปริมาณมากกว่าในวันที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ดังรูปที่ 10



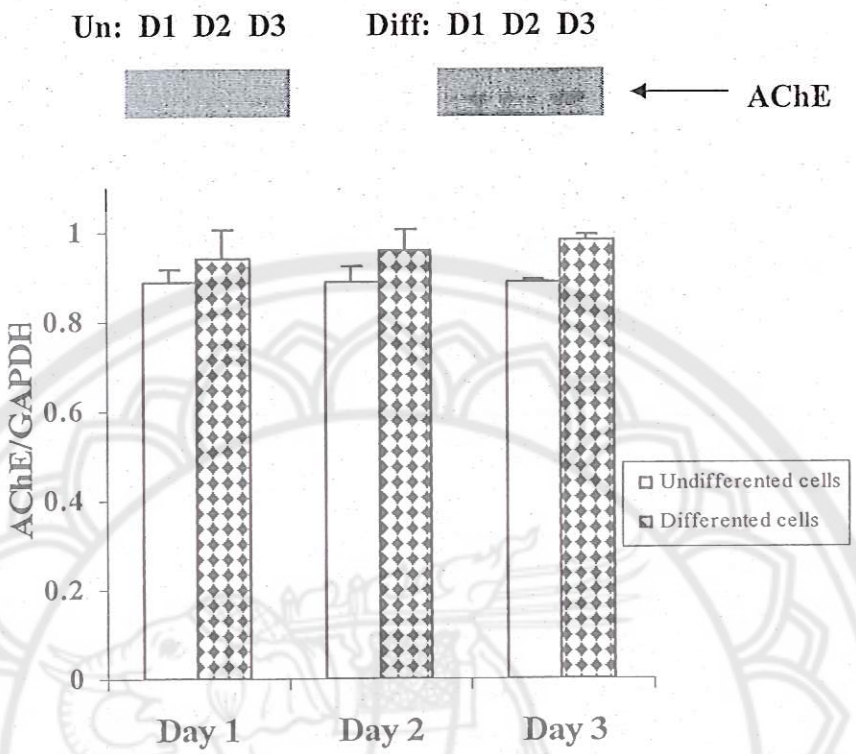
เซลล์ NG108-15 กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (A, B, C) และกลุ่มที่ทำให้ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (D, E, F) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน เซลล์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างทำโดยการเติมสาร Bt_2cAMP and TPA จะเห็นการงอกของเซลล์ประสาทตั้งแต่วันที่ 1 และเห็นชัดเจนในวันที่ 2 และ 3 ขนาดความยาวที่แสดง = 60 µm (A-F)

รูปที่ 7 แสดงลักษณะของเซลล์ NG108-15 กลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างและกลุ่มที่ทำให้ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง



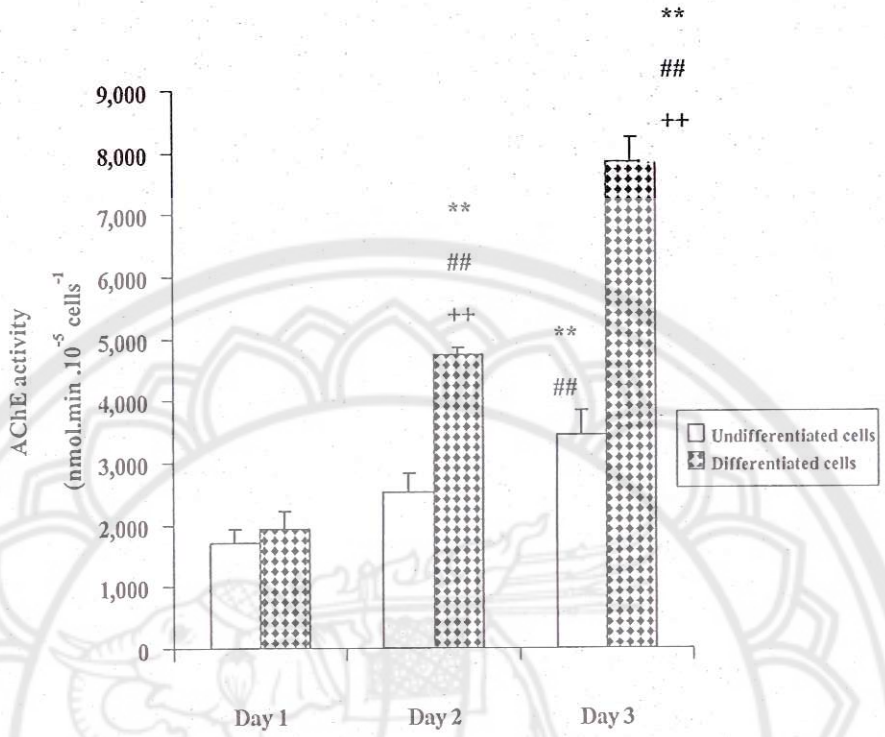
แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM), จำนวน = 3

รูปที่ 8 ปริมาณ GAPDH protein ในเซลล์ NG108-15 หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน



แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM), จำนวน = 3

รูปที่ 9 ปริมาณ AChE protein ในเซลล์ NG108-15 หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน



แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM), จำนวน = 3

**P≤0.01 เทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังจากเพาะเลี้ยง 1 วัน

P≤0.01 เทียบกับกลุ่มที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังจากเพาะเลี้ยง 1 วัน

++P≤0.01 เทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างกับกลุ่มที่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกัน

รูปที่ 10 ปริมาณ AChE Activity ในเซลล์ NG108-15 หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน

รูปร่างและถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างมีค่าใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่า GAPDH เหมาะที่จะเป็นตัวควบคุมในเซลล์ NG108-15 เพราะการแสดงออกของ mRNA ไม่เปลี่ยนแปลงจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Suwanakitch et al., 2008) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ GAPDH โปรตีนเป็นตัวควบคุม ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ GAPDH โปรตีนในเซลล์ NG108-15 ที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 1, 2 และ 3 มีค่าใกล้เคียงกัน

AChE ในสมองมีหน้าที่ในการพัฒนาระบบประสาทและการสร้างสารสื่อประสาท ผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์จะพบความบกพร่องของระบบประสาท Cholinergic ได้แก่ ระดับ ACh ลดลง ChAT และ AChE activity ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ (Gil-Bea, et al 2005) งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบปริมาณ AChE protein และ AChE activity ในกลุ่มเซลล์ NG108-15 ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและในกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง พบว่าปริมาณ AChE protein ในกลุ่มเซลล์ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 แนวโน้มจะมีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกันแต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่ต่างกัน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Tojima ที่พบว่าปริมาณของ AChE protein ในกลุ่มเซลล์ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมีมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แต่กลุ่มเซลล์ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์จะนานกว่าคือ 7-8 วัน ปริมาณของ AChE protein จึงมีปริมาณมากกว่า (Tojima, 2000) สำหรับ AChE activity ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Curtin และคณะ ที่พบว่าปริมาณ AChE activity ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะมากกว่ากลุ่มควบคุม (Curtin et al., 2006) ปัจจุบันยาที่ได้ผลดีในการรักษาอาการของโรคอัลไซเมอร์คือยากลุ่ม AChE inhibitor (Scarpini et al., 2003) ดังนั้นการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่กลุ่มที่ทำให้เปลี่ยนแปลงรูปร่าง อาจจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงยากลุ่มที่ยับยั้งการสร้าง AChE protein และ AChE activity เพื่อใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ AChE protein และ AChE enzyme activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ที่ถูกเปลี่ยนรูปร่างและไม่เปลี่ยนรูปร่าง โดยศึกษาหลังเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน ผลการทดลองพบว่าการเติมสาร Bt_2cAMP และ TPA ทำให้เซลล์ NG108-15 มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 1 ปริมาณ AChE protein ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและกลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 1, 2 และ 3 พบว่าไม่แตกต่างกัน ปริมาณ AChE activity ในกลุ่มที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 2 และ 3 มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองนี้อาจจะนำไปศึกษาสมุนไพรที่ยับยั้งการสร้าง AChE protein และ AChE enzyme activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง NG108-15 ในระดับโมเลกุลต่อไป

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

1. นำรูปแบบการทดลองไปศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ตัวอื่นๆ เช่น Amyloid precursor protein (APP), γ-secretase
2. นำรูปแบบการทดลองไปศึกษาสมุนไพรที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับโมเลกุลต่อไป

บรรณานุกรม

Curtin, B.F., Pal, N., Gordon, R.K., and Nambiar, M.P. (2006). Forskolin, an inducer of cAMP, up-regulates acetylcholinesterase expression and protects against organophosphate exposure in neuro 2A cells. **Molecular and cellular Biochemistry**, 290, 23-32.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7, 88-95.

Ma, L., Cheng, Z.J., Fan, G.H., Cai, Y.C., Jiang, L.Z., and Pei, G. (1997). Functional expression, activation and desensitization of opioid receptor-like receptor ORL1 in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. **FEBS Letters**, 403, 91-94.

Nelson P., Christian C., and Nirenberg M. (1976). Synapse formation between clonal neuroblastoma x glioma hybrid cells and striated muscle cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 73, 123-127.

Ronde, P., and Nichols, R.A. (2001). Postsynaptic target regulates functional responses induced by 5-HT3 serotonin receptors on axonal varicosities of NG108-15 hybrid neuroblastoma cells. **Neuroscience**, 102, 979-987.

Scarpini, E.,Scheltens, P., and Feldman, H. (2003). Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**, 2, 539-547.

Shekarabi, M., Bourbonniere, M., Dagenais, A., and Nalbantoglu, J. (1997). Transcriptional regulation of amyloid precursor protein during dibutyryl cyclic AMP-induced differentiation of NG108-15 cells. **Journal of Neurochemistry**, 68, 970-978.

Sukma, M., Tohda, M., and Watanabe, H. (2003). Chronic treatment with imipramine inhibits cell growth and enhances serotonin 2C receptor mRNA expression in NG 108-15 cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, 92, 433-436.

Suwanakitch, P., Jeenapongsa, R., Watanabe, H. and Saelim, N. (2008). Comparison of Alzheimer's disease-related gene expressions in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells. **ScienceAsia**, 34, 35-42.

๑ QP
601
W9665
2556

สำนักหอสมุด
๘ / ม.ค. ๒๕๕๖

Tohda, M., and Nomura, Y. (1988). Neurochemical and morphological studies on differentiation of NG108-15 cells by phorbol ester and forskolin. **Neurochemistry International**, 13, 37-42.

Tohda, M., Kumagai, C., and Nomura, Y. (1991). Effect of the simultaneous application of dibutyryl cAMP and phorbol ester on morphological differentiation in NG108-15 cells. **Neurochemistry International**, 1991;19:255-260.

Tojima, T., Yamane, Y., Takahashi, M., and Ito, E. (2000). Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. **Neuroscience Research**, 37, 153-161.

Tojima, T. and Ito, E. (2004). Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. **Progress in Neurobiology**, 72, 183-193.

Vogel, O.J.M., Broere, C.A.J., Laak, H.J.T., Donkelaar, H.J.T., Nieuwenhuys, R., and Schulte, B.P.M. (1990). Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, 11(1), 3-13.

Watkins, P.B., Zimmerman, H.J., Knapp, M.J., Gracon, S.I., and Lewis, K.W. (1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration inpatient with Alzheimer's disease. **Journal of American Medical Association**, 271(13), 992-998.

Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, AW., Coyle, J.T., and Delon, M.R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia; loss of neurons in the basal forebrain. **Science**, 215, 1237-1239.

1. 6689536

Original Article

Acetylcholinesterase enzyme activity in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells

Prawpan Suwanakitch[a], PhD, Sukkid Yasothornsrikul[b], PhD

[a]Deparment of Cardio-Thoracic Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand.

[b]Deparment of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand.

Manuscript

ABSTRACT

Objective: To compare the expression of AChE protein and AChE enzyme activity in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells.

Methods: The NG108-15 cells as undifferentiated cells were cultured for 1, 2 and 3 days. To induce neuronal differentiation, dibutyryl cAMP and 12-o-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate were added to the culture medium. The western blot was performed for determination AChE protein. The AChE enzyme activity was modified from Ellman method.

Results: The AChE protein in differentiated cells at day 2 and 3 tended to be higher than the undifferentiated cells at the same day but the expression level was not different. The AChE enzyme activity in differentiated NG108-15 cells at day 2 and 3 was significantly higher than in undifferentiated cells at the same day ($p<0.01$).

Conclusion: The AChE protein and AChE enzyme activity in NG108-15 cells were changed after differentiation during 3 days incubation period. This in vitro model may be useful as a primary screening tool for potential AD therapeutic agents.

Manuscript

Keywords: Acetylcholine esterase (AChE), protein, enzyme activity, NG108-15 cells

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia among elderly. The characterized of AD are irreversible impairment of cognitive and memory functions and a physical deterioration. The neuropathological features in AD are progressive deposits of β-amyloid protein plaques between nerve cells and neurofibrillary tangles within the nerve cells and neuronal loss.[1-2] An autopsy of AD brains revealed that the reduction of the Acetylcholine (ACh), Choline acetyl transferase, and Acetylcholinesterase (AChE) levels compared to normal brains.[2] It has been reported that AChE promotes aggregation of β-amyloid plaques in cerebral cortex of AD brains.[3]

Manuscript

NG108-15 cell is a hybrid cell line of mouse neuroblastoma (N18TG-2) and rat glioma (C6BU-1).[4] The NG108-15 cell was employed in vitro model since this cell line was able to release ACh and formed cholinergic neuromuscular synapse.[5] High level of the AChE expression was detected in differentiated cells.[6] The expression of AChE mRNA in differentiated NG108-15 cells was significantly greater than undifferentiated cells at day 2.[7] Thus, this study aimed to compare the expression of AChE protein and AChE enzyme activity in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells.

MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents

Bt_2cAMP and TPA were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). All other chemicals used were in the purest form available commercially.

Inc., Santa Cruz, CA) was used at a 1:300 dilution. Anti-rabbit AChE antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) was used at a 1:10,000 dilution. To correct for equal loading, the membrane was blotted with GAPDH antibody to produce a molecular mass of about 36 kDa. The interested proteins were detected by using ECL according to the supplier (Amersham Biosciences). The film was placed on the top of the membrane in the cassette and expose for 10 min. The film was scanned and the intensities of the recognized protein band were determined by using ImageJ.

2.5 Acetylcholinesterase (AChE) microassay

To determination the AChE enzyme activity, the medium was removed and the NG108-15 cells were washed with Phosphate buffer saline (PBS) and lysed using ice-cold RIPA buffer. The homogenate was centrifuged for 10 min at 3,000 x g at 4°C and resulting supernatant was used for AChE enzyme activity determination.

The measurement of AChE enzyme activity in NG108-15 cells was modified from the method of Ellman *et al.* (1961).[9] The assay was performed in 96-well plates by adding 260 µl of 50 mM PBS (pH 8), 10 µl of 30 mM Acetylthiocholine-iodide (ATCI), 10 µl of 10 mM 5,5'-dithiobis-(2 nitrobenzoic acid) (DTNB), and 20 µl of AChE enzyme, respectively. The absorbance was measured by using the microplate reader at a wavelength of 405 nm. AChE enzyme activity was calculated using following formula: where R is the rate of enzyme activity (expressed as nmol of acetylcholine iodide hydrolyzed/min/10^5 cells). ΔOD is the change in absorbance per minute and E is the extinction coefficient, which is 13,600 M^{-1} cm^{-1}.[9]

$$R = \frac{\Delta OD \times \text{volume of assay (0.3 ml)}}{E \times 10^5 \text{ cells}}$$

Manuscript

2.2 Cell culture

The NG108-15 cells were cultured in plastic flasks contained Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 2% HAT supplement (10 mM hypoxanthine, 40 mM aminopterine, 1.6 mM thymidine; Gibco/Life Technologies, Eggenstein, Germany), and 4% FBS and then incubated in humidified incubator with 5% CO_2 at 37°C. The NG108-15 cells as undifferentiation cells were seed for 1 day and the culture medium was changed. The undiffiferentiation cells were cultured for 1, 2 and 3 days. To induce neuronal differentiation, 100 mM dibutyryl cAMP (Bt_2cAMP) and 100 μM 12-*o*-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate (TPA) were added to the culture medium and cells were cultured for 1, 2 and 3 days.[8]

2.3 Preparation of protein

Protein extraction was done as follow. The NG108-15 cells were homogenized in ice-cold RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40 ([Octylphenoxy] Polyethoxyethanol), 0.1% SDS, 1% Sodium deoxycholate) and incubated on ice for 30 min. Samples were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4°C. Protein concentration was determined by using Quant-iT™ protein assay kit. Protein samples were denatured in 100°C for 5 min and centrifuged at 12,000 rpm for 2 min.

Manuscript

2.4 Western blot analysis

For western blot analysis, 20 μg of protein was separated on 10% SDS-PAGE. Proteins in SDS-PAGE were transferred to PVDF membrane (Amersham Biosciences) and the blots were blocked with 8% nonfat dry-PBST buffer for 60 min at room temperature. The anti-mouse AChE polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology,

2.6 Statistical analysis

The AChE protein expression measurements were normalized with the internal control of GAPDH expression. The AChE enzyme activity was calculated. All data are presented as mean ± SEM. Statistical testing used analysis of variance followed by a post-hoc LSD test and unpaired t - test. The criterion for statistical significance was $P<0.05$ for all comparisons.

RESULTS

3.1 Morphological differences between undifferentiated and differentiated NG108-15 cells

Morphological characteristics were observed under photomicrographs of undifferentiated and differentiated NG108-15 cells. The undifferentiated cells were flat, round in shape and displayed only a few neurites as shown in figure 1 (A, B and C). Exposure to Bt_2cAMP and TPA, the differentiated cells exhibited neuron-like morphology as shown in figure 1 (D, E and F). They extended neurites with abundant varicosities. The cellular process which was longer than the diameter of the cell body was defined as a neurite. The number of neurites were increased rapidly and reached the maximum at day 3.

Manuscript

3.2 Protein Expression of AD-related genes in undifferentiated and differentiated NG108-15 cells

Protein expressions of AChE in the differentiated and undifferentiated NG108-15 cells were statistically determined as shown in (Figure 2). GAPDH was used as an internal control as shown in figure 2(A). The AChE protein in differentiated cells at day 2 and 3 tended to be higher than the undifferentiated cells at the same day but the expression level was not different as shown in figure 2(B).

3.3 Acetylcholinesterase enzyme activity

The AChE enzyme activity in differentiated NG108-15 cells at day 2 and 3 was significantly higher than in undifferentiated cells at the same day ($p<0.01$) and differentiated cells at day 1 ($p<0.01$). Compared to undifferentiated cells, the AChE enzyme activity at day 3 was significantly greater than day 1 and 2 ($p<0.01$) as shown in figure 3.

DISCUSSION

The morphology of undifferentiated NG108-15 cells is flat, polygonal in shape, resembling primary-cultured non-neuron-like cells. Bt_2cAMP and TPA are known as agents that increase intracellular calcium ion and activate protein kinase C resulting in neuronal cell differentiation, as seen as neurite outgrowth and network formation.[8] The cAMP-induced neuritogenesis was dependent on MAPK/ERK kinase activity.[10] The characteristics of differentiated NG108-15 cells have also been demonstrated such as the high expression of AChE and serotonin mRNAs[6,11-12], the formation of cholinergic synapse with cultured myotubes[13], the presence of a wide range of voltage-dependent membrane currents[14] and the high expression of choline acetyl transferase (CAT) activity.[15]

Manuscript

The function of AChE in the brain is related to neuronal development and synapse formation. It has been reported that cholinergic deficits was found in AD.[2] An autopsy analysis of AD brains showed reduction of ACh level, ChAT and AChE activity compared to control.[2] The highest amount of AChE mRNA in differentiated NG108-15 cells at day 2 was found during 3 days incubation period.[7] The AChE mRNA expression of differentiated NG108-15 cells at day 2 and 3 was significantly greater than the expression at day 1 and undifferentiated cells at the same day.

However, this study also compared AChE protein expression and AChE enzyme activity between differentiated and undifferentiated NG108-15 cells after being culture for 1, 2 and 3 days. The results showed that the expression of AChE protein in differentiated NG108-15 cells at day 2 and 3 tended to greater than the undifferentiated cells at the same day but the expression level was not different. The same result was shown in Tojima study that the AChE protein expression in differentiated NG108-15 cells was higher than the undifferentiated cells.[6] The remark showed that the incubation period 8 days in differentiated NG108-15 cells in Tojima study was longer than this study only 3 days.[6] The AChE enzyme activity in differentiated NG108-15 cells at day 2 and 3 was significantly greater than undifferentiated cells at the same day. The same result was found in Curtin study.[16] The remark found that the mouse neuroblastoma cell line Neuro 2A was used in Curtin study.[16] Recent treatment for AD has been focused on enhancing cholinergic function by using AChE inhibitors.[17] It could be suggested that this differentiated NG108-15 cell line may be utilized as a tool for screening agents that inhibit the AChE protein and AChE enzyme activity.

Manuscript

CONCLUSION

In conclusion, the AChE protein and AChE enzyme activity in NG108-15 cells were changed after differentiation by Bt_2cAMP and TPA during 3 days incubation peroid. This in vitro model may be useful as a primary screening tool for potential AD therapeutic agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Division of Research Administration, Naresuan University. The authors would like to thank Dr.Chantana Boonyarut Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen for NG108-15 cells.

REFERENCES

1. Selkoe JD. The cell biology of β-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. **Trends Cell Biol**. 1998;8:447-453.
2. Gil-Bea, F.J., García-Alloza, M., Domínguez, J., Marcos, B. and Ramírez, M.J. (2005). Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. **Neuroscience letters**, 375(1), 37-41.
3. Rees, T., Hammond, P.I., Soreq, H., Younkin, S. and Brimijoin, S. (2003). Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. **Neurobiology of Aging**, 24, 777-787.
4. Tohda M, Nomura Y. Neurochemical and morphological studies on differentiation of NG108-15 cells by phorbol ester and forskolin. **Neurochem Int**. 1988;13:37-42.
5. Nelson P, Christian C, Nirenberg M. Synapse formation between clonal neuroblastoma x glioma hybrid cells and striated muscle cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1976;73:123-127.
6. Tojima T, Yamane Y, Takahashi M, Ito E. Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. **Neurosci Res**. 2000;37:153-161.

Manuscript

7. Suwanakitch P, Jeenapongsa R, Watanabe H, Saelim N. Comparison of Alzheimer Disease-related gene expression in differentiated and undifferentiated NG108-15 Cells. **ScienceAsia.** 2008;34:035-042.

8. Tohda M, Kumagai C, Nomura Y. Effect of the simultaneous application of dibutyryl cAMP and phorbol ester on morphological differentiation in NG108-15 cells. **Neurochem Int.** 1991;19:255-260.

9. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, and Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology.** 1961;7:88-95.

10. Tojima T, Kobayashi S, Ito E. Dual role of cyclic AMP-dependent protein kinase in neuritogenesis and synaptogenesis during neuronal differentiation. **J Neurosci Res.** 2003;74:829-837.

11. Wan DCC, Choi RCY, Siow NL, Tsim KWK. The promoter of human acetylcholinesterase is activated by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway in cultured Ng108-15 neuroblastoma cells. **Neurosci Lett.** 2000; 288:81-85.

12. Sukma M, Tohda M. and Watanabe H. (2003). Chronic treatment with imipramine inhibits cell growth and enhances serotonin 2C receptor mRNA expression in NG 108-15 cells. **Journal of Pharmacological Sciences.** 2003; 92: 433-436.

13. Choi RCY, Yam SCY, Hui B, Wan DCC and Tsim KWK. Over-expression of acetylcholinesterase stimulates the expression of agrin in NG108-15 cells. **Neuroscience Letter**. 1998;248:17-20.

14. Bostel S, Malo M, Dubois BR, Dubois JM. Calcium and voltage-dependent alterations of cell volume in neuroblastoma x glioma hybrid NG 108-15 cells. **Eur J.Physiol**. 2002;444:186-192.

Manuscript

15. Castell X, Cheviron N, Barnier JV, Diebler MF. Exploring the regulation of the expression of ChAT and VAChT genes in NG108-15 cells: implication of PKA and PI3K signaling pathways. **Neurochem Res.** 2003;28:557-564.

16. Curtin BF, Pal N, Gordon RK, and Nambiar MP. Forskolin, an inducer of cAMP, up-regulates acetylcholinesterase expression and protects against organophosphate exposure in neuro 2A cells. Molecular and cellular Biochemistry. 2006;290:23-32.

17. Small, G. and Bullock, R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia.** 2011;7, 177-184.

Manuscript

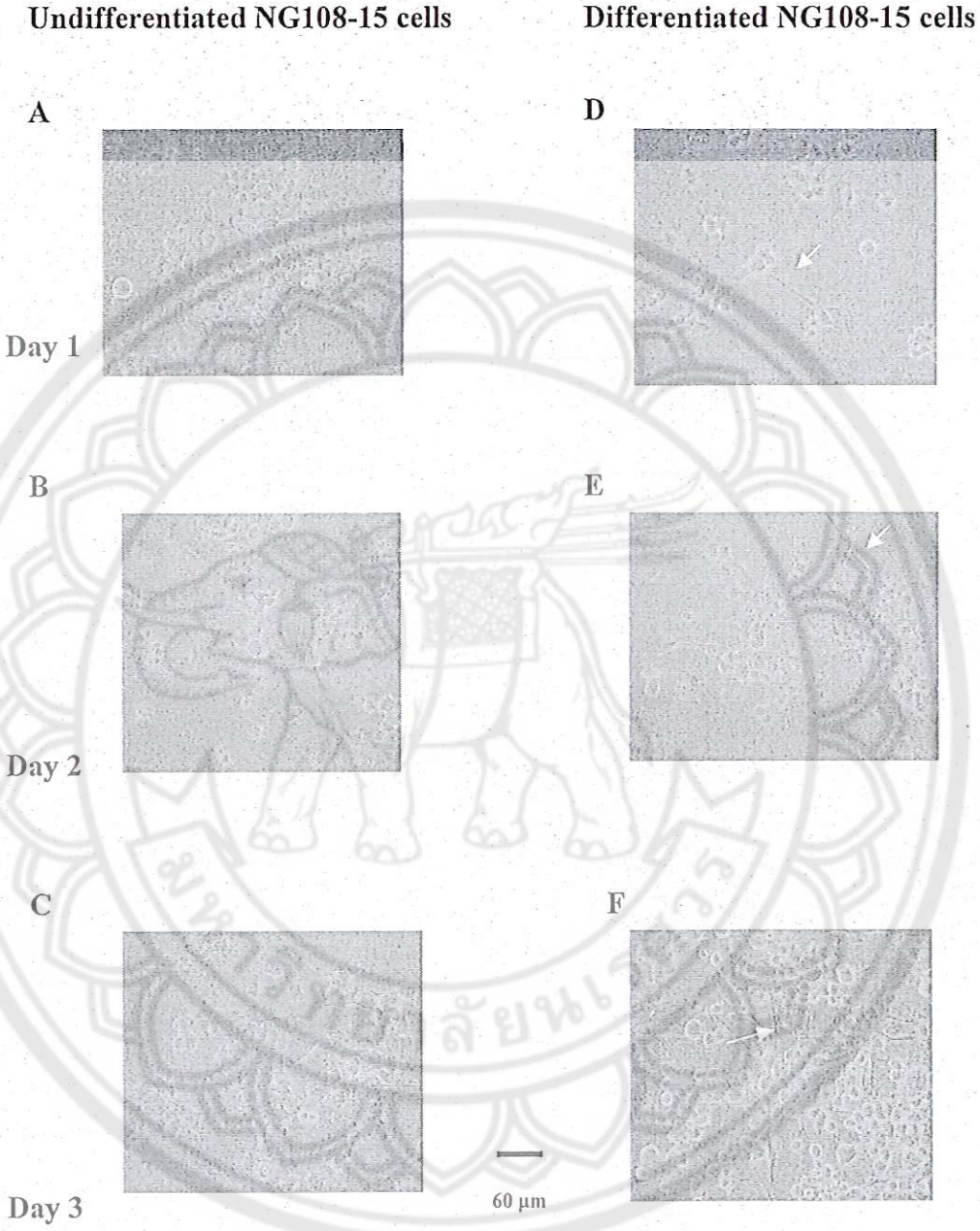
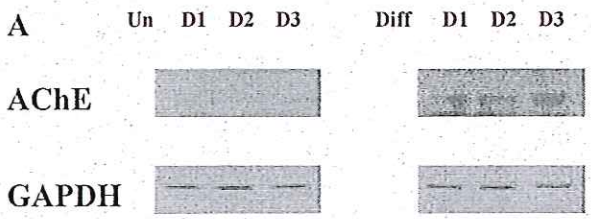


Figure 1. Undifferentiated (A, B, C) and differentiated (D, E, F) NG108-15 cells after being cultured for 1, 2 and 3 days. Cell differentiation was induced by Bt_2cAMP and TPA. The neurite outgrowth (arrowed) is more obviously seen in differentiated cells than undifferentiated cells at the first day. Network formation is more pronounced in differentiated cells at day 2 and 3. Scale bars = 60 µm (A-F).



B

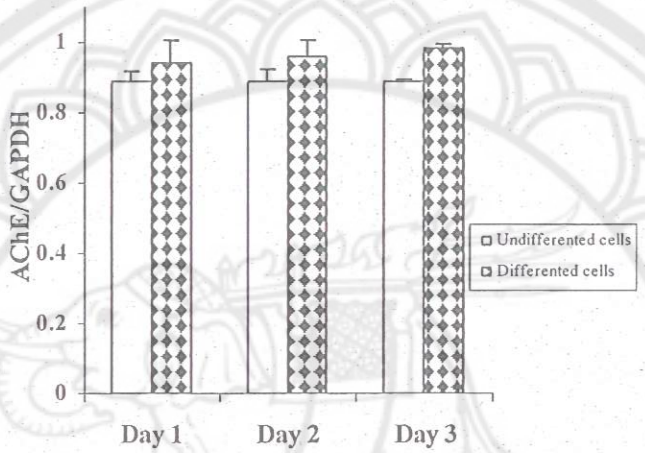


Figure 2 The AChE protein expression patterns of Alzheimer's disease related genes in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells after being cultured for 1, 2 and 3 days. GAPDH was used as an internal control (A). The protein expressions of AChE (B) were normalized with GAPDH. The results were in mean ± SEM. The sample number of each group was three. The protein bands were shown above the corresponded histograms.

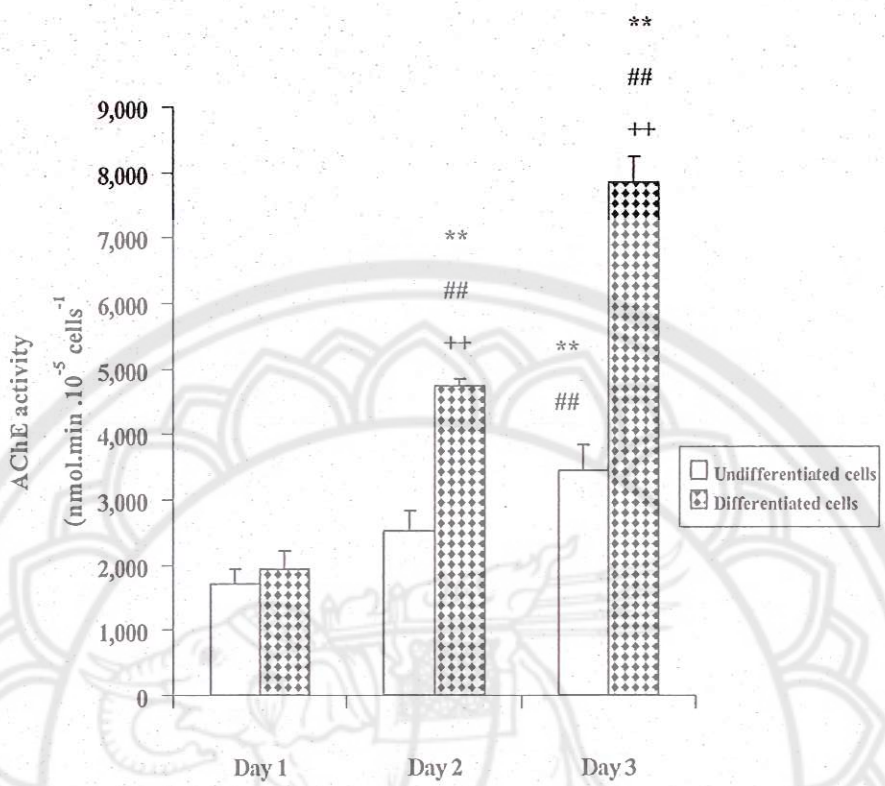


Figure 3 The AChE enzyme activity of Alzheimer's disease related genes in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells after being cultured for 1, 2 and 3 days. The results were in mean ± SEM. The sample number of each group was three.
**P≤0.01 vs. undifferentiated NG108-15 cells at day 1
P≤0.01 vs. differentiated NG108-15 cells at day 1
++P≤0.01 vs. undifferentiated on the same day