



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนจากถั่วเหลืองในการเพิ่มระบบตัวบ่งชี้เชื้อโรคและการป้องกันการหลวมตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อBUMDลูกของสุกรในภาวะปกติหรือที่ได้รับสารพิษจากแบคทีเรีย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

รศ. ดร. สพ.ญ. สุทธาสินี ปุญญโชติ

รศ. ดร. ฉัตรศรี เดชะปัญญา

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๑ 10330

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ถนนสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ ๑ 10110

แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย

งบประมาณแผ่นดินเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีนาคม 2557

## CONTENT

	PAGE
ABSTRACT (THAI)	5
ABSTRACT (ENGLISH)	6
INTRODUCTION	7
MATERIALS AND METHODS	10
RESULTS	14
DISCUSSION	30
ACKNOWLEDGEMENTS	33
REFERENCES	34
APPENDIX	38

## LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	(A) Representative gel electrophoresis showing the mRNA expression of TLR-1 to -10 in the immortalized endometrial epithelial cells grown for 48 h in the estrogen-free medium. Housekeeping gene (GAPDH) was used as an internal control. (B) Real-time PCR analysis of TLR-1 to -10 mRNA expression in the immortalized endometrial epithelial cells grown in the estrogen-deprived media for 48 h.	15
Figure 2	Effects of 48h treatment of genistein and daidzein $10^{-10}$ , $10^{-8}$ and $10^{-6}$ mol/L compared with control (2%csFBS-DMEM + DMSO (without genistein or daidzein) on toll-like receptor (A-J) TLR-1 to 10 gene expression in immortalized porcine glandular endometrial cell culture in relative to GAPDH the housekeeping gene.	17-18
Figure 3	Effects of 48h pre-treatment with genistein, daidzein $10^{-10}$ , $10^{-8}$ and $10^{-6}$ mol/L or DMSO on on toll-like receptor (A-J) TLR-1 to 10 gene expression in relative to GAPDH the housekeeping gene in immortalized porcine glandular endometrial cell culture inoculated with 1 $\mu$ g/ml of O111:B4 <i>Escherichia coli</i> Lipopolysaccharides (LPS).	19-20
Figure 4	(A-I) Western blot analysis of TLR1 to 9 protein in the immortalized endometrial epithelial cells after treatment with genistein, daidzein $10^{-10}$ , $10^{-8}$ and $10^{-6}$ mol/L or DMSO for 48h.	23-24
Figure 5	Effects of $10^{-10}$ ( $\blacktriangledown$ ), $10^{-8}$ ( $\blacklozenge$ ) and $10^{-6}$ mol/L ( $\bullet$ ) (A) genistein or (B) daidzein compared with control ( $\square$ ), 2%csFBS-DMEM + DMSO (without genistein or daidzein) on transepithelial resistance (percent changes from basal values) across the immortalized porcine epithelium.	28
Figure 6	Effects of $10^{-10}$ ( $\blacktriangledown$ ), $10^{-8}$ ( $\blacklozenge$ ) and $10^{-6}$ mol/L ( $\bullet$ ) (A) genistein or (B) daidzein compared with control ( $\square$ ), 2%csFBS-DMEM + DMSO (without genistein or daidzein) on prevention of LPS-induced destruction of intestinal epithelial barrier function.	29

## LIST OF TABLES

	Page	
Table 1	Pair of porcine gene primers used for real-time PCR	12
Table 2	Effects of genistein, daidzein or DMSO treatment on transepithelial resistance (TER) across the immortalized porcine epithelium	26
Table 3	Effects of 48h pre-treatment with genistein, daidzein or DMSO on transepithelial resistance (TER) across the immortalized porcine epithelium inoculated with 1 $\mu$ g/ml of O111:B4 <i>Escherichia coli</i> Lipopolysaccharides (LPS)	27

## บทคัดย่อ

เซลล์เยื่อบุมดลูกเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่ทำหน้าที่ต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านทาง การแสดงออกของตัวรับรู้เชื้อโรคที่เรียกว่าตัวรับโทไลค์ ตัวรับนี้มีความจำเพาะต่อการจับกับโมเลกุลของสิ่ง แปรกลปลอมที่สร้างมาจากเชื้อโรคซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการอักเสบและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เซลล์ของระบบทางเดินสืบพันธุ์มีการแสดงออกของตัวรับชนิดนี้ซึ่งถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเพศ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมี วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของตัวรับโทไลค์ชนิดต่างๆ ในเซลล์เยื่อบุมดลูกเพาะเลี้ยงชนิดไม่ตายของหนู ตลอดจน ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนจากพืชที่ใช้เป็นทดแทนฮอร์โมนเพศเมียต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนของตัวรับโทไลค์ ของเซลล์เยื่อบุมดลูกด้วยวิธี Real-time PCR และ Western blot analysis ทำการทดลองโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อ บูดของเยื่อบุโพรงมดลูกสุกรชนิดไม่ตายที่เจริญเติบโตในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ปราศจากฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าในเซลล์ เพาะเลี้ยงชนิดนี้มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 1 2 4 5 และ 10 ที่ปริมาณน้อย ในขณะที่พบการ แสดงออกของตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 3 6 7 8 และ 9 มีปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับยีน GAPDH ที่ใช้เป็นตัวควบคุมซึ่งไม่มี ผลตอบสนองต่อสารไฟโตเอสโตรเจน โดยพบว่าเซลล์ที่ได้รับสารเจนิสที่อื่น  $10^{-10}$  หรือ  $10^{-6}$  โมลลาร์มีการแสดงออกของ ยีนตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 5 หรือ 7 เพิ่มขึ้น 2-10 เท่า ในขณะที่โดอะดิซิน  $10^{-6}$  โมลลาร์จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวรับ โทไลค์ชนิดที่ 3 และ 5 และโดอะดิซินที่ความเข้มข้น  $10^{-8}$  โมลลาร์มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 5 เท่านั้น อย่างไรก็ตามผลของไฟโตเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของตัวรับโทไลค์โปรตีนไม่ได้มีความสอดคล้องกับการ แสดงออกของยีน โดยกลับพบว่าการแสดงออกของโปรตีนตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 3, 6, 7, 8 และ 9 ลดลง แต่การได้รับเจนิส ที่อื่นมีผลในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนของตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 2 และโดอะดิซินมีเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนของ ตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 1, 4 และ 5 ( $p < 0.05$ ) สำหรับในการศึกษาผลของเจนิสที่อื่น และโดอะดิซินต่อการเปลี่ยนแปลง ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดในความสามารถป้องกันการสูญเสียของค่าความต้านทานของเนื้อเยื่อภายหลังได้รับสารไล โฟโพลีแซคคาไรด์ที่ทำกรตรวจสอบโดยเครื่องมือวัดความตางคักย์ในเซลล์เพาะเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงที่มีตัวกรองให้สาร ผ่านได้ พบว่าการได้รับเจนิสที่อื่น และโดอะดิซินที่ความเข้มข้นต่ำ ( $10^{-10}$  โมลลาร์) ทำให้ค่าความต้านทานของเนื้อเยื่อ ลดลง ในขณะที่การได้รับสารทั้งสองในความเข้มข้นที่สูงขึ้นทำให้ค่าความต้านทานของเนื้อเยื่อมีค่าสูงขึ้นมากกว่าเซลล์ที่ เลี้ยงตามปกติ นอกจากนี้พบว่าสารพิษไลโอฟิลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียชนิด O111 : B4 *Escherichia coli* ขนาด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดค่าความต้านทานของเนื้อเยื่อลดลงอย่างมากภายหลังจากให้มาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ การได้รับเจนิสที่อื่น และโดอะดิซิน ที่ทุกระดับความเข้มข้นก่อนที่จะได้รับสารไลโอฟิลีแซคคาไรด์สามารถป้องกันการ ลดลงค่าความต้านทานของเนื้อเยื่อที่เกิดสารไลโอฟิลีแซคคาไรด์ได้ นอกจากนี้การแสดงผลของยีนที่ควบคุมตัวรับ โทไลค์ได้ถูกตรวจสอบ เพื่อให้ศึกษากลกระทบบอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่จะตามมาหลังจากได้รับ สารไลโอฟิลีแซคคาไรด์ พบว่าการได้รับสารไลโอฟิลีแซคคาไรด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำให้ที่การแสดงออกของยีนของ ตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 1 และ 2 เพิ่มขึ้น ในขณะที่มีการแสดงออกของยีนตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 3, 6, 7, 8 และ 9 ลดลง โดยไม่ พบว่าผลดังกล่าวนี้ถูกส่งเสริมได้ด้วยฤทธิ์ของไฟโตเอสโตรเจน แต่กลับพบว่าผลต่อตัวรับโทไลค์ชนิดที่ 1 และ 2 จาก สารไลโอฟิลีแซคคาไรด์ไม่เกิดขึ้นหลังจากได้รับเจนิสที่อื่น หรือโดอะดิซิน อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างการ เปลี่ยนแปลงระดับของตัวรับโทไลค์ดังกล่าว และผลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไซโตไคน์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดจึงจำเป็นต้อง มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป แต่อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงประโยชน์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่ มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือก และยังสามารถปกป้องผลเสียหายที่เกิดจากการทำงานของสารพิษจากแบคทีเรีย ซึ่งผลดังกล่าวจะมีประโยชน์สำหรับการที่จะนำสารไฟโตเอสโตรเจนมาใช้เพื่อการรักษาความผิดปกติที่เกิดจากการติดเชื้อ ในเยื่อของระบบสืบพันธุ์ได้เป็นอย่างดี

## ABSTRACT

Mucosal epithelial cells lining female reproductive tract (FRT) periodically expose to potential pathogenic organisms. It serves as a component of innate immunity response to invading pathogen through toll-like receptors (TLRs). Sex steroid hormones or phytoestrogens play role in the regulation of many functions including of FRT innate immunity. To date, the expression of TLRs family in endometrium has not yet been well characterized. Therefore, the aim of the present study was to identify the TLRs mRNA expression in the porcine endometrial epithelial cells and to examine the effect of phytoestrogens on the regulation of TLRs gene and protein expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. The experiments were performed using immortalized porcine endometrial epithelial cells grown in estrogen-free media in the absence or presence of phytoestrogens genistein or daidzein for 2 days. RT-PCR experiments demonstrated that TLR1, 2, 4, 5 and 10 are less express than the GAPDH gene, while the expression of TLR 3, 6, 7, 8 and 9 is higher. Pretreatment with genistein  $10^{-10}$  M or  $10^{-6}$  M significantly increased TLR 5 or 7 mRNA expression by 2-10 folds. In addition, daidzein  $10^{-6}$  M increased TLR 3 and 5 while lower concentration daidzein  $10^{-8}$  M increased only TLR 5 mRNA expression. The TLR protein expression affected by phytoestrogens however, was not correlated to the gene expression. Expression of TLR3, 6, 7, 8 and 9 proteins was decreased in phytoestrogen treatment. All genistein treatment increased only TLR2 while daidzein treatment had an increase effect on expression of TLR1, 4 and 5 ( $P < 0.05$ ). Whether the modulatory effects of genistein and daidzein could prevent the loss of transepithelial resistance (TER) on was examined using the Volt-Ohm meter measurement in IMM cells grown on insert filters. Low concentration of genistein and daidzein (0.1) treatment revealed the decrease of TER while the higher concentration increased TER. O111:B4 *Escherichia coli* Lipopolysaccharides (LPS; 1  $\mu\text{g/ml}$ ) inoculation dramatically decreased TER of IMM cells after 48h incubation. All pre-treatment with genistein or daizein 48h prior to LPS inoculation restored the loss of TER by this endotoxin. In addition, the mRNA expression of TLRs was also examined in order to provide the other relevant effect of phytoestrogen on innate immunity response to LPS. It revealed the up-regulation of TLR1 and 2 or the down-regulation of TLR3, 6, 7, 8 and 9 mRNA expression after 48h inoculation with LPS. The synergistic effect of phytoestrogen on the modulatory effect of LPS on TLR mRNA expression was not found. Conversely, all genistein or daidzein reversed LPS effect on TLR1 and 2mRNA expressions. However, the functional relevance between TLRs mRNA expression and their functions associated with cytokine production are required for further study. The present results indicate that phytoestrogen compounds in soy can alter the innate immunity system against pathogens in harmful of the mucosal epithelial cells. These effects may benefit for therapeutic application of genistein or daidzein in the mucosal immunity.

## INTRODUCTION

Reproductive tract infections, especially uterine infections are a critical health problem with several consequences including infertility, ectopic pregnancy, and preterm birth. In pigs, infection in the respiratory and reproductive systems, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a major problem. The endometrium is an important site of innate immune defense, giving protection against uterine infection, which is crucial for successful implantation and pregnancy. The defense mechanisms primarily intervened by uterine epithelia could be either effective physical barrier mediated by tightening of the epithelial monolayer (Ochiel *et al.*, 2008).

Lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin is composed of the outer membrane of Gram-negative bacteria, including of the principal commensal bacteria in the female genital tract *Escherichia coli* (Larsen and Monif, 2001). The bacterial vaginosis are not confined to the lower genital tract and may invade to the uterus and oviduct which is implantation and fertilization site. Therefore LPS has the deleterious effect on the quality of fertilized ova and the rate of pregnancy. Awkwardly, *E. coli* appears to favor the additional development of uterine infections by other opportunistic bacteria and viruses such as Herpes Virus (Donofrio *et al.*, 2008). Recently, endometrial pathogenic *E. coli* (EnPEC) were discovered that were more adherent to and invasive in the endometrium (Sheldon *et al.*, 2010). In general, local LPS in the uterine lumen induced the inflammatory process and caused cell disruption (Herath *et al.*, 2009). These evidences may encourage the microorganisms or macromolecules across the endometrial. In respiratory organ, LPS induced lung endothelial and epithelial barrier disruption as evidenced by reduction of trans-epithelial and transendothelial resistance (TER) as well as an increased dextran leak in a transwell permeability assay (Birukov *et al.*, 2013; He *et al.*, 2009). LPS treatment was indicated to disturb the serum concentration of progesterone, estrogen and their receptors (Agrawal *et al.*, 2013). Principally, LPS is recognized by immune cells and host through the major membrane-bound and cytoplasmic pattern-recognition receptors (PRRs) or toll-like receptors (TLRs) family. TLRs recognize only

conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) synthesized by microorganisms, but not by the host. Basically, TLRs are integral membrane glycoproteins comprising the intracellular C-terminal domain which is required for the interaction and recruitment of various adaptor molecules to activate the downstream signaling pathway (Kumar *et al.*, 2010). Activation of the TLRs with specific PAMPs leads to induction of inflammatory responses and development of antigen-specific adaptive immunity (Wira *et al.*, 2005). At least 11 TLRs have been identified in mammals. Each TLR recognizes various components of the bacterial cell wall such as lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria (TLR-4), peptidoglycan from gram-positive bacteria (TLR-2), lipoarabinomannan (LAM) from mycobacteria (TLR-2), diacyl or triacyl lipopeptides from bacteria, mycobacteria and *Mycoplasma* (TLR-2/1 or TLR-2/6), flagellin from flagellated bacteria (TLR-5) and genomic DNA rich in unmethylated CpG DNA from bacteria (TLR-9) (Akira *et al.*, 2006). Apart from bacteria, double-strand RNA from a virus is recognized by TLR-3 and single-strand RNA from viruses by TLR-7 and TLR-8. Upon stimulation, TLRs mediate the secretion of chemokines and cytokines that recruit and activate immune cells of both the innate and adaptive immune systems (Wira *et al.*, 2010). The mRNA expression of TLRs has been identified along the female reproductive tract. Previous studies in human primary uterine and fallopian tube epithelial cells revealed the expression of TLR-1 to -9 (Schaefer *et al.*, 2004). The expression of TLRs appeared to be regulated by cyclic changes of sex hormones during the menstrual cycle. The TLR-2 to -6, -9 and -10 were highly expressed in the human endometrium during the secretory phase of the menstrual cycle (Aflatoonian *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2007). Similarly, in a murine model, the expressions of TLR-1 to -10 were significantly higher in the vaginal epithelial cells during diestrus (Yao *et al.*, 2005). Therefore, changes in TLR mRNA expression may alter the expression of TLRs protein on either macrophages, dendritic cells or epithelial cells leading to the modulation of mucosal innate immunity. However, little was known about the regulation of expression of TLRs in the porcine endometrial epithelial cells.



Genistein and daidzein are two major isoflavone phytoestrogens mostly found in high level in soy and soybean products (Chansakaow *et al.*, 2000). Due to chemical structure similar to estrogen, they have been reported to bind estrogen receptors and exerted weak estrogenic or anti-estrogenic effects on various types of cells and tissues. In addition, genistein and daidzein have been shown to possess a variety of biological activities such as antioxidant effect, anti-proliferation, differentiation as well as modulation of immune response of mammary gland and endometrium (Zhang *et al.*, 1997). Endometrial epithelial cells lining the uterine cavity has been demonstrated the functional estrogen receptor, both ER $\alpha$  and ER $\beta$  and transport-related activities, especially in secretion of many factors involving mucosal defense mechanism such as growth factors, cytokines and anti-microbial product (Knapczyk *et al.*, 2010; Wira *et al.*, 2005). The cultured cells also provide a physical barrier with high epithelial resistance, suitable for studying the mucosal defense mechanism. Therefore, it is of interest, whether endometrial epithelial cells itself exploits the ability of first line mucosal defense by the recognition of pathogenic components through the specific cell surface receptor. The aim of the present study was to characterize the mRNA expression of TLR-1 to -10 and to examine the alteration of TLR expression by phytoestrogens in immortalized porcine endometrial epithelial cells. In addition, the assessment of the endometrial barrier function by changing of transepithelial resistance (TER) after phytoestrogens exposure compared with post-stimulation of LPS in order to reveal their protective function on mucosal epithelial were examined. Understanding the effect of phytoestrogens on endometrial barrier function in correlation with TLRs gene expression is critical for uterine health and reproductive success. Phytoestrogens may be alternative medicinal products of choice for the prevention and treatment epithelial disorder and diseases caused by barrier dysfunction.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Genistein, daidzein, insulin, non-essential amino acid, lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 055:B5, purified by phenol extraction) and high purity grade salts were purchased from Sigma Chemical Co., (St Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS), phenol red-free DMEM, fetal bovine serum (FBS), 0.05% trypsin-0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), kanamycin, penicillin-streptomycin and fungizone were purchased from GIBCO BRL (Grand Island, NY). Charcoal-stripped FBS was purchased from Biowest Co., (Miami, FL).

### Cell isolation and culture

Immortalized porcine endometrial epithelial cells were kindly provided by Assoc. Prof. Dr. Chatsri Deachapunya, Srinakharinwirot University. Cells were cultured in DMEM supplemented with 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 5% heat-inactivated FBS, 850 NM insulin, 1% non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 100 µg/ml kanamycin, and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in the air for 4 days before the experiment. Culture medium was changed after 24 h and then every 2-3 days. Upon the cell was completely confluent, the epithelial cells were subcultured to 12-mm diameter transwell insert filters which have 0.4 µm of membrane pore size. Cell monolayers were fed every two days and maintained in standard media for about 7 days before the beginning of the experiment. In an attempt to verify the estrogenic action on the possible regulation, of the epithelial barrier function of TJs by genistein and daidzein, standard cell culture medium was replaced with phenol-red free medium and 2% charcoal-stripped fetal bovine serum (2%csFBS-DMEM) for 2 days and subjected to treatment with drugs.

### Measurement of transepithelial electrical resistance (TER)

Transepithelial electrical resistance (TER) was performed to determine the ion permeability of tight junction lining at the uppermost portion of endometrial glandular epithelial cells. Following the subculture of glandular epithelial cells on the transwell insert filters, the TER was periodically measured by using EVOM<sup>2</sup>™ electrode connected to Volt-ohmmeter (World Precision Instruments, Inc. Sarasota, FL) over 24 h intervals during the culture and pre-condition. To monitor the changes in TER by phytoestrogens and LPS stimulation, the inserts containing the IMM cells grown in phenol-red-free medium with stripped serum for 2 days was measured for TER. Genistein and daidzein (0.1, 10 and 1000 nmo/L) or their vehicle DMSO were administrated to the apical side of cell monolayer and the cells were incubated for 48 h. TER was measured before and at 30 min, 60 min, 120 min, 24 h and 48 h after administration of drugs. Percent changes of TER of each time point from the start point was calculated and analyzed.

### *Lipopolysaccharide (LPS) stimulation*

To study the effect of genistein and daidzein on bacterial endotoxin-induced tight junction barrier damage, all the IMM cells after the drug or vehicle treatment for 48h, they were substituted with new experimental media containing 1 µg/ml of O111:B4 Escherichia coli Lipopolysaccharides. Cells were allowed to incubate with endotoxin for 48 h. Measurement of TER was performed before and at 30 min, 60 min, 120 min, 24 h and 48 h after LPS stimulation. To verify the isoflavanoid effects on TER responded to LPS, changes of TER were calculated as percent changes of each point after LPS stimulation from the time point of 48 h of isoflavones or vehicle treatment. Cells from each well were harvested, and the RNA was extracted for analysis of TJs mRNA expression.

### Semi-quantitation of targeted gene expression by real-time PCR

Relative quantitative real-time PCR across multiple samples were obtained using primer pairs of TLR and internal control GAPDH gene products as shown in table 1. PCR reactions were performed with Corbett<sup>®</sup> Rotor Gene 6000 (QIAGEN<sup>®</sup>, USA) and Evaline EvaGreen<sup>®</sup> E4 Supermix (GeneOn<sup>®</sup> Biotech, CA) containing EvaGreen<sup>®</sup> dye, 400 nM of each primer and 150 nM of the template were mixed in a 20- $\mu$ L reaction and cycled as follows: 95 (C for 3 min; denaturing at 95 (C for 30 s; annealing and extension at 60 (C for 30 s for 45 cycles. The specific PCR product for TLR and GAPDH were considered when a single sharp peak was seen. Levels of mRNA expression were calculated using the comparative threshold cycle method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) which defines as the relative fold change of targeted gene expression normalized to an internal control gene (porcine GAPDH).

**Table 1** Pair of porcine gene primers used for real-time PCR

Gene	Forward Primer (5' to 3')	GenBank Accession Number	Size (bp)
TLR1	Fwd: GG1CTTGCTGGTCTTAGGAGAGAC Rev: CTGAAGTCCAGCTGACCCTGTAGCTTCACG	NM_001031775.1	81
TLR2	Fwd: GTGCTTCCGAGAAGTTTAT Rev: GCAGAATGAGGATGGCG	GU138028.1	106
TLR3	Fwd: CGGGCCAGCTTTCAGGAACCTG Rev: GGCATGAAITATATATGCTGC	NM_001097444.1	81
TLR4	Fwd: AAGGTTATTGTCGTGGTGT Rev: CTGCTGAGAAGGCGATAC	NM_001113039.1	179
TLR5	Fwd: CCTCATGACCATCCTCACAGTCAC Rev: GGCTTCAAGGCACCAGCCATCTC	NM_001123202.1	122
TLR6	Fwd: CCAAGTGAACATATCAGTTAATACTTTAGGGTGC Rev: CTCAGAAAACACGGGTGTACAAAGCTG	NM_213760.1	116
TLR7	Fwd: CTCCCGGATCTGTACACCTG TGA G Rev: CTCCACAGAGCCTTTTCCGGAGCT	NM_001097434.1	107
TLR8	Fwd: GTCCTGGGGATCAAAGAGGGAAGAG Rev: CTCTTACAGATCCGCTGCCGTAGCC	NM_214187.1	700
TLR9	Fwd: GCGAGATGAGGATGCCCTGCCCTACG Rev: TTCGGCCGTGGTCCCTGGCAGAAG	NM_213958	308
TLR10	Fwd: CAGAGGTCATGATGGTTGGATGG Rev: GACCTAGCATCCTGAGATACCAGGGCAG	NM_001030534.1	110
GAPDH	Fwd: TGAAGTCCGACTCAACGGATTTGGT Rev: GTGGTGGACCTCATGGCCACATG	NM_001206359.1	600

### *Western blot hybridization*

After 48 h culturing of IMM cells in the absence or presence of phytoestrogens, cells were trypsinized and lysed with lysis buffer (50 mM tris HCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 20  $\mu$ g aprotinin and 1 mM NaF, pH 7.4). Protein concentrations were determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce Chemical Co., USA). To detect the protein expression, 60  $\mu$ g of total protein per sample were separated on 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Pall Life Sciences, USA) in Tris-glycine transfer buffer. After blocking with 5% nonfat powdered milk in TBST (25 mM tris, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 4 h at room temperature, the membranes were reacted with antibody against TLR at the appropriated dilution (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) at 4 C° overnight. After several washings, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with appropriate secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Zymed Laboratories Inc.). The immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Santa Cruz Biotechnology Inc.) According to manufacturer's instructions. Membranes were then exposed to film (Hyperfilm-ECL; Amersham Biosciences, USA) to visualize chemiluminescent bands. Re-proceeded blot with anti  $\beta$ -actin antibody (Sigma) was used as an internal control. Differences in protein immunoreactivity between treatments were determined by scanning densitometry in proportion to  $\beta$ -actin immunoreactive bands (Scion Image; Scion Corporation, Frederick, MD). All experiments were repeated at least three times.

### *Data analyzes*

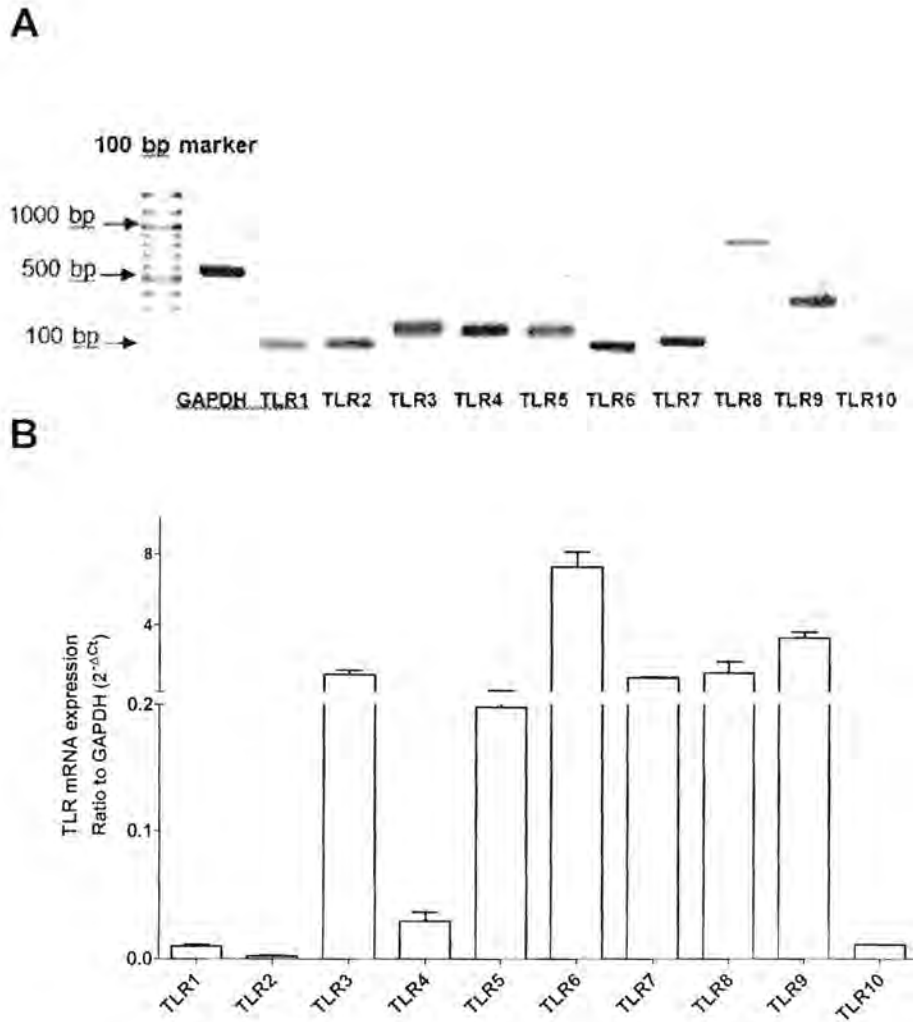
All values are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) and n is the number of immortalized cell monolayers from at least three different cell culture passages. Using Prism<sup>TM</sup> 5.0,

GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The differences between the control and experimental means were analyzed using a Student's t-test or Analysis of Variance (ANOVA) where appropriate. The post-hoc test was additionally performed with the Dunnett's test to compare the differences from control or the Newman-Keuls multiple comparison test to compare the differences between two groups. Differences with *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### *Toll-like receptor mRNA expression in immortalized endometrial epithelial cells*

To characterize the capable of recognition of pathogenic components through the specific cell surface receptor, the mRNA expressions of all subtypes of TLRs were examined in the immortalized endometrial epithelial (IMM) cells by using conventional RT-PCR and real-time PCR. In this experiment, the cells which were normally maintained in the standard media were further cultured for 48 h in the estrogen-free media. By using specific primer sets of various TLR subtypes, the PCR products as recognized by conventional RT-PCR revealed that the endometrial cells grown in the estrogen-deprived media expressed all TLR-1 to -10 mRNA with an exception of TLR-6 mRNA as shown in figure 1. However, the normalization of TLRs mRNA expression with internal control GAPDH mRNA expression using real-time PCR as shown in figure 2 revealed that all of TLRs mRNA were expressed in the estrogen-free condition with TLR-6 being most expressed, while TLR1, 2, 4, 5 and 10 were very low expressed.



**Figure 1** (A) Representative gel electrophoresis showing the mRNA expression of TLR-1 to -10 in the immortalized endometrial epithelial cells grown for 48 h in the estrogen-free medium. Housekeeping gene (GAPDH) was used as an internal control. (B) Real-time PCR analysis of TLR-1 to -10 mRNA expression in the immortalized endometrial epithelial cells grown in the estrogen-deprived media for 48 h. Data were normalized to porcine GAPDH using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  analysis as described in Materials and Methods. Each value represented mean  $\pm$  S.E.M. of 3 experiments (n=3).

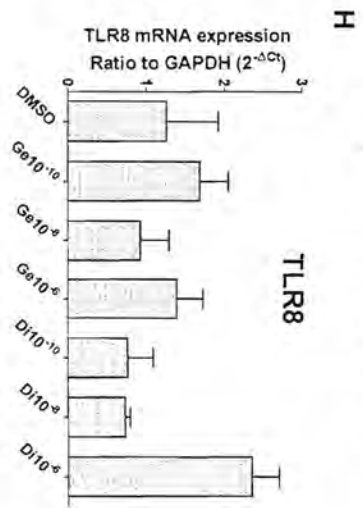
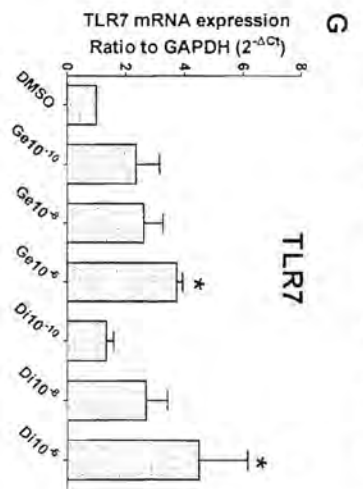
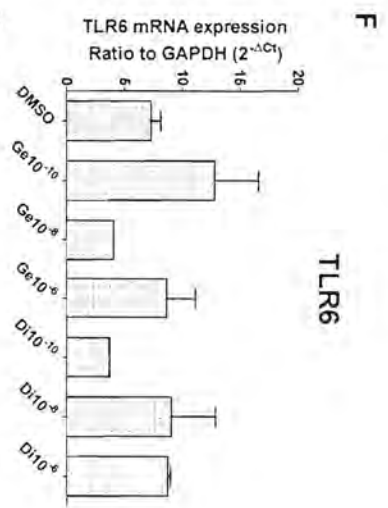
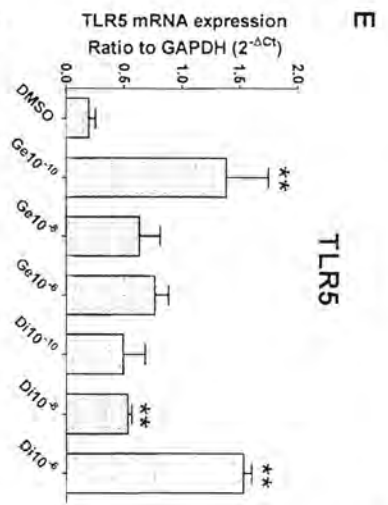
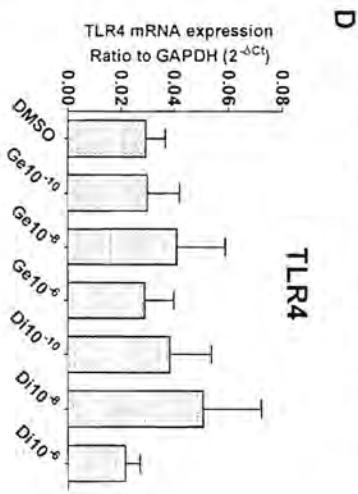
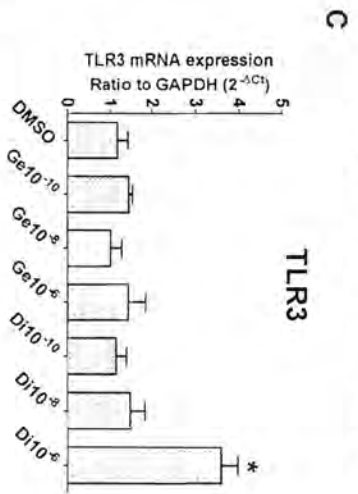
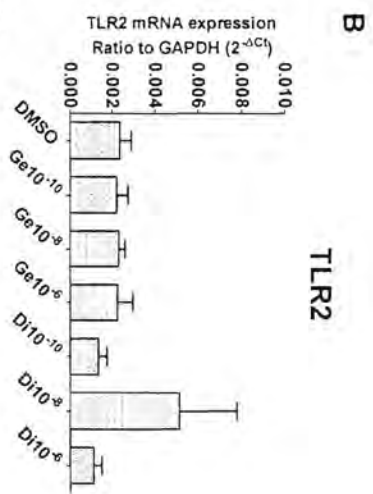
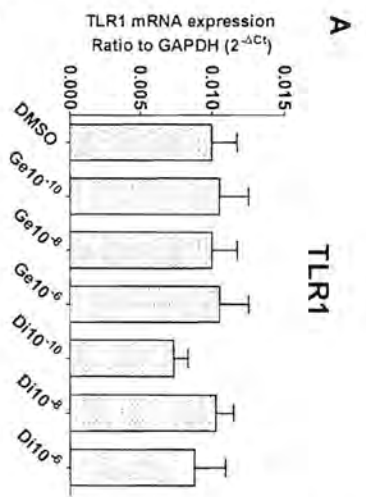
*Effect of phytoestrogen and estrogen on toll-like receptor mRNA expression*

To study whether the potent soybean phytoestrogens modulated the TLR 1 to 10 mRNA expression by using real-time PCR. In the experiment, the IMM cells were cultured for 48 h in the

estrogen-free medium in the presence of various concentrations of genistein or daidzein compared to vehicle control as indicated in the materials and methods. Porcine glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene was used for internal control and normalization. The relative quantitative expression of the studied gene to the housekeeping gene were conducted on Corbett RotorGene<sup>®</sup> 6000 (Qiagen, Germany) and SYBR<sup>®</sup> Green Evaline E4 Master Mix (GeneOn<sup>®</sup>, USA). The relative fold change of the TLR gene expression was calculated using the comparative method ( $2^{-1 \cdot \Delta CT}$ ) which normalized the threshold cycle (CT) of the TLR gene and the GAPDH gene.

The relative quantitative expressions of TLR 1 to 10 mRNA to the porcine GAPDH mRNA in response to genistein or daidzein treatment were shown in figure 2. The results in figure 2 revealed that the expression of TLR 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 or 10 mRNA was not affected by either genistein or daidzein treatment for 48h ( $p > 0.05$ ). However, IMM cell treatment with daidzein 1000 nM for 48h increased TLR3, 5 and 7 mRNA expression by 2-4 fold (Figure 2C, 2D and 2G). In addition, increased TLR5 mRNA expression was revealed in IMM cells incubated with lower concentration daidzein 10 nM, even though it showed less effective than daidzein 1000 nM ( $P < 0.05$ ) (Figure 2E).





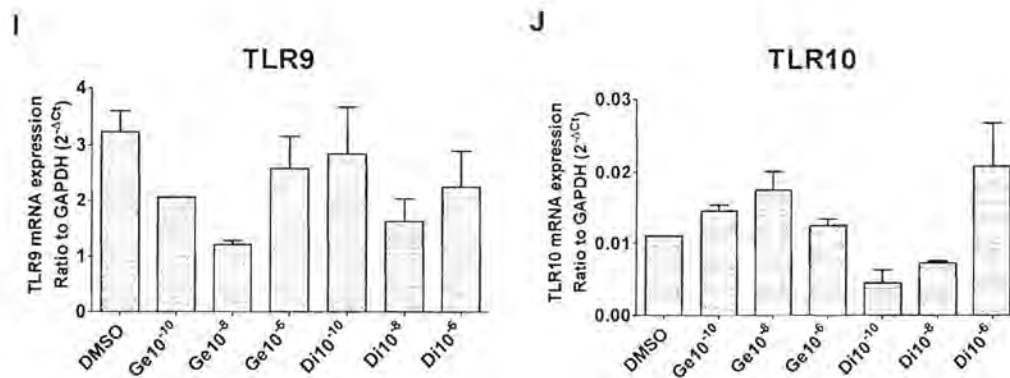
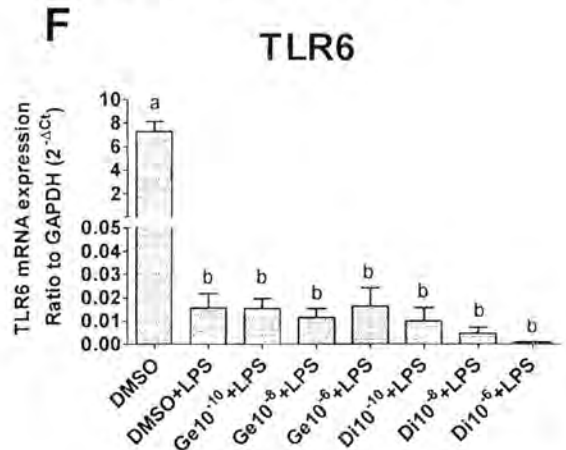
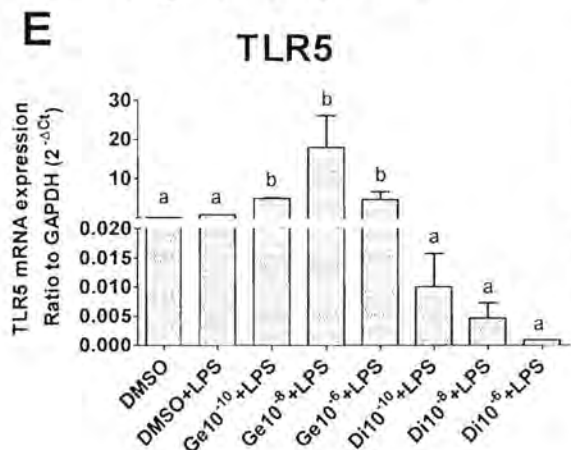
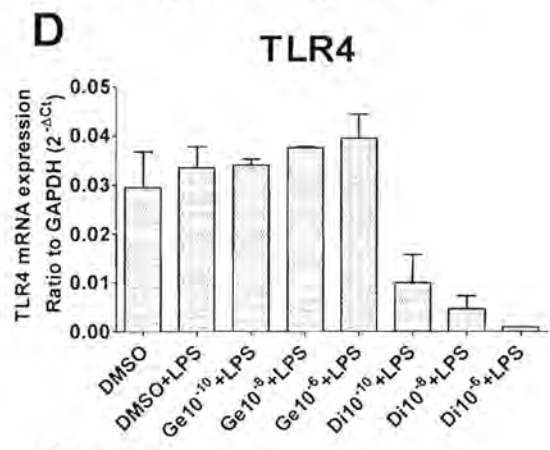
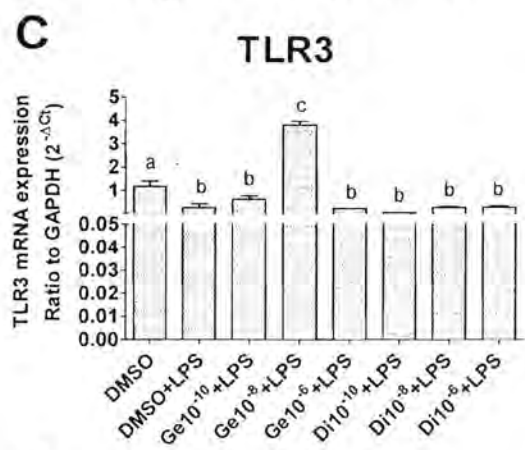
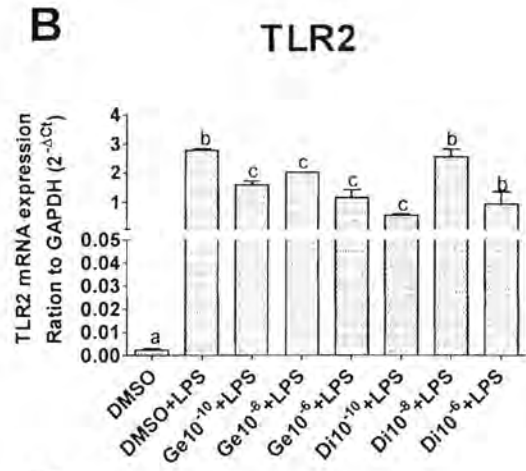
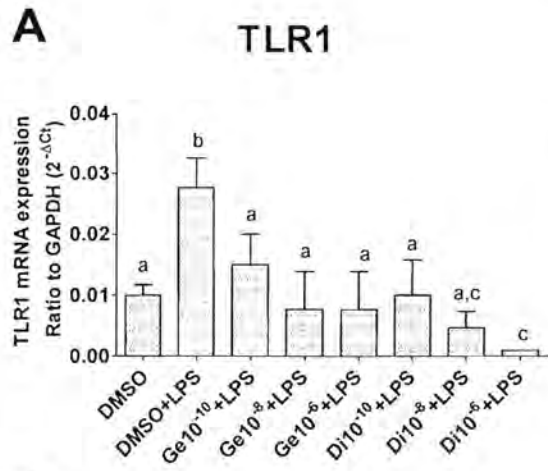


Figure 2 Effects of 48h treatment of genistein and daidzein  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mol/L compared with control (2%csFBS-DMEM + DMSO (without genistein or daidzein) on toll-like receptor (A-J) TLR-1 to 10 gene expression in immortalized porcine glandular endometrial cell culture in relative to GAPDH the housekeeping gene. Bar graphs are the mean $\pm$ SEM of the ratio of TLR of GAPDH gene expression calculated from threshold cycle (Ct) in real-time PCR analysis. ( $n = 6$  experiments in each group). \* or \*\* respectively indicates significantly different from DMSO control,  $P < 0.05$  or  $P < 0.001$  by ANOVA followed by Dunnett's test.

Result of TLR family mRNA expression in immortalized porcine endometrial epithelial cells pretreated with soybean phytoestrogens following with both LPS stimulation

#### *TLR1 mRNA expression in response to LPS*

After exposure to LPS, TLR1 mRNA expression was increased in vehicle treatment. Even though in all individuals of genistein-pretreated group found that genistein had no effect on TLR1 mRNA expression. However, the pretreatment of all individual doses of genistein following with post-stimulation of LPS revealed the relative TLR1 mRNA expression measuring



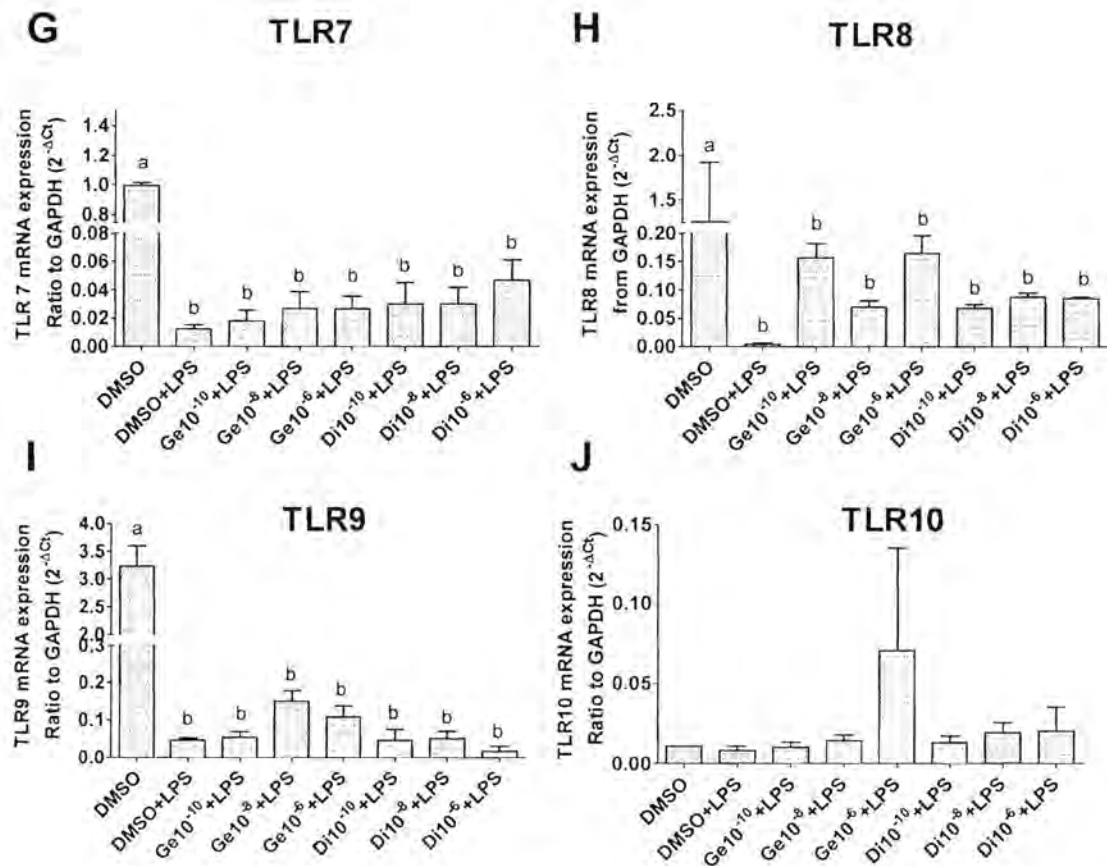


Figure 3 Effects of 48h pre-treatment with genistein, daidzein  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mol/L or DMSO on on toll-like receptor (A-J) TLR-1 to 10 gene expression in relative to GAPDH the housekeeping gene in immortalized porcine glandular endometrial cell culture inoculated with  $1 \mu\text{g/ml}$  of O111:B4 *Escherichia coli* Lipopolysaccharides (LPS). Bar graphs are the mean $\pm$ SEM of the ratio of TLR to GAPDH gene expression calculated from threshold cycle (Ct) in real-time PCR analysis. ( $n = 6$  experiments in each group). Different letter indicates significant differences from each other at  $P < 0.05$  by ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison tests.

as  $2^{-\Delta Ct}$  value was greatly decreased when compared to those of mock treatment (DMSO + LPS).

Among all individual of daidzein-pretreated group TLR1 mRNA expression displayed not much different from vehicle treatment (DMSO). Similarly, daidzein-pretreatment itself had no effect on TLR1 mRNA expression, while the pretreatment daidzein following with post-stimulation of LPS revealed the relative TLR1 mRNA expression measuring was greatly decreased and shifted to the base line which reversed the effect of LPS in increasing of TLR1 mRNA expression (Figure 3A).

#### *TLR2 mRNA expression in response to LPS*

After challenge with LPS, TLR2 mRNA expression was increased by 3 fold (Figure 3B). All IMM cells pretreated with genistein decreased the TLR2 mRNA expression response to LPS stimulation significantly ( $P < 0.05$ ; Figure 3B). However, daidzein at the concentration of 10 and 1000 nM but 0.1 nM had no effect on LPS-induced TLR2 mRNA expression.

#### *TLR3 mRNA expression in response to LPS*

In contrast to the LPS effect on TLR1 and 2 mRNA expression, LPS showed the inhibitory effect on TLR3 expression. Moreover, all phytoestrogen pretreatment except genistein at the moderate concentration (10 nM) reversed this effect (Figure 3C). In addition, it increased TLR3 mRNA expression to be higher than the endogenous TLR3 mRNA expression in the normal control.

#### *TLR4 mRNA expression in response to LPS*

In this study, after exposure to LPS, there was no alteration of TLR4 mRNA expression in IMM cells incubated in the media with or without genistein or daidzein (Figure 3D).

#### *TLR5 mRNA expression in response to LPS*

In IMM cells, post-stimulation of LPS had no effect on TLR5 mRNA expression. Instead, pretreatment with phytoestrogens genistein but not daidzein at any concentration increased TLR5 mRNA expression after 48h inoculation with LPS (Figure 3E).

#### *TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 and TLR 10 mRNA expression in response to LPS*

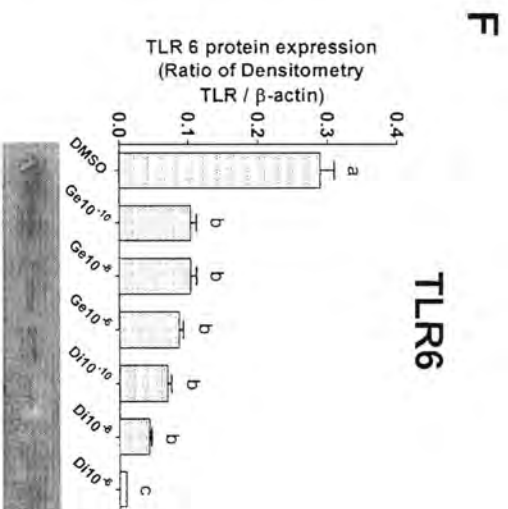
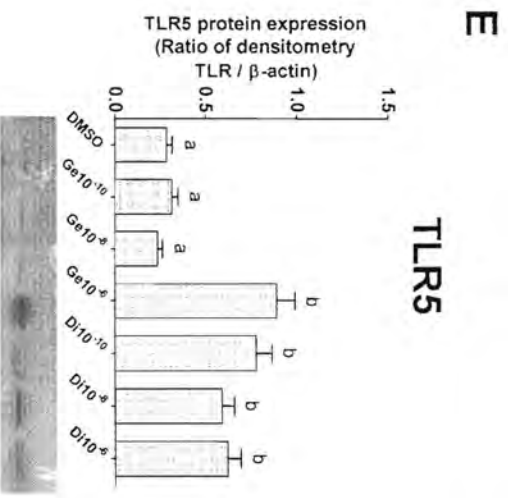
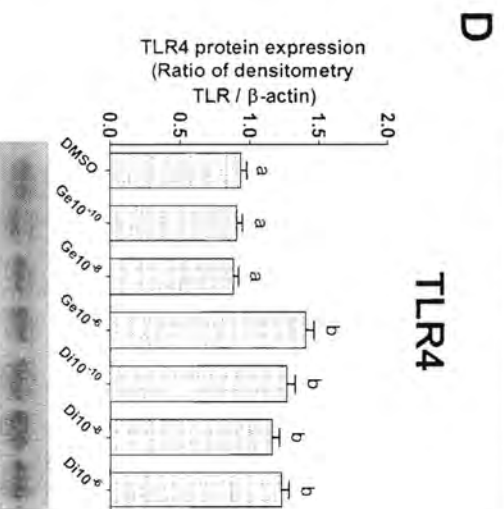
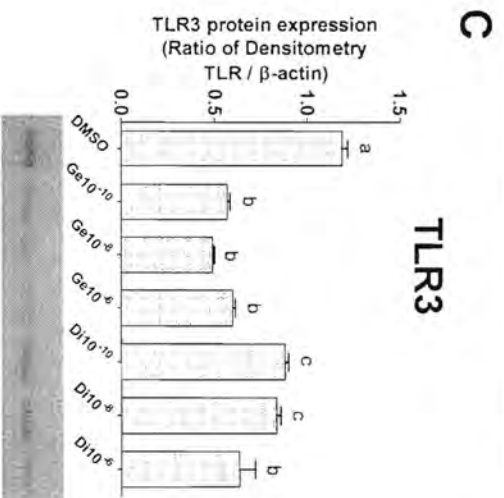
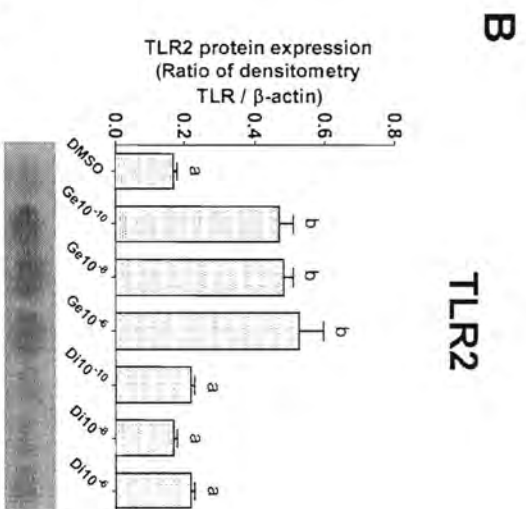
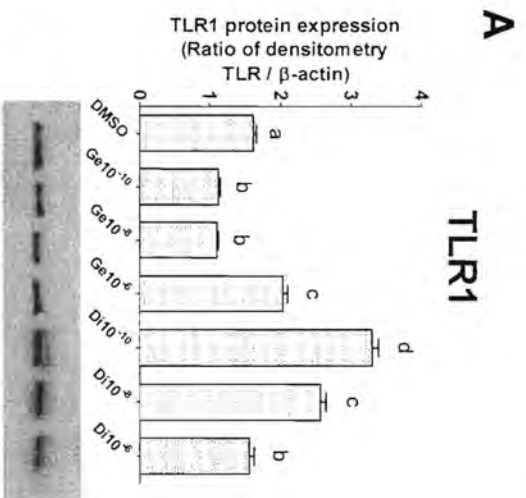
Even though TLR6 mRNA expression by IMM cells showed the highest level than any others, LPS treatment for 48h significantly suppressed (>90%) all the TLR6 gene expression (Figure 3F). None of phytoestrogen treatment could reverse this effect. The effects of LPS on the

suppression of gene expression were also revealed in TLR7, TLR8 and TLR9 but not in TLR10 (Figure 3G-3J). However, neither genistein nor daidzein pretreatment could show the significant effect on the LPS suppression.

#### *Effect of phytoestrogen and estrogen on toll-like receptor protein expression*

The next experiment was performed to characterize the TLR1 to 10 protein expression and its modulation by phytoestrogen by using semi-quantitative Western blot analysis (Figure 4). A representative Western blot as presented in figure 4 recognized the protein bands with an approximate molecular mass of 35, 32, 32, 49, 52, 42, 30, 40 and 45 kDa of TLR1 to 10 respectively. The 37 kDa band of  $\beta$ -actin protein in the IMM cells grown in different media conditions was used as an internal control. Semi-quantitative of TLR was calculated as the expression ratio of the density of TLR to  $\beta$ -actin. The results revealed the different level of the TLR protein expression which is *TLR1 > TLR3/TLR7 > TLR4/TLR8 > TLR9 > TLR6 > TLR5 > TLR2*.

Genistein and daidzein treatment for 48h shared the suppressive effect on the expression of the protein of TLR3, 6, 7, 8 and 9. In addition, all genistein treatment except high-concentration genistein (1000 nM) revealed the decrease of TLR1 expression. The stimulating effect of genistein was founded on the expression of TLR2, while the stimulating effect of daidzein was revealed on TLR1, 4 and 5 expressions (Figure 4). However TLR4 and 2, and 5 protein expression were not affected after exposure to genistein or daidzein at the concentrations of  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  M for 48 h, respectively (Figure 4). Instead, high-concentration genistein (1000 nM) increased TLR4 and 5 expression in the same degree as daidzein effects (Figure 4D and E).



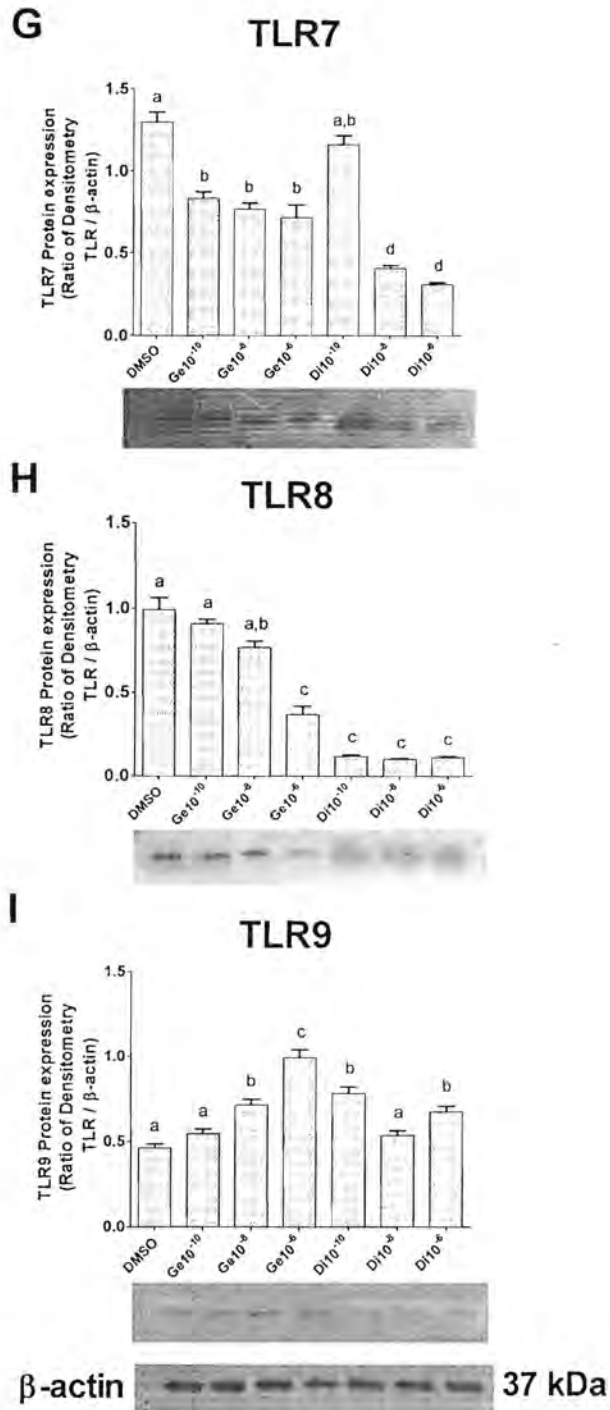


Figure 6 (A-I) Western blot analysis of TLR1 to 9 protein in the immortalized endometrial epithelial cells after treatment with genistein, daidzein  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mol/L or DMSO for 48h. The histogram shows densitometric analysis of TLR/ $\beta$ -actin protein ratio. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 monolayers. Different letter indicates significant differences from each other at  $P < 0.05$  by ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison tests.



### *Effect of genistein and daidzein on tissue endometrial resistance (TER)*

In the immortalized porcine glandular epithelium, basal value of TER before the addition of each drug did not differ significantly between the different experiments. The mean ( $\pm$ SEM) of basal TER values were  $1664 \pm 136.0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . In all experiments, the percent change in time in relation to the basal value of the each well (%change of TER from initial) responded to each substance was calculated for the effect of drug on TER. In the immortalized glandular epithelium immediately (30 min) after replaced with newly tested medium, all cells with cell culture medium alone only ( $n = 18$ ), the TER increased about 30% from the initial and gradually decreased to baseline TER within 24 h. However, the TER remained unchanged until 48h of the observation period (Figure 5). The effects of genistein and daidzein on the TER across the immortalized glandular epithelium monolayers were varied in Figure 1A and 1B, respectively. The TER value in cell treated with genistein 0.1 nM slightly decreased by 4% from the initial value during first 30 minutes. The value then remained unchanged for 2 h before decreasing again by 23% at 24 and 48 h. In the presence of higher concentration of genistein (10 or 1000 nM), the pattern of change TER values during 30 minutes to 2 hours were similar to the cells with cell culture medium alone. However, the percent changes of TER values from initial in the cells incubated with genistein 10 nM were higher than the values of all treatment at the end of time points observed in this study (48 h). The suppressive effect of genistein at the lowest concentration on TER was immediately found after 30 minutes of incubation (Fig. 1A). The decreased TER was restored to the basal TER after 1 to 2 h, however the TER was declined over again by 20% at 24 and 48 h period of treatment (Figure 5A).

Similarly, daidzein at the lowest concentration 0.1 nM decreased TER value by 30%, even though the suppressive effect were observed only at 2 h and 24 h (Figure 5B). Notwithstanding, the promoting effect of daidzein to increase the TER was found after 2 h incubation with the highest concentration of daidzein (1000 nM) (Figure 5B).

**Table 2** Effects of genistein, daidzein or DMSO treatment on transepithelial resistance (TER) across the immortalized porcine epithelium. Changes in epithelial barrier function were monitored by measuring the transepithelial resistance (TER; Ohm.cm<sup>2</sup>) at 0, 0.5, 1, 2, 24, and 48 h after the start of phytoestrogens incubation. Values are the mean±SEM of measured TER (n = 6 experiments in each group).

TER (Ohm.cm <sup>2</sup> )	0 min	30 min	60 min	120 min	1 day	2 days
Control	1664±136	1992±81	1937±85	1732±110	1626±47	1822±50
Genistein						
0.1 nM	1675±158	1409±160	1664±150	1662±158	1397±191	1490±151
10 nM	1665±140	1897±117	1813±192	1823±102	1750±95	1905±108
1000 nM	1698±129	1996±217	1933±132	1862±142	1656±146	1865±132
Daidzein						
0.1 nM	1686±109	1989±104	1913±110	1373±104	1493±63	1735±147
10 nM	1639±91	1869±124	1973±127	1948±128	1657±43	1715±109
1000 nM	1640±92	2060±51	1995±151	2068±159	1620±93	1863±109

### *Effect of genistein and daidzein on TER in cell exposure to LPS*

To further clarify the modulatory effects of genistein and daidzein on the LPS-induced epithelial disruption, the TER were continually determined following 30 min, 1, 2, 24 or 48 h of LPS exposure. After 30 min to 2 h exposure to LPS (1µg/ml), the TER of all IMM cells without drugs was increased by 10-30%. In IMM cells exposed to genistein and daidzein at 0.1 nM did not affect the increased TER value responded to LPS (Figure 6A). In contrast, IMM cells with 48 pre-treatment with higher doses of genistein 10 nM depressed the LPS-induced TER (Figure 6A). In addition, the decrease in TER was shown following the stimulation with LPS for 30 min-2 h in the IMM cells pre-treatment with genistein at the highest doses (1000 nM) in this study (Figure 6A). The significant decreased TER

responded to the LPS were also found in 2 h-post LPS stimulation in all daidzein pre-treatment (Figure 6B). At 1-2 d post-stimulation of LPS, TER of all vehicle groups (DMSO) pre-treatment turned to decrease lower than TER value prior to LPS stimulation. As seen in Figure 6A and B, the TER of control IMM cells continue to decrease throughout the last 2 days of LPS stimulation, while TER development of all IMM cells pretreated with either genistein or daidzein were restored ( $P < 0.05$ ) (Figure 6A and B).

**Table 3** Effects of 48h pre-treatment with genistein, daidzein or DMSO on transepithelial resistance (TER) across the immortalized porcine epithelium inoculated with 1  $\mu\text{g/ml}$  of O111:B4 *Escherichia coli* Lipopolysaccharides (LPS). Changes in epithelial barrier function were monitored by measuring of the transepithelial resistance (TER;  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$ ) at 0, 0.5, 1, 2, 24, and 48 h after the start of LPS stimulation. Values are the mean  $\pm$  SEM of measured TER ( $n = 6$  experiments in each group).

TER ( $\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$ )	After LPS Stimulation					
	0 min	30 min	60 min	120 min	1 day	2 days
Control	1822 $\pm$ 50	2279 $\pm$ 139	2392 $\pm$ 151	2195 $\pm$ 150	1258 $\pm$ 46	1379 $\pm$ 60
Genistein						
0.1 nM	1490 $\pm$ 151	1702 $\pm$ 244	1881 $\pm$ 247	1805 $\pm$ 226	1991 $\pm$ 101	1832 $\pm$ 134
10 nM	1905 $\pm$ 108	1995 $\pm$ 244	1924 $\pm$ 245	1905 $\pm$ 226	1976 $\pm$ 208	1774 $\pm$ 44
1000 nM	1865 $\pm$ 132	1537 $\pm$ 141	1546 $\pm$ 129	1397 $\pm$ 135	1825 $\pm$ 70	1660 $\pm$ 27
Daidzein						
0.1 nM	1735 $\pm$ 147	1812 $\pm$ 168	1315 $\pm$ 209	1287 $\pm$ 208	1670 $\pm$ 146	1855 $\pm$ 65
10 nM	1715 $\pm$ 109	1874 $\pm$ 250	1846 $\pm$ 253	1460 $\pm$ 158	1981 $\pm$ 57	1992 $\pm$ 101
1000 nM	1863 $\pm$ 109	2361 $\pm$ 162	2459 $\pm$ 217	1506 $\pm$ 192	2162 $\pm$ 115	2112 $\pm$ 242

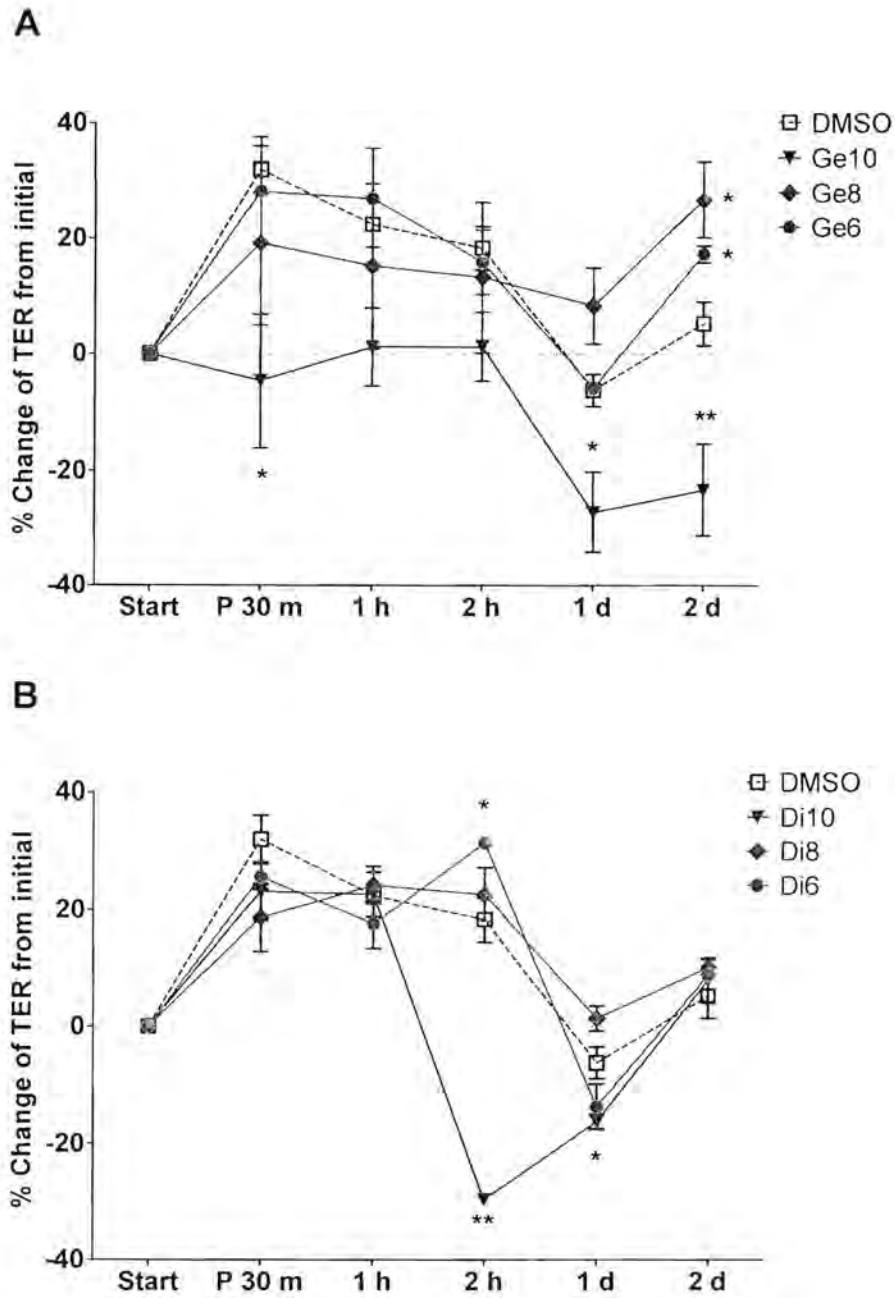


Figure 5 Effects of  $10^{-10}$  (▼),  $10^{-8}$  (◆) and  $10^{-6}$  mol/L (●) (A) genistein or (B) daidzein compared with control (□), 2%csFBS-DMEM + DMSO (without genistein or daidzein) on transepithelial resistance (percent changes from basal values) across the immortalized porcine epithelium. Changes in epithelial barrier function were monitored by measuring the transepithelial resistance (TER) at 0, 0.5, 1, 2, 24, and 48 h after the start of incubation. Values are the mean±SEM ( $n = 6$  experiments in each group). \* or \*\* respectively indicates different from control at each time point,  $P < 0.05$  or  $P < 0.001$ .

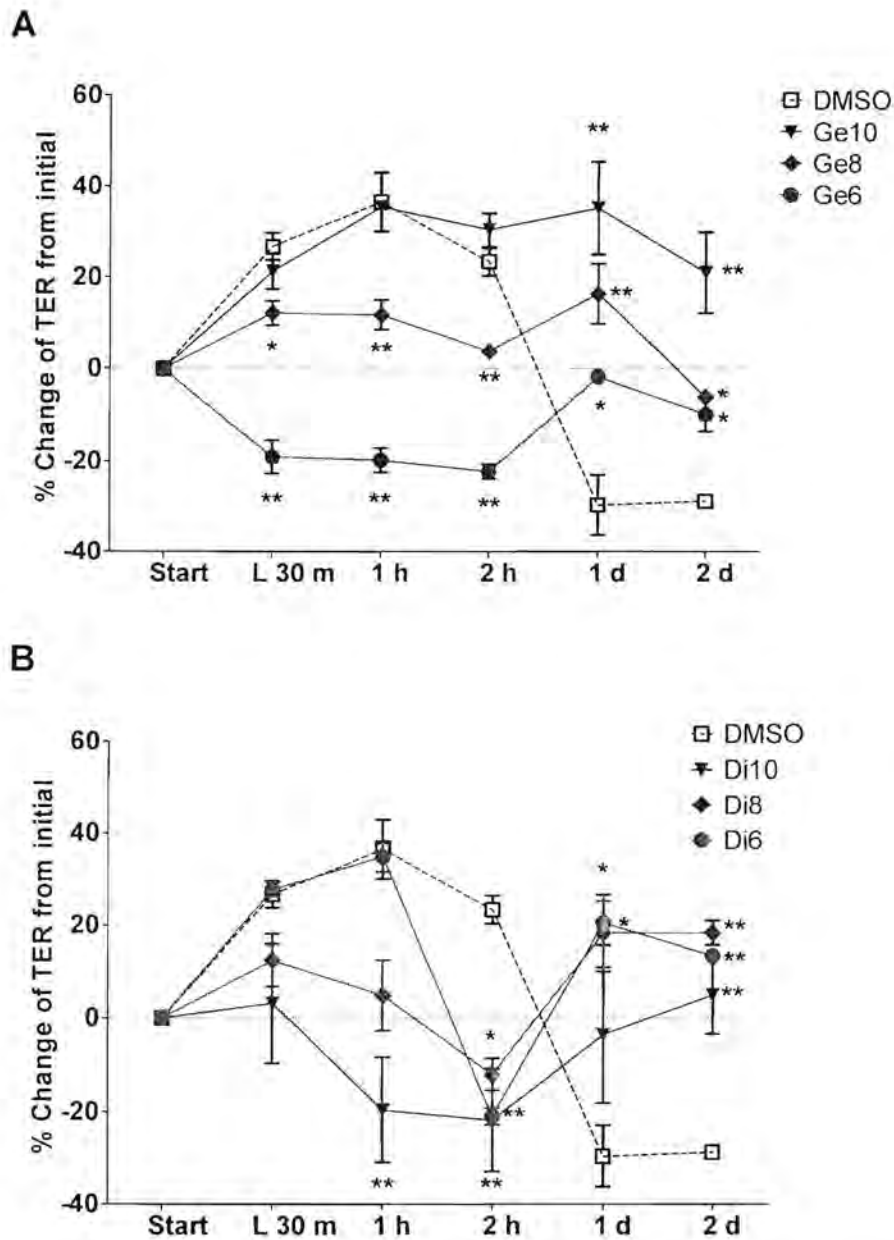


Figure 6 Effects of  $10^{-10}$  (▼),  $10^{-8}$  (◆) and  $10^{-6}$  mol/L (●) (A) genistein or (B) daidzein compared with control (□), 2%csFBS-DMEM + DMSO (without genistein or daidzein) on prevention of LPS-induced destruction of intestinal epithelial barrier function. Immortalized glandular porcine epithelium was incubated with 1  $\mu$ g/ml of O111:B4 *Escherichia coli* LPS after 48h of phytoestrogen treatment. Changes in epithelial barrier function were monitored by measuring the transepithelial resistance (TER) at 0, 0.5, 1, 2, 24, and 48 h after the start of LPS stimulation. Values are the mean $\pm$ SEM ( $n = 6$  experiments in each group). \* or \*\* is  $P < 0.05$  or  $P < 0.001$  different from control at each time point, respectively.

## DISCUSSION

The mucosal epithelial cells lining the uterine cavity are a component of the innate immune system and the first line of host defense against infection. Rapid innate immune defense against infection involve the recognition of invading pathogens by a specific pattern recognition receptors recently attributed to the family of Toll-like receptors (TLR). The TLR plays a critical role in cell activation in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from viruses, bacteria, fungi and protozoa. It has been expressed in innate immune cells (dendritic cells, macrophage and NK cells), adaptive immune cells (lymphocytes) as well as non-immune cells (epithelial cells, endothelial cells and fibroblast) (Kawai and Akira, 2010). Although the other epithelial tissues and cell lines, such as airway, gastric and intestinal epithelial cells as well as the reproductive tract (Cario *et al.*, 2000; Melmed *et al.*, 2003; Muir *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Fichorova *et al.*, 2003) have been shown to express several TLR genes, little has been known concerning the mRNA and protein expressions of TLR expression and its modulation by estrogen and estrogen-like substances in primary culture of porcine endometrial epithelial cells.

In the present study, we found that the immortalized porcine endometrial epithelial cells revealed different patterns of all TLRs-1 to -10 mRNA expression identified by real-time RT-PCR. Although the TLR-6 mRNA was not detectable by conventional RT-PCR, the normalized TLR-6 to GAPDH mRNA appeared to be the most expressed by real-time PCR. This non-detectable TLR-6 was likely due to unknown problems associated with degraded PCR products at 40 cycles. By using the quantitative real-time PCR, the PCR products of TLR-3, -6, -7, -8, and -9 were much higher expressed than those of TLR1, 2, 4, 5 and 10 (Figure 1), suggesting the important role of TLR in mediating innate immunity in the endometrial epithelium. The findings of all subtypes of TLRs family indicated that the endometrial epithelial cells could recognize all identified pathogenic components of viruses,

bacteria, fungus and protozoa. The presence of TLR in porcine endometrial epithelial cells was consistent with those that have been identified in epithelial cell line of the female reproductive tract, but with different subtypes regarding to cell type, tissue and species specific. For example, vaginal and cervical epithelial cell lines have been reported to express TLR-1 to -6, while primary endocervical epithelial cells expressed TLR-1 to -3 and TLR-6 (Fichorova *et al.*, 2003). Similar findings of different subtypes of TLRs mRNA expressions have also been reported in human uterine epithelial cell lines, ECC1, RL-95 and Ishikawa cells (Young *et al.*, 2004; Schaefer *et al.*, 2004; 2005) and bovine endometrial tissues and epithelial cells (Davies *et al.*, 2008). Other and our observations suggested the important role of TLR in recognition of a variety of PAMPs in the endometrium.

Viruses and bacteria are the most common causes of sexually transmitted diseases, endometritis and reproductive tract infection. Various parts of specific viruses and bacteria are recognized by TLR3, 5 and 7 affected by genistein or daidzein, respectively. TLR-3 is implicated in the recognition of viral nucleic acids or mRNA from apoptotic cells, and TLR-4 recognizes bacterial endotoxin and multiple endogenous ligands which are the main cause of the infection of epithelial cells lining the female reproductive tract (Akira *et al.*, 2006). Thus, the modulation of these TLR expressions by estrogen and phytoestrogens, genistein and daidzein was further examined. In the present study, the similar pattern of TLRs mRNA expression was observed in the endometrial epithelial cells grown in the estrogen-deprived medium which was composed of phenol red free medium with low level of serum (2%csFBS) compared to the standard medium (5%FBS) (data not shown). Under this estrogen-deprived medium, the treatment of the IMM cells with daidzein  $10^{-6}$  M, but not genistein, for 48 h significantly up-regulated the expression of TLR-3 mRNA, indicating a possible role of daidzein in the protection of endometrial against the invading virus. Since daidzein has been shown to exert weak estrogenic activity mediated through estrogen receptor, this finding also raised the possibility that the modulatory effect of daidzein on the TLR-3 gene expression was

independent of estrogen receptor binding. However, the exact mechanical effect of daidzein on TLR mediating innate immunity in the endometrium is not known. TLR5 is also up-regulated by genistein and daidzein, which may increase implication for the response of flagellin founded in the pathogens that have flagella. Moreover, TLR7 mRNA expression is increased responded to soybean phytoestrogen suggesting the beneficial effect on the protection of endometrial through the stimulation of TLR7. However, TLR7 is the receptor for the pathogen, but it recognizes the anti-viral drugs imidazoquinolines, which are guanosine-based drugs that induce an antiviral response *in vivo*. Recently, TLR7 was indicated as the new sensor for viral infection. Stimulation of TLRs 7 or 9 causes a type I IFN response to neutralize the viral particles (Crozet and Beutler, 2004)

In addition to mRNA expression, the protein expressions of TLR-3, 5 and 7 of the IMM cells were not affected by genistein and daidzein at same as the phytoestrogen effects on mRNA expression. On the other hand, daidzein  $10^{-6}$  M was shown to decrease the TLR-3 protein while having a tendency to increase the TLR-4 protein expression. Although the functional relevance of TLRs expression and health-related disease has not well understood, the up-regulation of TLR-4 proteins by phytoestrogen could be an evidence for the application of these substances to protect the endometrium against bacterial infection, especially endotoxin from *Escherichia coli*, commensal bacteria within the intestine. These findings indicated the potential role of phytoestrogen genistein and daidzein on modulation of the TLR gene and protein expression. This study demonstrates that the two potent soybean phytoestrogen, genistein and daidzein, enhance the barrier function in IMM cell monolayers. The enhancing effect of genistein and daidzein may be resulting from the promotion of the assembly of TJ proteins, claudin-1, occludin, and ZO-2, and the expression of claudin-4 through the inhibition of a novel PKC $\delta$  isoform, which revealed in other flavonoids such as quercetin and myricetin are well-known antioxidants (Suzuki and Hara, 2009). Therefore the alteration of tight junction gene and protein expression by the effective dose of genistein or daidzein



should be considered in future studies. In this study, all genistein and daidzein pre-treatment restored the decreased of TER induced by LPS. In IMM cells, LPS inoculation showed the modulatory effects on TER and TLR expression suggesting that IMM cells expressed the complex system, the toll-like receptor 4/CD14/MD-2 receptor complex necessary to detect LPS. After detection of LPS by TLR system on epithelial cells, it may secrete the specific chemical substances such as PGE2 or cytokines, leading to the damage of tight junction (Degraaf et al., 2014). Genistein and daidzein may oppose the effects of LPS-induced proteolytic system by suppressing the expression of toll-like receptor 4/CD14/MD-2 receptor complex. However, in this study TLR4 receptor after LPS stimulation was affected by phytoestrogen treatment.

The present finding provided the evidence that the immortalized porcine endometrial epithelial cells exerted a regulatory role in host defense against invading pathogens through the expression of TLRs. The differential expression of TLR proteins by genistein and daidzein suggests the potential role of soybean phytoestrogen on modulation of the rapid mucosal defense mechanism in endometrial epithelium. The up-regulation of TLR could be therapeutic application of phytoestrogen to protect the female reproductive tract from invading specific pathogens.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was fully supported by research grants from Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in physical year of 2555. We appreciate Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for lab equipment used in this research. We wish to thank Mr. Pongpat Kiatprasert, Miss Norathee Buathong and Mr. Yotesawee Srisomboon for their assistance in this study.

## REFERENCES

1. Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, et al. Menstrual cycle-dependent changes of toll-like receptors in endometrium. *Hum Reprod* 2007;22:586-93.
2. Agrawal V, Jaiswal MK, Jaiswal YK. LPS-Induced Implantation Failure: One of the Causes of Female Infertility. 2013; *Med J Obstet Gynecol* 1(3): 1014.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
4. Birukova AA, Wu T, Tian Y, Meliton A, Sarich N, Tian X, Leff A, Birukov KG. Iloprost improves endothelial barrier function in LPS-induced lung injury. *Eur Respir J* 2013;41: 165-76.
5. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7.
6. Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine K, Okada M, Chaichantipyuth C. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur," *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J Nat Prod* 2000;63:173-5.
7. Crozat K, Beutler B. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6835-6.
8. Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2008;6:53-4.
9. Degraaf AJ, Zastona Z, Bourdonnay E, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 reduces Toll-like Receptor 4 Expression in Alveolar Macrophages by Inhibition of Translation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 [Epub ahead of print]
10. Donofrio G, Ravanetti L, Cavarani S, Herath S, Capocéfalo A, Sheldon IM. Bacterial infection of endometrial stromal cells influences bovine herpesvirus 4 immediate early gene activation: a

- new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. *Reproduction* 2008; 136:361-366.
11. Fichorova RN, Cronin AO, Lien E, Anderson DJ, Ingalls RR. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol* 2002;168:2424-32.
  12. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2</sub>alpha to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology*. 2009;150(4):1912-20.
  13. He D, Su Y, Usatyuk PV, Spannhake EW, Kogut P, Solway J, Natarajan V, Zhao Y. Lysophosphatidic acid enhances pulmonary epithelial barrier integrity and protects endotoxin-induced epithelial barrier disruption and lung injury. *J Biol Chem*. 2009;284:24123-32.
  14. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, et al. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Immunol* 2007;74:53-60.
  15. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
  16. Knapczyk KS, Durlej M, Bilinska, Slomczynska M. Immunohistochemical studies on the proliferative marker Ki-67 and estrogen receptor alpha (ER-alpha) in the uterus of neonatal and immature pigs following exposure to flutamide. *Acta Histochem* 2010;113:534-41.
  17. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *BBRC* 2009;388:621-5.
  18. Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;15:32e69-77. Epub Review.
  19. Melmed G, Thomas LS, Lee N, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 2003;170:1406-15.

20. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez M, Van Heeckeren A, Prince A. Toll like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;30:777-830.
21. Ochiel DO, Fahey JV, Ghosh M, Haddad SN, Wira CR. Innate immunity in the female reproductive tract: role of sex hormones in regulating uterine epithelial cell protection against pathogens. *Curr Womens Health Rev* 2008;4:102-17.
22. Schaefer TM, Desouza K, Fahey JV, Beagley KW, Wira CR. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology* 2004;112:428-36.
23. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol* 2005;174:992-1002.
24. Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One* 2010; 5:e9192.
25. Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:32552-60.
26. Suzuki T, Hara H. Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *J Nutr* 2009;139:965-74.
27. Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:544-65.

28. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005;206:306-35.
29. Yao XD, Fernandez S, Kelly MM, Kaushic C, Rosenthal KL. Expression of toll-like receptors in murine vaginal epithelium is affected by the estrous cycle and stromal cells. *J Reprod Immunol* 2007;75:106-19.
30. Young SL, Lyddon TD, Jorgenson RL, Misfeldt ML. Expression of toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:67-73.
31. Zhang R, Li Y, Wang W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr Cancer* 1997;29(1):24-8.

APPENDIX

## ประวัติคณะผู้วิจัย

### 1. หัวหน้าโครงการ

#### 1 ชื่อ นางสาวสุทธาสินี ปุญญโชติ

Miss Sutthasinee Poonyachoti

#### 2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 1007 00717 41 6

#### 3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

#### 4. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอรัญญิก กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-9742

โทรสาร 02-252-0737

### 5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา, อักษรย่อ	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2533	ปริญญาตรี, สพ.บ	สัตวแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2540	Master of Sciences, M.Sc	Veterinary Medicine	University of Minnesota	USA
2543	Doctor of Philosophy, Ph.D.	Physiology	University of Minnesota	USA

### 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

การขนส่งไอออนผ่านเซลล์เยื่อ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท

### 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

โครงการวิจัย	ปีงบประมาณ	ประเภททุน	วงเงินงบประมาณ	เลขที่สัญญา
1. บทบาทของสาร Opioid และ Opioid receptors ต่อการเปลี่ยนแปลงระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดยระบบประสาท	2544 - 46	ทุนนักวิจัยรุ่น ใหม่ สกว	480,000	PDF/29/2544
2. การศึกษาผลของ Dexamethasone ต่อระบบปกป้องกันการเคลื่อนผ่านของเชื้อแบคทีเรีย Salmonella Enteritidis เข้าสู่ลำไส้ส่วน Peyer's patch ของหนูขาว	2544 - 46	ทุนอุดหนุนการ วิจัย คณะสัตว แพทยศาสตร์ จุฬาฯ	100,000	
3. การศึกษาผลของสารบาราคอลซึ่งสกัดจากสมุนไพรหลักในการลดจำนวนเชื้อ	2544 - 46	ทุนอุดหนุนการ วิจัย คณะสัตว	100,000	

<i>Salmonella</i> Enteritidis ที่เข้าร่างกายในไก่		แพทยศาสตร์ จุฬาฯ		
4. บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ชนิดที่ ตอบสนองต่อความเครียดในการเปลี่ยนแปลง ระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดย กลไกผ่านระบบประสาทชนิดที่รับรู้ความรู้สึก เบื้องต้น	2547 – 50	ทุนเมธีวิจัย สกว	1,200,000	RSA4780010
5. การศึกษาเปรียบเทียบผลของความเครียด ระยะสั้น และระยะเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลง ระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะเจาะจงของเยื่อ บุทางเดินอาหาร	2547 - 50	ทุนรัชดาภิเษก สมโภช จุฬาฯ	180,000	
6. บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ต่อพฤติกรรม การกินหวานในหนูขาวที่ได้รับความเครียดเป็น เวลานาน	2551 – 52	ทุน 90 ปี จุฬาฯ	104,000	
7. บทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการ เปลี่ยนแปลงระบบประสาทรับรู้ความรู้สึกใน กระดูกของหนูเพศเมียที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กระดูกพรุน	2551 – 53	ทุนบัณฑิต วิทยาลัย จุฬาฯ และทุนเมธีวิจัย อาวุโส (ศ.ดร. นทีทิพย์ กฤษณามระ	120,000	หัวหน้า โครงการวิจัย
8. ผลของเจนิสทีอิน และไดอะติซินฮอร์โมนต่อการ เปลี่ยนแปลงระบบประสาทซิมัลแตนด์ที และแคลซิโทนินยีนรีเลทเปปไทด์ในปมประสาท ไซลันหลังของหนูเพศผู้	2553-54	ทุนบัณฑิต วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	100,000	หัวหน้า โครงการวิจัย

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

- 7.3.1 Brown DR, Poonyachoti S, Kowalski TR, Okinski MA, Pampusch MS, Elde RP, Murtaugh MP. *delta*-Opioid receptor mRNA expression and immunohistochemical localization in porcine ileum. *Digestive Disease and Sciences* 1997;43:1402-10.
- 7.3.2 Poonyachoti S, Brown DR. Potentiation of anaphylaxis in guinea pig ileal mucosa by a selective delta-opioid agonist. *European Journal of Pharmacology* 1998;379:81-5.
- 7.3.3 Poonyachoti S, Portoghese PS, Brown DR. Characterization of opioid receptors modulating neurogenic contractions of circular muscle from porcine ileum and evidence that *delta*- and *kappa*-opioid receptors are



- coexpressed in myenteric neurons. *Journal of Pharmacological Experiments and Therapeutics* 2001;20: 672-9.
- 7.3.4 Poonyachoti S, Portoghese PS, Brown DR. Pharmacological evidence for 7-bezylidenenaltrexone-preferring opioid receptor mediating the inhibitory actions of peptidic *delta*- and *mu*-opioid agonists on neurogenic ion transport in porcine ileal mucosa. *Journal of Pharmacological Experiments and Therapeutics* 2001;297:672-9.
- 7.3.5 Poonyachoti S, Kulkarni-Narla A, Brown DR. Chemical coding of neurons expressing *delta*- and *kappa*-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cells and Tissues Research* 2002;307: 23-33.
- 7.3.6 Deachapunya C, Thongsaard W, Poonyachoti S. Barakol suppresses norepinephrine-induced inhibition of spontaneous longitudinal smooth muscle contractions in isolated rat small intestine. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;101(1-3):227-32.
- 7.3.7 Deachapunya C, Poonyachoti S, Thongsaard W, Krishnamra N. Barakol extracted from *Cassia siamea* stimulates chloride secretion. *Journal of Pharmacology, Experimental and Therapeutics* 2005;314(2):732-7.
- 7.3.8 Pandaranandaka J, Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S. Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. *Physiology, Behavior and Brain Research* 2006;87:828-35.
- 7.3.9 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamra N. Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *Journal of Endocrinology* 2008;197:575-82. (impact factor 3.0)
- 7.3.10 Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S, Tuanudom R, Deachapunya C. Effects of *Pueraria mirifica*, phytoestrogens and 17 $\beta$ -estradiol on growth and expression of ER $\alpha$  in primary culture of porcine endometrial epithelial cells. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants. *Acta Horticulturae* 2008;178:67-72.
- 7.3.11 Pandaranandaka J, Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S. Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. *Behavior and Brain Research* 2009;198:142-8.
- 7.3.12 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamara N. Site-specific regulation of ion transport by prolactin in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012., 15;302(1):G1199-206.

7.3.13 Poonyachoti S, Deachapunya C. Modulatory effects of phytoestrogens on the expression of Fas ligand and the release of cytochrome C in normal and cancerous endometrial cells. *J Med Assoc Thai.* 2012;95 Suppl 12:S105-12.

7.3.14 Deachapunya C, Poonyachoti S. Activation of chloride secretion by isoflavone genistein in endometrial epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(5):1473-86.

7.1 งานวิจัยที่อยู่ในระหว่างดำเนินการ

7.1.1 ผลของสารเจนิสทีนและไดอะดิซินต่อการหลั่งไซโตคายน์ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคในเซลล์เยื่อบุมดลูกสุกร(หัวหน้าโครงการวิจัย) ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระยะเวลา 1 ปี (1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2557) ทำการวิจัยแล้วเสร็จ ประมาณ 75%

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ นางสาวฉัตรศรี เตชะปัญญา

Miss Chatsri Deachapunya

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 1005 00345 11 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ถนนสุขุมวิท 23 คลองเตยเหนือ กรุงเทพฯ ๑ 10110

โทรศัพท์ 02-649-5374, 260-2233-4 ต่อ 4701

โทรสาร 02-260-1533

E-mail chatsri@swu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา, อักษรย่อ	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2526	ปริญญาตรี, วท.บ (เกียรตินิยม อันดับ 1)	พยาบาล	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2530	ปริญญาโท, วท.ม	สรีรวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2541	Doctor of Philosophy, Ph.D.	Animal Physiology	University of Minnesota	USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

การขนส่งไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุ ระบบทางเดินอาหาร

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

โครงการวิจัย	ปีงบประมาณ	ประเภททุน	วงเงิน งบประมาณ	เลขที่สัญญา
1. ฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลในการลด ความเครียดในหนู	2543	งบรายได้ มศว	90,000	14/2543 (หัวหน้า โครงการ)
2. การศึกษาบทบาทของแคลเซียมต่อการ ขนส่งไอออนในเซลล์เยื่อมดลูก	2543 - 45	ทุนวิจัยหลัง ปริญญาเอก สกว	400,000	PDF/60/2543 (หัวหน้า โครงการ)
3. การศึกษาผลของสารสกัดบาราคอลต่อ การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ถูกระตุ้น ด้วยไฟฟ้าในลำไส้เล็กส่วนอืดของหนู	2544	งบรายได้ มศว	169,000	44/2544 (หัวหน้า โครงการ)
4. ผลของภาวะเครียดชาวต่ออัตราการเจริญ ของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของมดลูก (Ishikawa cells)	2544	งบประมาณ แผ่นดิน	200,000	109/2544 (หัวหน้า โครงการ)
5. ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด จากขี้เหล็กในการแก้ไขและป้องกันความ ผิดปกติของทางเดินอาหาร	2546 - 48	ทุนพัฒนา ศักยภาพใน การทำงาน วิจัยของ อาจารย์รุ่น ใหม่ สกว	480,000	MRG4680196 (หัวหน้า โครงการ)
6. การใช้เซลล์เยื่อมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด ไม่ตายเป็นแบบการศึกษาคุณสมบัติของ สารที่มีการออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตร เจน	2548 - 49	งบประมาณ แผ่นดิน	300,000 200,000	023/2548 031/2549 (หัวหน้า โครงการ)
7. บทบาทของสารไฟโตเอสโตรเจนในการ เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการขับหลังของเยื่อ มดลูกที่เกิดจากภาวะฮอร์โมนเพศ บกพร่อง	2550	งบประมาณ แผ่นดิน	400,000	001/2550 (หัวหน้า โครงการ)
8. บทบาทของเอสโตรเจนและสารไฟโต เอสโตรเจนในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ การขนส่งสารน้ำและอิเล็กโทรไลต์และ ระบบป้องกันเยื่อเมือกของเซลล์เยื่อ มดลูก	2549 - 52	ทุนพัฒนา ศักยภาพใน การทำงาน วิจัยของ อาจารย์รุ่น กลาง สกว	1,200,000	RMU4980026 (หัวหน้า โครงการ)
9. บทบาทของสารไฟโตเอสโตรเจนต่อการ เปลี่ยนแปลงระบบฟอสและฟอสไลแกน ของการตายแบบออปอโตซิสในเซลล์เยื่อ	2551	งบประมาณ แผ่นดิน	547,000	020/2551 (หัวหน้า โครงการ)

มุมมองปกติ				
10. การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงการขับหลังของ secretory immunoglobulin A (sIgA) ในการป้องกันการเคลื่อนผ่านของเชื้อแบคทีเรีย Salmonella Enteritidis	2551	งบรายได้ มศว	285,000	035/2551 (หัวหน้า โครงการ)
11. ฤทธิ์ยับยั้งและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรแลคตินในการควบคุมการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ในลำไส้ใหญ่ของหนู	2552-53	เงินรายได้ มหาวิทยาลัย (เงินรายได้ ศูนย์ การแพทย์ฯ)	300,000	325/2552 (หัวหน้า โครงการ)
12. ฤทธิ์ยับยั้งของสารไฟโตเอสโตรเจนในการควบคุมการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ในเซลล์เยื่อบุผนังเพาะเลี้ยงชนิดไม่ตาย	2552-53	งบรายได้ มศว	250,000	374/2552 (หัวหน้า โครงการ)
13. ฤทธิ์ยับยั้งและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรแลคตินในการควบคุมการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ในลำไส้ใหญ่ของหนู	2553-54	เงินรายได้ มหาวิทยาลัย (เงินรายได้ ศูนย์ การแพทย์ฯ)	300,000	278/2553 (หัวหน้า โครงการ)

### 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

- 7.3.1 Krishnamara N, Deachapunya C, Limlomwongse L. Biliary calcium and bile acid secretion in intact and TPTX rats with varying plasma calcium concentration. *Digestive Disease and Science* 1988;33(6):685-691.
- 7.3.2 Wettanasirichaigoon S, Pongsakorn S, Deachapunya C, Wetchasit P. Comparative study on absorptive ability between simple and strangulated intestinal obstruction: an experimental study. *Thai Journal of Surgery* 1992;13(4):1-6.
- 7.3.3 Pongsakorn S, Deachapunya C, Wetchasit P. The role of royal jelly on blood glucose regulation of alloxan-induced diabetic rats. *Royal Thai Army Medical Journal* 1993;46(2):77-80.
- 7.3.4 Deachapunya C, Thongsaard W, Bennett GW, Marsden CA. The behavioural study of *Cassia siamiae*. *Srinakharinwirot R&D Journal* 1993;7:38-9.
- 7.3.5 Thongsaard W, Deachapunya C, Pongsakorn S, Boyd EA, Bennett GW, Marsden CA. Barakol: a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamiae*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996;53(3):753-758.

- 7.3.6 Vetter AE, Deachapunya C, O'Grady SM. Na<sup>+</sup> absorption across endometrial epithelial cells is stimulated by cAMP-dependent activation of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel. *Journal of Membrane Biology* 1997;160:119-26.
- 7.3.7 Deachapunya C, O'Grady SM. Regulation of chloride secretion across porcine endometrial epithelial cells by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Journal of Physiology* 1998;508:31-47.
- 7.3.8 Deachapunya C, Palmer-Densmore M, O'Grady SM. Insulin stimulates transepithelial sodium transport by activation of a protein phosphatase that increases Na-K ATPase activity in endometrial epithelial cells. *Journal of General Physiology* 1999;114:561-74.
- 7.3.9 Deachapunya C, O'Grady SM. Epidermal growth factor regulates the transition from basal sodium absorption to anion secretion in cultured endometrial epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 2001;186:243-50.
- 7.3.10 Palmer-Densmore M, Deachapunya C, O'Grady SM. UTP-dependent inhibition of Na absorption requires activation of PKC in endometrial epithelial cells. *Journal of General Physiology* 2002;120(6):897-906.
- 7.3.11 Deachapunya C, Thongsaaard W, Poonyachoti S. Barakol suppresses norepinephrine-induced inhibition of spontaneous longitudinal smooth muscle contractions in isolated rat small intestine. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101(1-3):227-32.
- 7.3.12 Deachapunya C, Poonyachoti S, Thongsaaard W, Krishnamra N. Barakol extracted from *Cassia siamea* stimulates chloride secretion. *Journal of Pharmacology, and Experimental Therapeutics* 2005;314(2):732-7.
- 7.3.13 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamra N. Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *Journal of Endocrinology* 2008;197:575-82.
- 7.3.14 Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S, Tuanudom R, Deachapunya C. Effects of *Pueraria mirifica*, phytoestrogens and 17β-estradiol on growth and expression of ERα in primary culture of porcine endometrial epithelial cells. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants. *Acta Horticulturae* 2008;178:67-72.
- 7.3.15 Deachapunya C, Thongsaaard W. Behavioral effects of acute and chronic oral administration of barakol in rats. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2009;92(Suppl.3):S29-37.
- 7.3.16 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamara N. Site-specific regulation of ion transport by prolactin in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012., 15;302(1):G1199-206.

7.3.17 Poonyachoti S, Deachapunya C. Modulatory effects of phytoestrogens on the expression of Fas ligand and the release of cytochrome C in normal and cancerous endometrial cells. J Med Assoc Thai. 2012;95 Suppl 12:S105-12.

7.3.18 Deachapunya C, Poonyachoti S. Activation of chloride secretion by isoflavone genistein in endometrial epithelial cells. Cell Physiol Biochem. 2013;32(5):1473-86.

8. งานวิจัยที่อยู่ในระหว่างดำเนินการ

1. ฤทธิ์ระยะยาวของสารเจนีสเทอินต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนขนส่งไอออนในเซลล์เยื่อบุมดลูกเพาะเลี้ยงชนิดไม่ตาย (ทำการวิจัยแล้วเสร็จประมาณ 70%)