



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาคูณสมบัติและหน้าที่ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี

ต่อโปรตีนบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์

โดย

รศ.ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ

พฤษภาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาคูณสมบัติและหน้าที่ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี

ต่อโปรตีนบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์

รศ.ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : BRG5180012

**Project Title : Characterization of monoclonal antibodies against human
chondrocyte surface antigens**

Investigator : Mr. Prachya Kongtawelert, Chiang Mai University

E-mail Address : prachya.kongtawelert@gmail.com

Project Period : 3 years

Chondrocytes express a number of cell-surface molecules that mediate cell-cell or cell-matrix interactions. Identification and full characterization of new chondrocyte surface molecules will lead to a better understanding of the function of the chondrocyte. Researchers used primary human chondrocytes as an immunogen, and various monoclonal antibodies (mAbs) were generated using standard hybridoma technology. A monoclonal antibody named 5D2 was selected for further characterization. The antigen recognized by 5D2 mAb is expressed by primary human chondrocytes, primary synovial fibroblasts, synovial fibroblast cell lines (SW982), primary skin fibroblasts, and osteoblasts, but not expressed in blood cells. Biochemical analysis revealed that the 5D2 antigen is a protein with a molecular weight of approximately 25–35 kDa. Protein identification by mass spectrometry and molecular cloning revealed that 5D2 antigen is identical to the Thy-1 molecule. Furthermore we confirmed this specificity of the antibody by the isolated and cloned Thy-1 gene to the COS-7 and probed it with the 5D2 antibody using Western blot analysis. We examined the role of the Thy-1 molecule in arthritis models and tissue; one was papain-induced rat arthritis, the other was immunohistological staining of osteoarthritic (OA) human articular cartilage. OA cartilage showed a higher expression of Thy-1 as compared with normal tissue in all experimental approaches. The in vitro studies showed that the inflammatory cytokine interleukin-1 β up-regulated Thy-1 molecule expression in the cartilage tissue. It can be concluded that the Thy-1 might be a potential biomarker for cartilage pathogenesis, degradation, and metabolic turnover.

**Keywords : Monoclonal antibody, Chondrocyte surface antigen, Osteoarthritis,
Thy-1**

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG5180012

ชื่อโครงการ: การศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อโปรตีน
บนผิวเซลล์คอนโดโรไซท์

ชื่อนักวิจัย: นาย ปรัชญา คงทวีเลิศ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: prachya.kongtawelert@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ:

เซลล์คอนโดโรไซท์มีการแสดงออกของโมเลกุลต่างๆ บนผิวเซลล์มากมายหลายชนิด ในการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสื่อสาร ระหว่างเซลล์และเซลล์กับสารเนื้อพื้ในเนื้อเยื่อ cell-cell or cell-matrix interactions เพื่อระบุและศึกษาลักษณะโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซท์ ผู้วิจัยจึงใช้เซลล์คอนโดโรไซท์เป็นสารอิมมูโนเจน ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และได้ที่ 5D2 ในการศึกษา จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า โมเลกุลที่มีความจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5D2 เป็นโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุล ประมาณ 25-35 kDa การวิเคราะห์โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีและการโคลนยีนพบว่า โมเลกุลชนิดนี้มีความเหมือนกันกับโมเลกุล Thy-1 การศึกษาทางชีวภาพถึงบทบาทของโมเลกุล Thy-1 ในตัวอย่างโรคข้อเสื่อมในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคข้อเสื่อม ด้วยเอนไซม์ปาเปน และขึ้นกระดูกอ่อนโรคข้อเสื่อมของมนุษย์ พบว่าขึ้นกระดูกของทั้งหนูและมนุษย์ ที่เป็นโรคข้อเสื่อม เมื่อย้อมด้วย โมโนโคลนอล แอนติบอดี 5D2 มีการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับขึ้นกระดูกอ่อนปกติ นอกจากนั้น จากการศึกษาในหลอดทดลองกับเซลล์คอนโดโรไซท์ของมนุษย์พบว่า โมเลกุล Thy-1 สามารถถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นด้วย interleukin-1 β ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้อาจจะสรุปได้ว่า Thy-1 เป็นโมเลกุลที่พบอยู่บนผิวเซลล์คอนโดโรไซท์ และการนำเอาโมโนโคลนอล แอนติบอดี 5D2 ซึ่งจำเพาะกับโปรตีน Thy-1 น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ ในการประยุกต์ใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม, ภาวะการเกิดพยาธิสภาพ, การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน และการเกิดการ turn-over ของ เมแทบอลิซึมในโรคข้อเสื่อมได้

คำหลัก : โมโนโคลนอลแอนติบอดี, โมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซท์, โรคข้อเสื่อม, Thy-1,

Executive summary

The limitation regeneration capacity of articular cartilage is ascribed to its lack of vascularization, its low number of cells embedded in matrix and their limited mitotic activity *in vivo*. A newly developed cell-based therapy to enhance cartilage regeneration relies on the transplantation of autologous chondrocytes into the cartilage defect. When cells forming the transplant are harvested from cartilage biopsies, additional defects at less loaded site of the same joint have to be generated to obtain sufficient cells for transplantation purposes. To avoid such new cartilage defects, mesenchymal stem cells were considered as starting material for cartilage repair protocol. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow have been shown to be able to differentiate into adipocytes, fibroblasts, chondrocytes and osteoblasts *in vitro*, with a preference of most progenitor cells to develop into the osteoblast-like phenotype. Human adult and embryonic stem cells have the potential to differentiate into different cell types in the body and many research groups world-wide are engage in identifying and characterizing stem cells and their partly and fully differentiated progeny. The methods currently used in this research are imperfect and the relationship between stem cells of different source remain unclear. It has become recognized by many groups that stem cell niches are important in determining stem cell phenotype and fate determination. The niche constitutes the environment surrounding the cell, which determines the local signals that guide cell behavior. It thus involves the extracellular matrix (ECM) surrounding the cell and much of the way a cell interacts with the ECM results in a pattern of cell surface expression of glycosylated isoforms that characterize the cells current state and future fate. There is preliminary evidence that CS-epitopes at the cells surface are modulated in expression during changes in cell state and fate. This relates back to the original 1990 observations on these epitopes in development and the use of techniques being developed in Thailand Excellence Center for Tissue Engineering, Chiang Mai University, Thailand provide the tools which will enable this concept to be carried forward and a raft of new approaches to be developed for recognizing, characterizing and monitoring the fate of human stem cells and this will be particularly important in relation to new research and applications in regenerative processes.

Measurements on the protein level using biochemistry or immunohistochemistry have the advantage that it provides an overall result of synthesis and breakdown of matrix components from the past. An antibody that recognizes a cell surface marker would enable us to directly assess cellular phenotype.

The possibility to discriminate between differentiated and dedifferentiated cell, would be of the great help to find the optimal isolation of the cells with the right phenotype before implantation could be established with such cell marker if we apply this antibody to the cell sorter (FACS) or bind it to magnetic beads. At the present, various chondrocyte surface molecules based on their actual and potential relevance in cartilage biology have been discovered and named systematically as cluster of differentiation (CD) antigen. By the latest Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) workshop, CD1-CD339 has been designed. Some sets of cell surface molecules which are selected based on their actual and potential relevance in cartilage biology which are; 1) matrix associated surface makers; CD 26, CD44 2) integrin; CD49a, CD49c, CD49e, CD49f, CD51/61, CD151 3) adhesion molecules; CD58, CD54, CD106, CD166 4) stem cell associated; CD 90, CD10, CD105, CD140a and 5) receptor; CD221, CD119, CD130, CD95, CD120a, CD14.

However, biochemists still believe that several chondrocyte surface molecules are still awaiting to be identified. Identification and fully characterization of new chondrocyte surface molecules will lead to a better understanding of the chondrocyte function and differentiation. This finding may also be applied in the development of new strategy or reagent for induction or engineering of cartilage tissue quality.

We have produced and characterized monoclonal antibodies (mAb) against chondrocyte surface molecules for use as a research tool and biomarker for cartilage degradation. We used primary human chondrocytes as an immunogen, and various monoclonal antibodies (mAbs) were generated using standard hybridoma technology. One of these is considering the practical applications of mAb 5D2. The 5D2 antigen was identical to Thy-1 molecule and showed a higher expression in OA cartilage as compared with normal tissue.

A monoclonal antibody named 5D2 was selected for further characterization. The antigen recognized by 5D2 mAb is expressed by primary human chondrocytes, primary synovial fibroblasts, synovial fibroblast cell lines (SW982), primary skin fibroblasts, and osteoblasts, but not expressed in blood cells. Biochemical analysis revealed that the 5D2 antigen is a protein with a molecular weight of approximately 25–35 kDa. Protein identification by mass spectrometry and molecular cloning revealed that 5D2 antigen is identical to the Thy-1 molecule. Furthermore we confirmed this specificity of the antibody by the isolated and cloned Thy-1 gene to the COS-7 and probed it with the 5D2 antibody using Western blot analysis. We examined the role of the Thy-1

molecule in arthritis models and tissue; one was papain-induced rat arthritis, the other was immunohistological staining of osteoarthritic (OA) human articular cartilage. OA cartilage showed a higher expression of Thy-1 as compared with normal tissue in all experimental approaches. The in vitro studies showed that the inflammatory cytokine interleukin-1 β up-regulated Thy-1 molecule expression in the cartilage tissue. It can be concluded that the Thy-1 might be a potential biomarker for cartilage pathogenesis, degradation, and metabolic turnover.

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กระดูกอ่อนจัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีข้อจำกัดในการฟื้นตัวเมื่อเกิดการบาดเจ็บ เนื่องจากบริเวณกระดูกอ่อนไม่มีหลอดเลือดฝอยมาเลี้ยงโดยตรง เซลล์ที่พบเพียงชนิดเดียวในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนซึ่งฝังตัวอยู่ในชั้นเมทริกซ์ คือเซลล์คอนโดโรไซต์ (chondrocyte) ซึ่งมีจำนวนน้อย และมีอัตราการแบ่งเซลล์ที่ต่ำ การพัฒนาการรักษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีการพัฒนาโดยใช้เซลล์คอนโดโรไซต์ของตัวผู้ป่วยเอง (autologous chondrocyte) ทำการปลูกถ่ายกลับไปยังข้อของผู้ป่วยเพื่อที่จะกระตุ้นให้กระดูกอ่อนมีการฟื้นตัวจากภาวะที่เป็นโรค เซลล์คอนโดโรไซต์ที่ใช้ในการรักษาได้มาจากการเก็บชิ้นเนื้อกระดูกอ่อนที่เป็นโรคออกมาจากตัวผู้ป่วยเอง โดยบริเวณที่ใช้ชิ้นต้องเป็นบริเวณที่ไม่เป็นโรคเพื่อที่จะให้ได้เซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษา เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงปัญหา การใช้ mesenchymal stem cell จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคข้อเสื่อม จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเซลล์ mesenchymal stem cell ของมนุษย์มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte), สร้างเส้นใย (fibroblast), เซลล์คอนโดโรไซต์, และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ได้ เซลล์ embryonic stem cell มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆในร่างกาย นักวิจัยหลากหลายกลุ่มทั่วโลกมีความพยายามที่จะศึกษา stem cell และ เซลล์ในแต่ละระยะของการ differentiation เพื่อที่จะใช้ในการรักษาโรค วิธีที่ใช้ในการศึกษาในปัจจุบันยังมีข้อบกพร่องอยู่ และ คุณสมบัติของ stem cell จากหลากหลายแหล่งกำเนิดก็ยังมีการศึกษาไม่ชัดเจน จากการศึกษาพบว่า stem cell niches มีบทบาทต่อ stem cell phenotype โดย niche เป็นสภาพแวดล้อมรอบๆเซลล์ซึ่งรวมถึง extracellular matrix (ECM) คอยส่งสัญญาณที่มีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ โดยจากการศึกษาพบว่าในระหว่างพัฒนาการของเซลล์ในแต่ละระยะจะมีการแสดงออกของ glycosylated isoform ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโมเลกุลของ chondroitin sulphate (CS) ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละระยะของการพัฒนาการของเซลล์ ซึ่งการศึกษานี้ย้อนกลับไปยังปี 1990 มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการศึกษา CS epitope ขึ้นที่ Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and stem cell มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งเทคนิคที่ใช้นั้นสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยใหม่ๆได้

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยเทคนิคทางชีวเคมี และการศึกษาในชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค Immunohistochemistry จะช่วยบ่งบอกถึงการสร้างและการสลายของสารในเมทริกซ์ โดยการใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดนั้นๆ โดยสามารถที่จะบ่งบอกถึงกระบวนการต่างๆของเซลล์ได้

เพื่อที่จะช่วยในการแยกเซลล์ที่ถูกต้องที่จะใช้ในการรักษาจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ 2 ระยะคือ differentiated และ dedifferentiated cell ออกจากกัน โดยการใช้ตัวบ่งชี้ที่ถูกต้อง ซึ่งสามารถประยุกต์ได้โดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับตัวบ่งชี้เหล่านั้นในการแยกความแตกต่าง แล้วทำการแยกเซลล์ออกมาโดยใช้เครื่อง Flow cytometer หรือการใช้

magnetic bead ในการแยก ในปัจจุบันโมเลกุลที่แสดงออกบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์นั้นมีการค้นพบมากมายและมีการตั้งชื่อตามหลัก cluster of differentiation (CD) antigen โดยจากการประชุมล่าสุดของ Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) workshop พบว่ามีการบัญญัติโมเลกุลที่ถูกค้นพบมากมายโดยให้ชื่อเป็น CD1-CD339 ซึ่งโมเลกุลบนผิวเซลล์บางกลุ่มมีความสัมพันธ์กับชีววิทยาของกระดูกอ่อน ได้แก่ 1) matrix associated surface makers ได้แก่ CD 26 และ CD44 2) integrin; CD49a, CD49c, CD49e, CD49f, CD51/61, และ CD151 3) adhesion molecules ได้แก่ CD58, CD54, CD106 และ CD166 4) stem cell associated ได้แก่ CD 90, CD10, CD105 และ CD140a และ 5) receptor ได้แก่ CD221, CD119, CD130, CD95, Cd120a และ CD14 เป็นต้น

อย่างไรก็ตามนักชีวเคมีก็ยังคงมีความเชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์อีกหลายชนิดที่รอการค้นพบ การศึกษาโมเลกุลชนิดใหม่นั้นจะทำให้มีความเข้าใจถึงการทำงานของเซลล์คอนโดโรไซต์รวมถึงกระบวนการ differentiation ของเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ในการพัฒนาในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระดูกอ่อนได้

เซลล์คอนโดโรไซต์ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายสารใน ECM การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์มีบทบาทต่อการทำหน้าที่นี้ การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์จะช่วยให้เราสามารถเป็นตัวช่วยบ่งบอกการพัฒนาและกระบวนการการเกิดโรคข้อเสื่อมได้ ปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์เพื่อที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมสลายของข้อ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดหนึ่งที่ได้คัดเลือกเพื่อที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีชื่อ 5D2 โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้มีความจำเพาะกับโมเลกุล Thy-1 และพบการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 เพิ่มขึ้นในชั้นกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาสารบ่งชี้บนผิวเซลล์สำหรับใช้ทำนายการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และใช้เป็นสารบ่งชี้ในการจำแนกเซลล์คอนโดโรไซต์
2. เพื่อการผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์
3. เพื่อประยุกต์ใช้แอนติบอดี ที่ผลิตได้ในการบ่งชี้และติดตามการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อนและการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

วิธีทดลอง

การทำลงมีระเบียบวิธีดังนี้

1. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะใช้เทคนิคดังต่อไปนี้คือ flow cytometry, ELISA, immunoprecipitation และ Western Blotting
2. การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด 5D2 บนผิวเซลล์และเนื้อเยื่อ จะใช้เทคนิค flow cytometry และ immunohistochemistry.
3. การศึกษาโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีใช้เทคนิค immunoprecipitation และ mass spectrometry
4. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทำได้โดยการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อม โดยเทคนิค Immunohistochemistry

วิธีการทดลอง

การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์คอนโดโรไซท์

เซลล์คอนโดโรไซท์ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้แยกได้จากชั้นกระดูกอ่อนปกติของผู้ป่วยที่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นโรค flat pad syndrome จากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ (ภาควิชาออร์โธปิดิกส์, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) (จริยธรรม เลขที่ 070CT111016) เซลล์คอนโดโรไซท์จะถูกแยกโดยการย่อยชั้นกระดูกอ่อนด้วยเอนไซม์ trypsin ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์ collagenase type IA เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย PBS และเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมีส่วนผสมของ 10%FCS หลังเลี้ยง ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณที่ต้องการ เพื่อในการทดลองต่อไป

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อเซลล์คอนโดโรไซท์

โดยแบ่งเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. การฉีดกระตุ้นหนู

ทำการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c ด้วยเซลล์คอนโดโรไซท์ปริมาณ 1×10^6 เซลล์ โดยฉีดเข้าทางช่องท้องของหนู ฉีดทั้งหมด 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งมีระยะห่างกันสองอาทิตย์

2. การทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู

เมื่อครบกำหนดการฉีดกระตุ้นหนู ทำการวัดความแรงของแอนติบอดี โดยเก็บตัวอย่างเลือดของหนูบริเวณหลอดเลือดดำของโคนหาง โดยเก็บทั้งหมดประมาณ 300-500 μ l แล้วปั่นแยกซีรัมเพื่อที่จะใช้วัดความแรงของแอนติบอดี ทำการทดสอบโดยซีรัมมาเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปปฏิกิริยากับเซลล์คอนโดโรไซท์เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย 1%BSA/PBS แล้วทำการย้อมด้วย FITC conjugated anti-mouse Immunoglobulins เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา

ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1% BSA/PBS แล้วเติม 1% paraformaldehyde 350 μ l นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

3. การทำสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Hybridoma technique

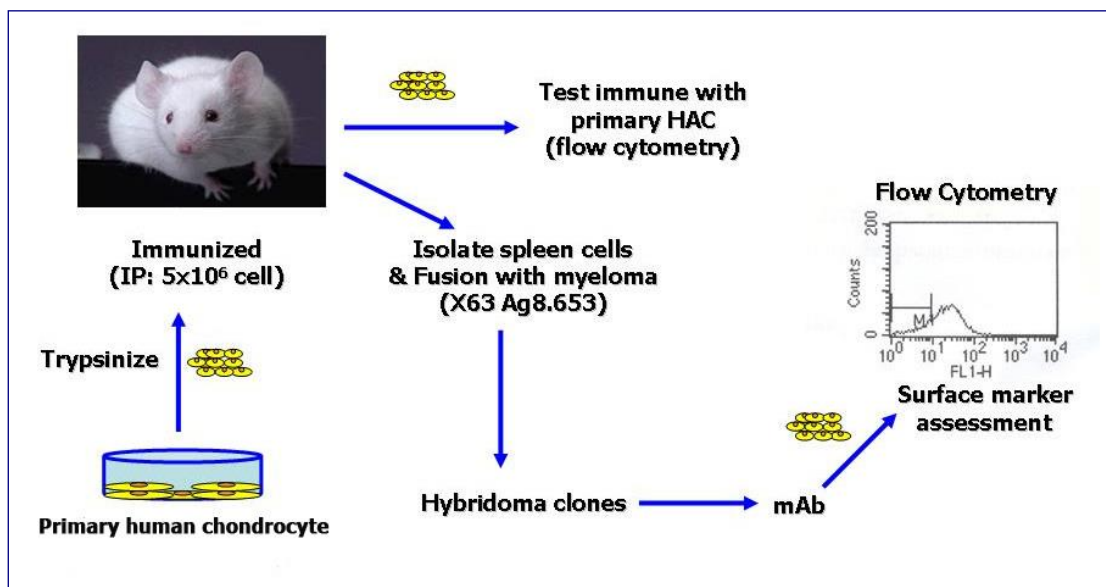
เมื่อหนูมีการสร้างแอนติบอดีต่อเซลล์คอนโดโรไซท์แล้ว ทำการฉีดกระตุ้นหนูซ้ำอีก 1 ครั้งด้วยเซลล์คอนโดโรไซท์ หลังจากฉีดครบ 5 วันทำการฆ่าหนู เก็บม้ามออกมาเพื่อแยกเอา spleen cell ทำการแตกเม็ดเลือดแดงโดยใช้ 0.83% NH_4Cl hypotonic solution เป็นเวลา 5 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วย 10%FCS in IMDM 2 ครั้งแล้วนำเซลล์ไปเข้าสู่กระบวนการ fusion โดยเซลล์ที่ใช้ในการ fusion คือเซลล์ myeloma P3-X63Ag8.653 ทำการ fuse โดยใช้สาร 50% polyethylene glycol เมื่อเสร็จกระบวนการ fusion ทำการปั่นล้างเซลล์และเลี้ยงเซลล์ใน HAT medium ใน 10%FCS in IMDM ที่มีส่วนผสมของ BM condensed H1 ในตู้ incubator ที่ 5% CO_2 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วันทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จาก HAT medium เป็น HT medium

4. การคัดเลือกเซลล์ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซท์

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ hybridoma มาทำการย้อมเซลล์คอนโดโรไซท์เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย 1%BSA/PBS แล้วทำการย้อมด้วย FITC conjugated anti-mouse Immunoglobulins เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1%BSA/PBS แล้วเติม 1% paraformaldehyde 350 μ l นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

5. การทำ Limiting dilution

เพื่อให้ได้เซลล์เพียงชนิดเดียวที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สนใจ จึงทำการนับเซลล์และเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate โดยให้มีเซลล์ 1 เซลล์ต่อหลุม ทำการเลี้ยงที่สภาวะ 5% CO_2 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 อาทิตย์หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบ activity โดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาย้อมกับเซลล์คอนโดโรไซท์และวิเคราะห์โดยเครื่อง Flow cytometer หลังจากนั้นจึงทำ limiting dilution ซ้ำอีก 1 ครั้งเป็น second limiting dilution



รูปที่ 1 แสดงกระบวนการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์

การวิเคราะห์ isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการวิเคราะห์หา isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA โดยขั้นแรกนำ ELISA plate มาทำการเคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ isotype ต่างๆของโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ rat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM และ IgA โดยละลายแอนติบอดีเหล่านั้นใน coating buffer (0.01 M NaHCO_3 pH 9.6) นำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เมื่อครบเวลาทำการล้างเพลทด้วย 0.05% Tween-PBS จำนวน 3 ครั้งแล้วเติม น้ำเลี้ยงเซลล์ hybridoma ที่จะทดสอบลงไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเพลทจำนวน 3 ครั้งแล้วเติม Goat anti-mouse immunoglobulins-HRP แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อล้างครบ 3 ครั้ง เติม OPD substrate แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 4M H_2SO_4 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 nm

การผลิต ascitic fluid

เพื่อที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ครั้งละมากๆจึงทำการผลิต ascetic fluid โดยขั้นแรกทำการฉีด pristane ปริมาตร 500 μl เข้าช่องท้องหนู BALB/c เมื่อครบ 7 วันทำการฉีดเซลล์ hybridoma ประมาณ $1-2 \times 10^6$ เซลล์เข้าไปทางช่องท้องหนู เมื่อครบ 7-15 วันทำการเก็บ ascetic fluid เพื่อนำไปใช้ต่อไป

การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ด้วยวิธีการ flow cytometry

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ คือ เซลล์คอนโดโรไซท์, เซลล์เยื่อบุข้อ, เซลล์ผิวหนัง, โมโนไซท์, ลิมโฟไซท์, เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน, เซลล์มะเร็งเยื่อบุข้อ, Daudi, U937, K562, hFOB 1.19, และ HepG2 โดยขั้นแรกนำเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์มาบ่มกับ 10% AB serum ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติม โมโนโคลนอลแอนติบอดีลงไป บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1%BSA-PBS แล้วเติม FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibodies แล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 1%BSA-PBS จำนวน 3 ครั้งแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ล้างเซลล์คอนโดโรไซท์ด้วย PBS แล้วนำเซลล์ $1-5 \times 10^7$ cells/mL มาติดฉลากด้วย biotin โดยใช้ 5mM sulfo-NHS-LC-Biotin นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย 1mM glycine ใน PBS จำนวน 1 ครั้ง แล้วล้างอีก 2 ครั้ง ด้วย PBS หลังจากนั้นทำการแตกเซลล์ด้วย lysis buffer (5mM iodoacetamide, protease inhibitor, 1% NP-40, Tris HCl [pH 8.2]) ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นแยก ที่ 10,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เก็บเอาส่วน supernatant เพื่อนำไปใช้ต่อไป

นำส่วน supernatant ที่ได้ไปผสมกับ CNBr Sepharose beads ที่ถูกเคลือบด้วย 5D2 mAb ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังกระบวนการ immunoprecipitation นำโปรตีนที่ได้ไปแยกโดยเทคนิค SDS-PAGE แล้วทำ Western blot เพื่อหาขนาดโมเลกุลของโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 mAb โดยทำการ transfer โปรตีนจากแผ่น gel ไปสู่ nitrocellulose membrane หลังกระบวนการ transfer ทำการ block membrane ด้วย 5% skim milk ใน TBS ที่มีส่วนผสมของ 0.05% Tween-20 (TBST) แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ 5D2 mAb เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา ล้าง 3 ครั้งด้วย TBST แล้วนำไป incubate ร่วมกับ horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000) เมื่อครบเวลาล้าง 3 ครั้งด้วย TBST แล้ววิเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเพาะกับ 5D2 mAb โดยใช้ enhanced chemiluminescence plus detection system

การบ่งบอกถึงชนิดของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี

เพื่อบ่งบอกถึงชนิดของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี immunoprecipitation โดยการใช้ lysate ที่ได้จากเซลล์คอนโดโรไซท์นำไปทำปฏิกิริยาร่วมกับ cyanogen bromide-activated Sepharose bead ซึ่งถูกเคลือบไว้ด้วย 5D2 mAb ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากล้างด้วย PBS ทำการ elute โปรตีนด้วย 1X sample buffer (10%

glycerol, 1% SDS, 0.1% bromphenol blue, และ 0.0625M Tris- HCl (pH 6.8) ทำการแยกโปรตีนที่ได้ต่อโดยวิธี SDS-PAGE ทำการตัด gel ตรงตำแหน่งของโปรตีนที่มีขนาด 35 KDa แล้วนำ gel ที่ตัดออกมาล้าง 2 ครั้งด้วย 50% acetonitrile (ACN) ใน 25mM NH_4HCO_3 buffer (pH 8.0) ปริมาตร 200 μl ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และ ล้างอีก 1 ครั้งด้วย 100% ACN ปริมาตร 200 μl หลังจากนั้นจึงนำไปสกัดและย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดย Q-TOF UltimaTM mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom)

การโคลนยีน Thy-1 เข้าไปใน COS-7 cell-line

ทำการสกัด total mRNA จากเซลล์คอนโดโรไซต์ แล้วสังเคราะห์เป็น cDNA หลังจากนั้นจึงเพิ่มปริมาณ Thy-1 cDNA ด้วยวิธี RT-PCR ทำการโคลนยีนของ Thy-1 เข้าไปใน plasmid pcDNA3.1 ตรงตำแหน่ง BamH1 และ EcoR1 restriction site แล้วทำการ transfect เข้าสู่เซลล์ COS-7 ขั้นแรกทำการเลี้ยงเซลล์จำนวน $1-3 \times 10^5$ เซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. แล้วทำการ transfect โดยใช้ GeneJuice reagent เมื่อครบเวลา 8 ชั่วโมงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเลี้ยงต่อไปอีก 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการแตกเซลล์แล้วนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ Thy-1 โดยวิธี Western blot

การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนแบ่งเป็น 2 การทดลองคือ ในสัตว์ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคข้อ และการศึกษาการแสดงออกของ Thy-1 ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมนุษย์ที่เป็นโรคข้อ

การกระตุ้นหนูให้เป็นโรคข้อเสื่อมโดยใช้เอนไซม์ปาเปน

ทำการฉีดกระตุ้นหนูขาวบริเวณข้อเข่าจำนวน 3 ตัวด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 4% (w/v) ที่ละลายใน normal saline ในวันที่ 1, 4 และ 7 หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายครบ 10 วันทำการฆ่าหนู แล้วตัดเอาส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมาทำการ fix ด้วย 4% paraformaldehyde ข้ามคืน แล้วนำไป embedded ใน paraffin หลังจากนั้นจึงนำไปตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 5 มม. ชิ้นเนื้อที่ได้นำไปย้อมสี hematoxylin and eosin (H&E) และ Safranin-O

นำชิ้นกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมของมนุษย์และกระดูกอ่อนของหนูที่กระตุ้นให้เป็นโรคข้อเสื่อมมาทำการศึกษาการแสดงออกของ Thy-1 ขั้นแรกนำตัวอย่างชิ้นเนื้อเข้าสู่กระบวนการ deparaffinized แล้วนำชิ้นกระดูกอ่อนไปย่อยด้วยเอนไซม์ Chondroitinase ABC เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป incubate ใน 3% H_2O_2 เป็นเวลา 10 นาที หลังจากทำการ block ด้วย 3% BSA แล้ว นำชิ้นกระดูกไป incubate ด้วย 5D2 mAb ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการล้าง 3 ครั้งด้วย PBST แล้วนำไปย้อมด้วย sheep anti-mouse IgM (μ chain specific)

peroxidase conjugated เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้าง 3 ครั้งด้วย PBST แล้วนำไปทำให้เกิดสีด้วย diaminobenzidine substrate

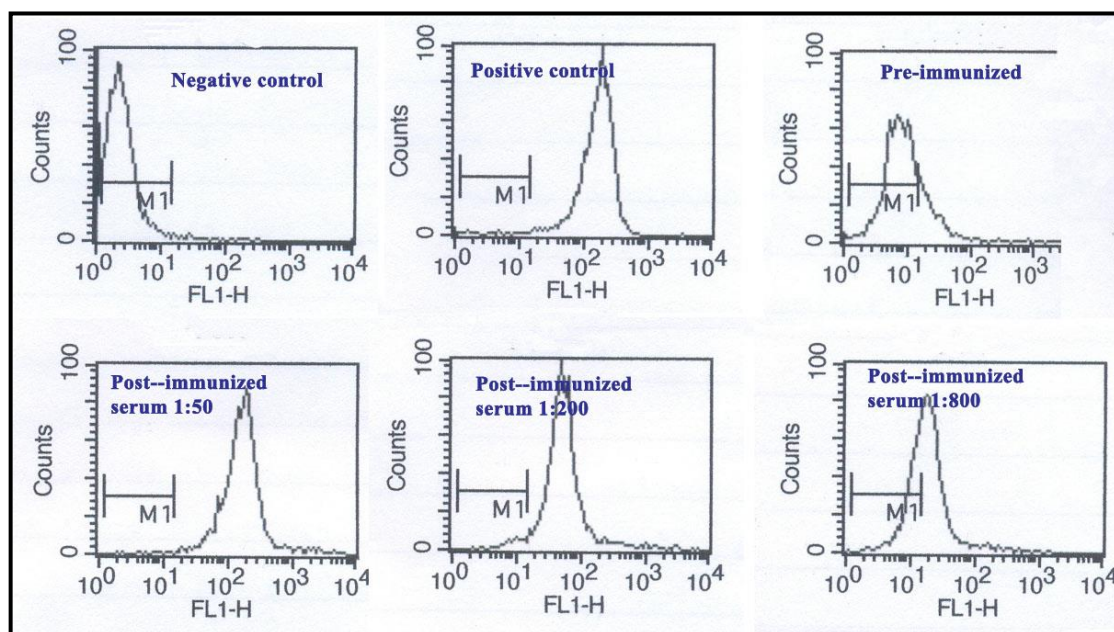
การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในเซลล์คอนโดโรไซย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Interleukin-1 β

เพื่อที่จะศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ทำการเลี้ยงเซลล์คอนโดโรไซย์จนมีประมาณเซลล์ประมาณ 80% ของจานเลี้ยงเซลล์ ทำการอดอาหาร 24 ชั่วโมงโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีส่วนผสมของ FCS เมื่อครบกำหนดทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย interleukin-1 β ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL ที่เวลา 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง แล้วทำการแตกเซลล์ด้วย 1X sample buffer นำเซลล์ lysate ที่ได้ไปแยกด้วย 12% SDS-PAGE แล้วทำการ transfer โปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane ทำการ block membrane ด้วย 5% skim milk ใน TBST ที่มีส่วนผสมของ 0.05% TBST แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ 5D2 mAb ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน ล้าง membrane 3 ครั้งด้วย TBST แล้วเติม Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (dilution, 1:2000; Amersham Biosciences) incubate ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 โดยใช้ enhanced chemiluminescence plus detection system

ผลการทดลอง

1. การฉีดกระตุ้นหนู (Immunization)

ทำการฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ Balb/c เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว โดยนำหนูมาเลี้ยงก่อนฉีด 7 วัน ทำการเก็บเลือด pre-immunization 300-500 μ l ทางเส้นเลือดดำบริเวณปลายหาง แล้วทำการฉีดกระตุ้นหนูทางช่องท้องด้วยเซลล์คอนโดโรไซต์มนุษย์ (primary human articular chondrocyte, passage 2 $5-10 \times 10^6$ เซลล์ จำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งฉีดห่างกัน 2 สัปดาห์ เก็บเลือดหนู 300-500 μ l ทางเส้นเลือดดำบริเวณปลายหาง แล้วทำการศึกษาระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นด้วยวิธี Flow cytometry



รูปที่ 2 แสดงผลการฉีดกระตุ้นหนูด้วยเซลล์คอนโดโรไซต์มนุษย์ เปรียบเทียบระหว่างก่อนฉีดและหลังฉีดวิเคราะห์โดยวิธี Flow cytometry

Negative control คือ ย้อมเซลล์ด้วย Immunoglobulin

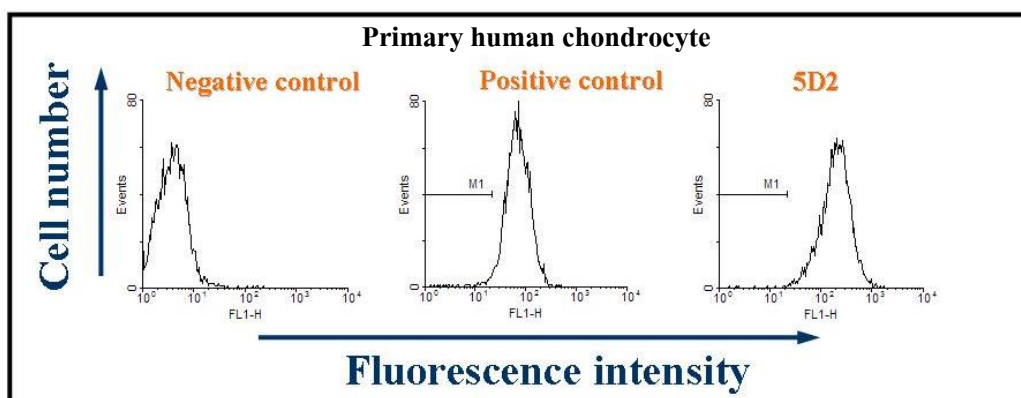
Positive control คือ ย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อ CD147

จากการศึกษาหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นมีการสร้างแอนติบอดีต่อเซลล์คอนโดโรไซต์มนุษย์ โดยวัดเป็นค่าความแรงของแอนติบอดีมี titer เท่ากับ 800

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Hybridoma technique

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Hybridoma technique ใช้หลักการ การรวมกันของเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีในหนู และเซลล์มะเร็ง Myeloma โดยใช้ Polyethylene glycol หลังกระบวนการคัดเลือก และการทำ limiting dilution จากแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้งหมด ได้เลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ชื่อ 5D2 มาทำการศึกษาคูณสมบัติอื่นๆต่อไป โดยจากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA พบว่า 5D2 mAb เป็น mAb ชนิด IgM เพื่อเพิ่มปริมาณ mAb ทำโดย

ฉีดหนู Balb/c เพศเมีย อายุ 4 เดือน จำนวน 3 ตัว ด้วยเซลล์ hybridoma ที่ผลิต 5D2 mAb เข้าทางช่องท้องของหนูเพื่อผลิต ascitic fluid เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

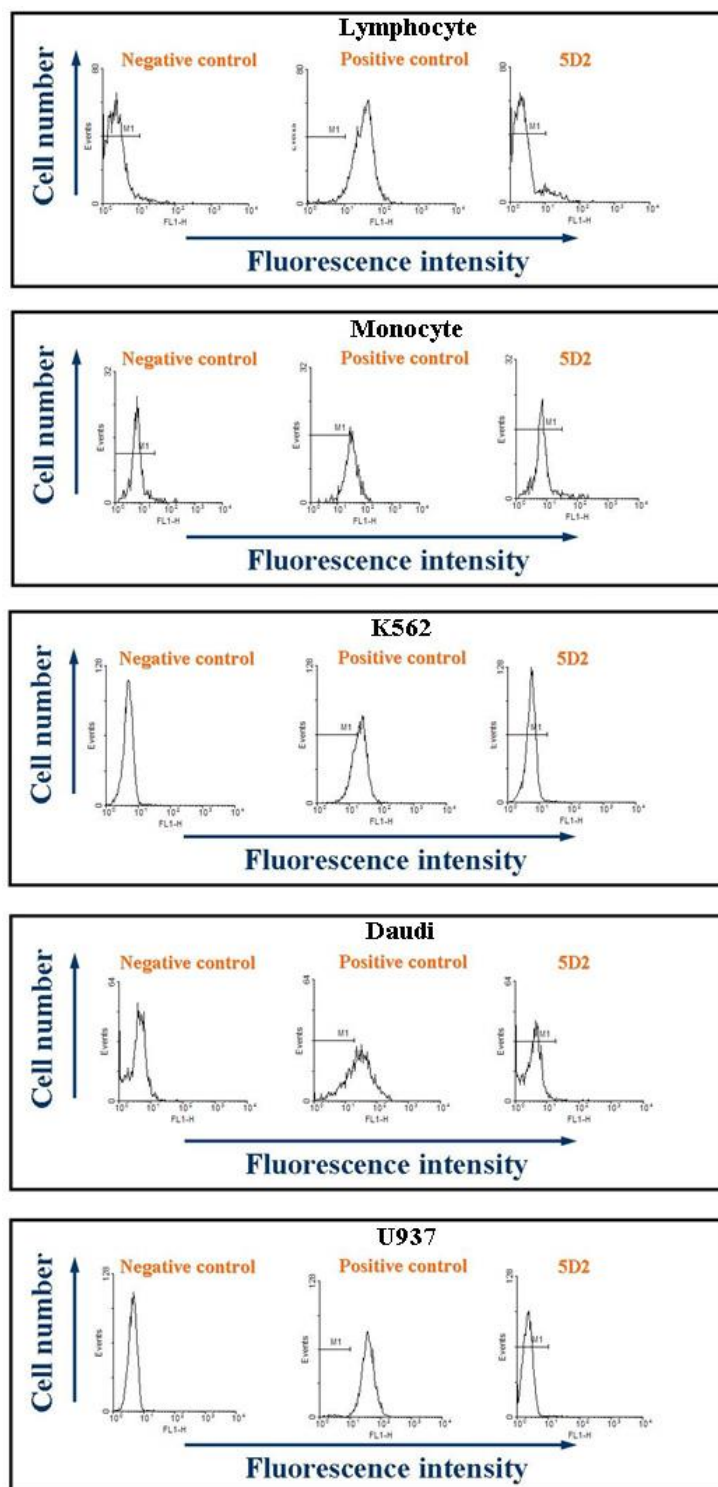


รูปที่ 3 แสดงผล flow cytometry ของ 5D2 mAb ที่จำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์ โดย positive control คือ CD147 mAb, negative control คือ Immunoglobulin

3. การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีในเซลล์ชนิดต่าง ๆ

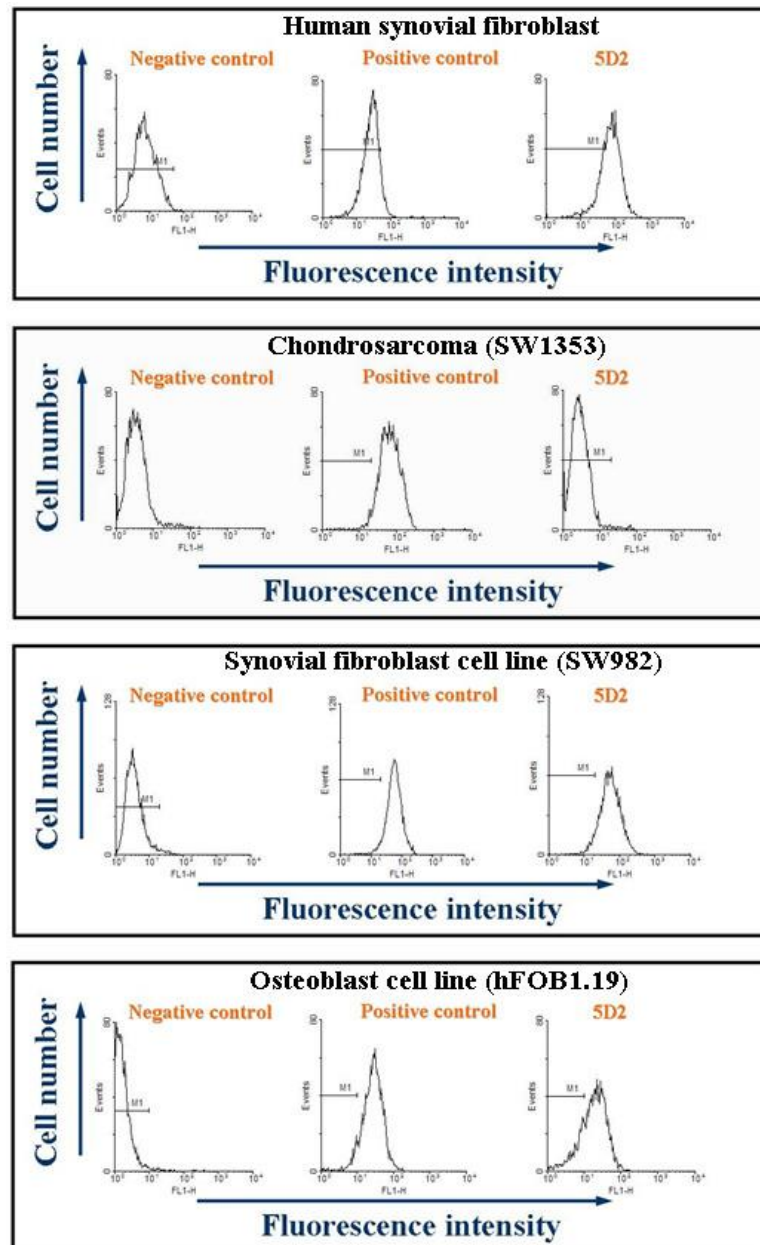
ทำการย้อมเซลล์ชนิดต่างๆด้วย 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์โดย flow cytometry ผลการศึกษาพบว่า โมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี มีการแสดงออกบน ผิวเซลล์คอนโดโรไซต์ ปฐมภูมิ (primary human chondrocyte) เซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblast cell-line:) เซลล์มะเร็งเยื่อข้อ (SW1353) เซลล์ผิวหนัง (skin fibroblast) และ osteoblast (hFOB19.2) โดยไม่พบการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด โมโนไซต์และลิมโฟไซต์ นอกจากนี้ยังไม่พบการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Daudi, U937 และ K562 และยังพบอีกว่าไม่พบโมเลกุล 5D2 ในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน เซลล์มะเร็งตับ (hepG2) และ human embryonic kidney cell (HEK 293 cell)

1. Blood cells



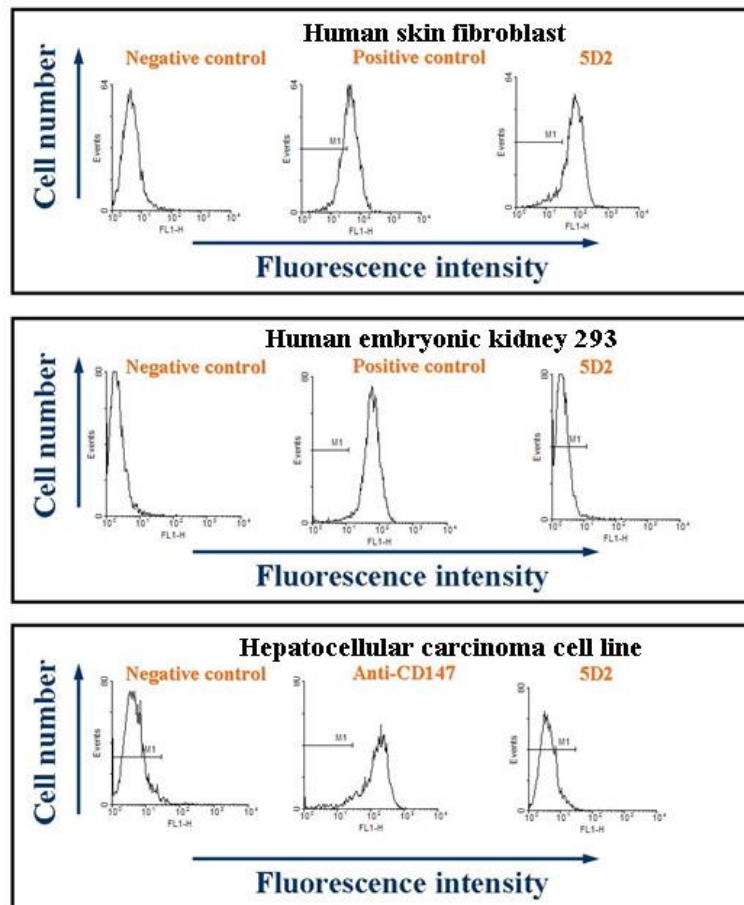
รูปที่ 4 แสดงผล flow cytometry ของ blood cell ต่อโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 mAb โดย positive control คือ CD147 mAb negative control คือ Immunoglobulin

2. Bone and cartilage



รูปที่ 5 แสดงผล flow cytometry ของเซลล์ที่พบในข้อ (joint cells) ต่อโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 mAb โดย positive control คือ CD147 mAb negative control คือ Immunoglobulin

3. เซลล์ชนิดอื่น ๆ



รูปที่ 6 แสดงผล flow cytometry ของเซลล์ชนิดอื่น ๆ ต่อโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 mAb โดย positive control คือ CD147 mAb, negative control คือ Immunoglobulin

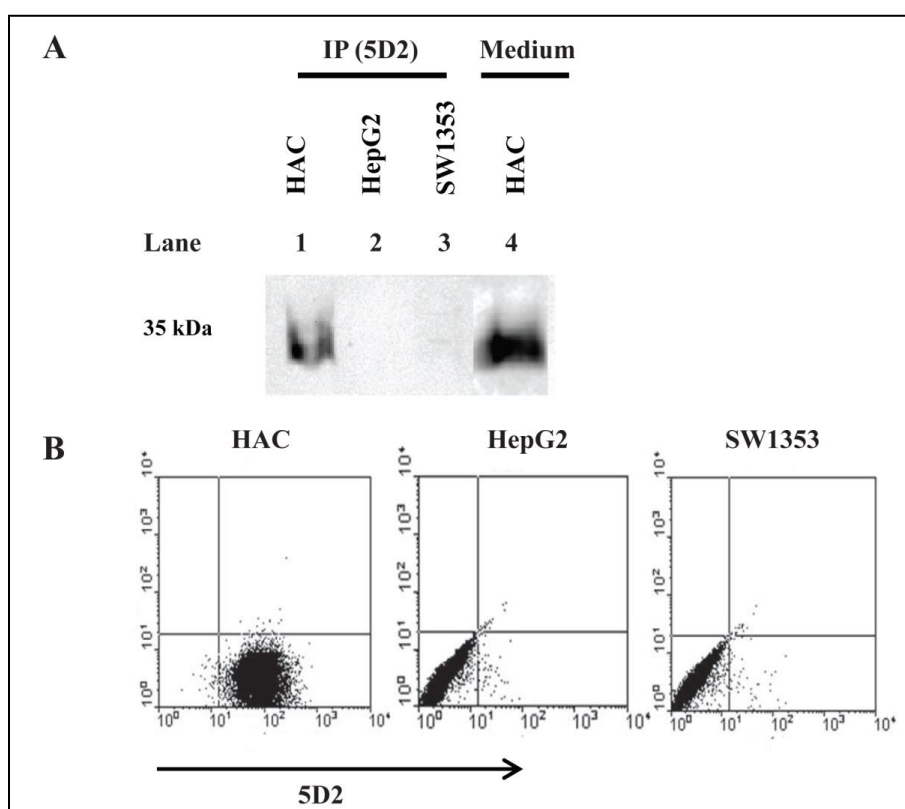
ตารางที่ 1 แสดงการแสดงออกของโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอล แอนติบอดีในเซลล์ชนิดต่างๆ

	5D2 molecules	
	Positive	Negative
1. Blood cells		
Primary cells		√
• Monocyte		√
• Lymphocyte		
Cell lines		√
• K562		√
• Daudi		√
• U937		
2. Bone and cartilage tissue		
Primary cells		
• Human articular chondrocyte	√	
• Human synovial fibroblast	√	
Cell lines		
• Chondrosarcoma (SW1353)		√
• Human synovial fibroblast (SW982)	√	
• Osteoblast (hFOB1.19)	√	
3. Others		
• Primary skin fibroblast	√	
• Hepatocellular carcinoma cell (HepG2)		√
• Human embryonic kidney 293 cell (HEK293)		√

4. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอล แอนติบอดี

เพื่อที่จะยืนยันคุณสมบัติและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5D2 ต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Immunoprecipitation โดยใช้ cell lysate ของเซลล์คอนโดโรไซต์ พบว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์ที่จำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีขนาดประมาณ 35 kDa โดยจากการศึกษาไม่สามารถที่จะ immunoprecipitate โมเลกุลชนิดนี้ได้จาก cell lysate ที่ได้จากเซลล์ HepG2 และ SW 1353 ดังรูปที่ 7 นอกจากนี้ยังสามารถที่จะตรวจพบโมเลกุล 5D2 ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาจากการเลี้ยงเซลล์คอนโดโรไซต์แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล 5D2 สามารถที่จะถูกตัดหรือหลั่งออกมาจากเซลล์ได้



รูปที่ 7 แสดงการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะกับ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) ผลการศึกษาโดยวิธี western blot ที่ได้มาจากการทำ immunoprecipitation โดยใช้ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก cell lysate ของเซลล์คอนโดโรไซต์: Human articular chondrocyte (lane1), HepG2 (lane2) และ SW1353 (lane3) และการศึกษาการแสดงออกในน้ำเลี้ยงเซลล์คอนโดโรไซต์ (lane4) (B) แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล 5D2 บนผิวเซลล์ กระดูกอ่อน, HepG2 และ เซลล์ SW1353 โดยวิธี flow cytometry

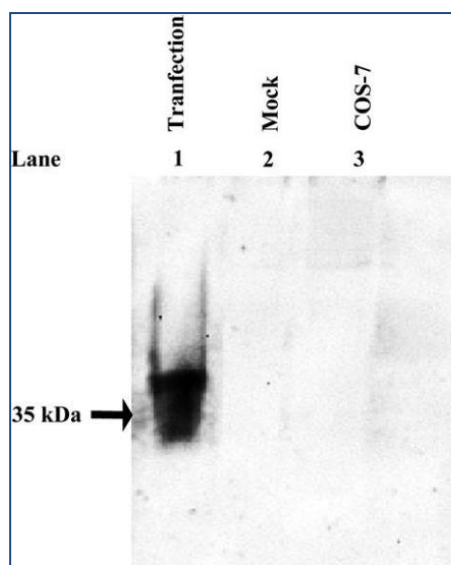
5. การศึกษาเพื่อพิสูจน์ชนิดของโมเลกุล 5D2

การศึกษาเพื่อหาชนิดของโมเลกุล 5D2 โดยใช้วิธี Mass spectrometry พบว่าโมเลกุล 5D2 มีความเหมือนกันกับโมเลกุล Thy-1 โดยเปรียบเทียบข้อมูลจาก NCBI protein database พบว่าโมเลกุล 5D2 มีความเหมือน 100 %เมื่อเทียบกับโมเลกุล Thy-1 ของมนุษย์ (AAB26353), มีความเหมือน 80% เมื่อเทียบกับ CD90 ของ Sus scrofa (CAM58077) และ มีความเหมือน 69% เมื่อเทียบกับ CD90 ของหนู (AAR17087)

ตาราง2 ผลของการตรวจหาโมเลกุลโดยวิธี Mass spectrometry

Band no.	Protein name	NCBI ID	Accession	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	pI	MW (kDa)
c1	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS, MS/MS	55, 49	31, 18	4, 2	8.96	18.17
c2	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS/MS	NA, 71	NA, 18	NA, 2	8.96	18.17
c3	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS, MS/MS	63, 134	31, 18	4, 3	8.96	18.17
c4	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS/MS	NA, 34	NA, 8	NA, 1	8.96	18.17

เพื่อที่จะยืนยันผลจากการศึกษาโดยวิธี Mass spectrometry จึงทำการสร้าง plasmid vector ที่ชื่อ pcDNA 3.1 ให้มียีนที่กำหนดการสร้าง Thy-1 แล้วทำการ transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 หลังจากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในเซลล์ COS7 โดยวิธี wester blot โดยใช้ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการศึกษาสามารถยืนยันได้ว่าโมเลกุล 5D2 เป็นโมเลกุล Thy-1



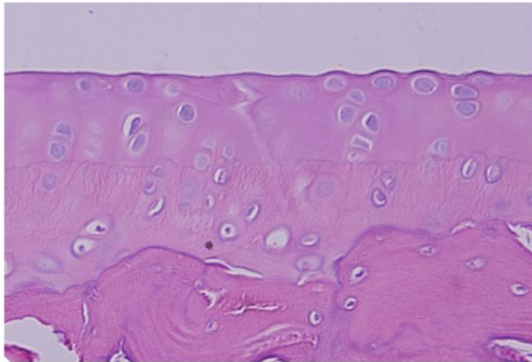
รูป 8 แสดงการศึกษาโดยการ clone ยีน Thy-1 ให้มีการแสดงออกในเซลล์ COS7 และวัดการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี western blot

6. การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในโรคข้อเสื่อม

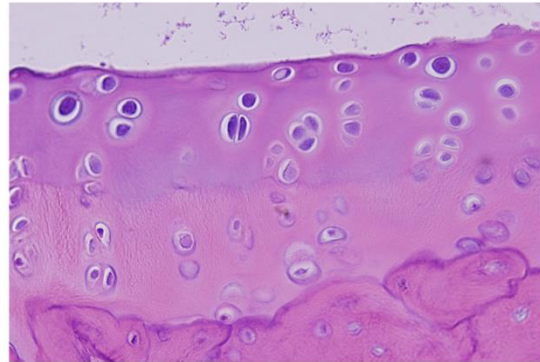
เพื่อที่จะศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในโรคข้อเสื่อม ทางคณะผู้ทำการวิจัยได้ใช้โมเดลของหนูขาวที่ได้รับกระตุ้นให้เป็นโรคข้อเสื่อมโดยการฉีด เอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 4% (w/v) ไปยังบริเวณข้อเข้าปริมาตร 20 μ l จำนวน 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งห่างกัน 3 วัน เมื่อฉีดครบแล้ว พักหนูอีก 7 วันแล้วทำการผ่าหนูตัดเอาส่วนของกระดูกอ่อนมา fixed ด้วย 4% paraformaldehyde ข้ามคืนแล้วนำไปตัด section ให้มีความหนา 5 มิลลิเมตร เพื่อที่จะทำการศึกษาต่อไป

เพื่อที่จะศึกษาลักษณะของเซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อม และชั้นกระดูกปกติ จึงทำการย้อมชั้นกระดูกด้วยสี H&E จากการศึกษาพบว่าเซลล์คอนโดโรไซต์ในชั้นกระดูกปกติมีการเรียงตัวที่ปกติเมื่อเทียบกับชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมที่การเรียงตัวของเซลล์คอนโดโรไซต์มีลักษณะเกาะกลุ่มกันซึ่งเป็นลักษณะอย่างหนึ่งที่พบได้ในโรคข้อเสื่อมดังรูป

Normal cartilage



OA rat cartilage



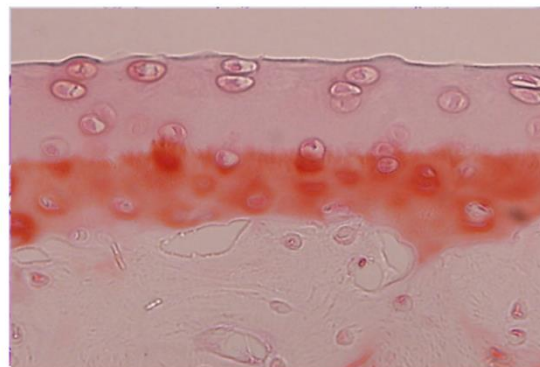
รูป 9 แสดงการย้อมชิ้นกระดูกด้วยสี H&E เปรียบเทียบกันระหว่างชิ้นกระดูกปกติและชิ้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อม

เพื่อที่จะศึกษาลักษณะการเสื่อมสลายของข้อเปรียบเทียบกันระหว่างชิ้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมและชิ้นกระดูกปกติ จึงทำการย้อมชิ้นกระดูกด้วยสี Safranin O เพื่อที่จะศึกษาปริมาณของโปรตีโอไกลแคนในชิ้นกระดูก พบว่าชิ้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีการสลายไปของสารในกลุ่มโปรตีโอไกลแคนเมื่อเทียบกับชิ้นกระดูกปกติ

Normal cartilage



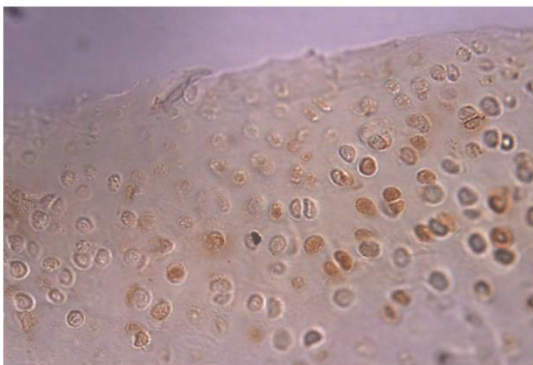
OA rat cartilage



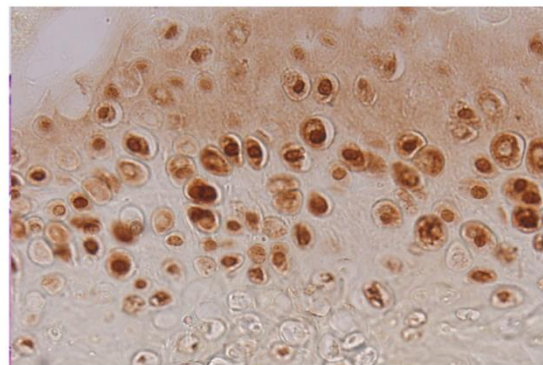
รูป 10 แสดงการย้อมชิ้นกระดูกด้วยสี Safranin O เปรียบเทียบกันระหว่างชิ้นกระดูกปกติและชิ้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อม

เพื่อที่จะศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 เปรียบเทียบกันระหว่างชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมและชั้นกระดูกปกติ ทำการย้อมชั้นกระดูกโดยใช้ 5D2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Immunohistochemistry จากการศึกษาพบว่าชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมเซลล์คอนโดรไซต์มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของโมเลกุล Thy-1 เมื่อเทียบกับเซลล์คอนโดรไซต์ในชั้นกระดูกปกติ

Normal cartilage

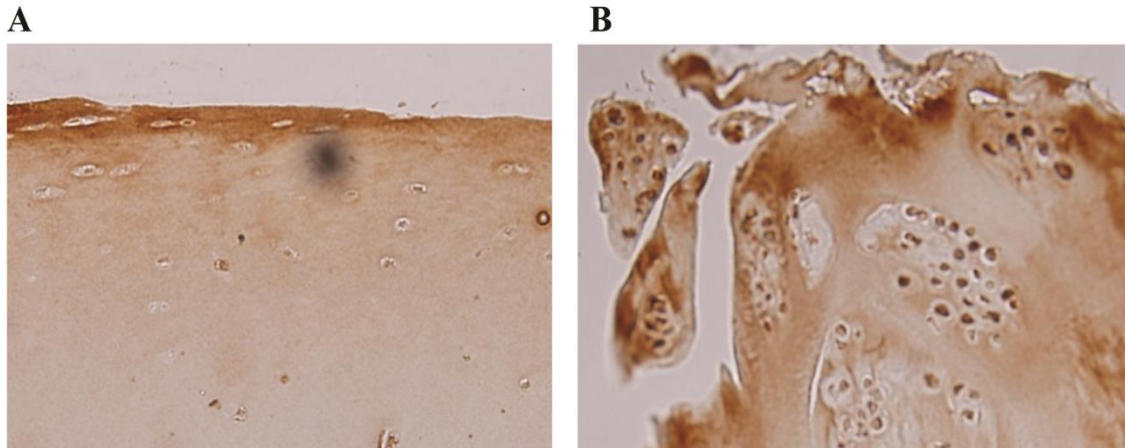


OA rat cartilage



รูป 11 แสดงการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 เปรียบเทียบกันระหว่างชั้นกระดูกปกติและชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมในหนู

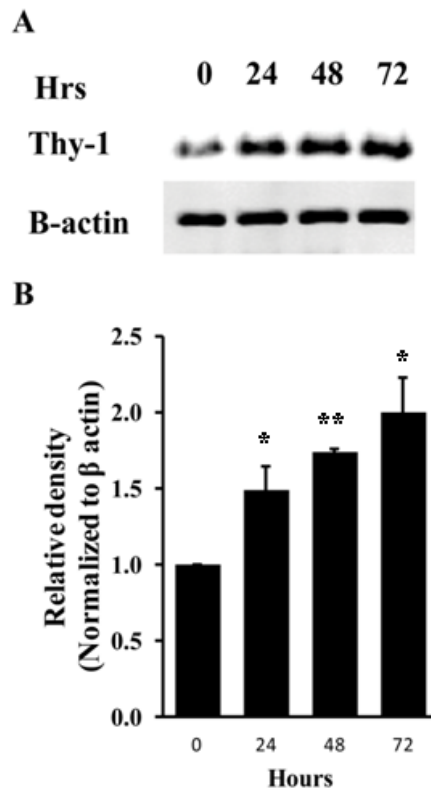
เพื่อที่จะยืนยันผลการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของโมเลกุล Thy-1 ในโรคข้อเสื่อมที่ได้จากโมเดลของหนูขาว จึงทำการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในชั้นกระดูกมนุษย์ที่เป็นโรคข้อเสื่อมโดยวิธี Immunohistochemistry จากการศึกษาพบว่าชั้นกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีสภาพการทำลายของบริเวณชั้นผิวกระดูกโดยเซลล์คอนโดรไซต์มีการเกาะกลุ่มกันและมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของโมเลกุล Thy-1 เมื่อเทียบกับชั้นกระดูกอ่อนปกติ



รูป 12 แสดงการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 เปรียบเทียบกันระหว่างชั้นกระดูกปกติ (A) และชั้นกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อม (B) ของมนุษย์

7. การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในเซลล์คอนโดโรไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Interleukin-1 β

เนื่องจากไซโตไคน์ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบมีบทบาทสำคัญต่อการก่อโรคข้อเสื่อม ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของ Interleukin-1 β ต่อการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในเซลล์คอนโดโรไซต์มนุษย์ ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ Thy-1 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นภายหลังจากการกระตุ้นด้วย Interleukin-1 β ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเลกุล Thy-1 ที่มีการแสดงออกในโรคข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากเซลล์คอนโดโรไซต์ถูกกระตุ้นด้วย Interleukin-1 β



รูปที่ 13 การแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 เซลล์คอนโดโรไซม์มนุษย์ หลังการกระตุ้นด้วย interleukin-1 β ในระยะเวลาต่างๆ แล้วทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์ และศึกษาการแสดงออกของ Thy-1 ด้วยวิธี western blot (A) โดยความเข้มของแบนด์ Thy-1 ที่ normalize ด้วย β -actin แสดงในรูป B กราฟแสดง mean $\pm$ SD. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์คอนโดโรไซต์มนุษย์ โดยโมโนโคลนอลชนิดนี้มีชื่อว่า 5D2 mAb ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่มีขนาด 25-35 KDa ที่พบมีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์คอนโดโรไซต์, เซลล์เยื่อข้อ, เซลล์สร้างกระดูก และ เซลล์ผิวหนัง โดยการวิเคราะห์ใช้เทคนิค mass spectrometry พบว่าโมเลกุลชนิดนี้คือ Thy-1

Thy-1 เป็นโมเลกุลที่มีขนาด 25-37 KDa เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์จัดอยู่ใน immunoglobulin-like supergene family (1) พบครั้งแรกเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม thymocyte differentiation ในหนู (2) พบมีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ fibroblasts, endothelial cells, neurons, และ chondrocytes หน้าที่ของ Thy-1 พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ T cell activation (3, 4), neurite outgrowth (5), apoptosis (6, 7), และ tumor suppression (8) ในข้อพบมีการแสดงออกในเซลล์คอนโดโรไซต์, เซลล์เยื่อข้อ, และ mesenchymal progenitor/stem cells หน้าที่ของ Thy-1 ที่มีการแสดงออกในข้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีรายงานพบว่าการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 มีความสัมพันธ์กับ chondrogenic potential โดยพบว่าเซลล์คอนโดโรไซต์ที่มี chondrogenic potential ที่สูงจะมีการแสดงออกของ Thy-1 ที่ต่ำ (9) นอกจากนี้ยังพบว่าโมเลกุล Thy-1 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเซลล์คอนโดโรไซต์แบบ monolayer culture ซึ่งการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเช่นนี้ทำให้เซลล์คอนโดโรไซต์อยู่ในภาวะ dedifferentiation (9) มีการศึกษาพบว่า interleukin-1 β สามารถที่จะกระตุ้นเซลล์คอนโดโรไซต์เข้าสู่ภาวะ dedifferentiation ด้วยการปลดการสร้าง collagen type II (10-12) ซึ่งจากสาเหตุเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาไปเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม โดยการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น interleukin-1 β และ tumor necrosis factor- α สามารถกระตุ้นให้ endothelial cells มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ โมเลกุล Thy-1 ได้ (13, 14) ในการศึกษาในครั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยพบว่า interleukin-1 β สามารถกระตุ้นให้เซลล์คอนโดโรไซต์มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของโมเลกุล Thy-1 โดยในโรคข้อเสื่อม เซลล์คอนโดโรไซต์จะถูกกระตุ้นทำให้มีการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบออกมา คือ interleukin-1 β และ tumor necrosis factor- α จากการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการศึกษาถึงการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในโรคข้อเสื่อมพบว่า หนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคข้อเสื่อมมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของโมเลกุล Thy-1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้ทำการยืนยันผลที่ได้โดยศึกษาในชิ้นกระดูกอ่อนมนุษย์ที่เป็นโรคข้อเสื่อมพบมีการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองเหล่านี้จึงกล่าวได้ว่า โมเลกุล Thy-1 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในโรคข้อเสื่อม

ข้อเสนอสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในชั้นกระดูกอ่อนพบมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นและเนื่องจากโมเลกุล Thy-1 มีความสามารถที่จะถูกหลั่งออกมาสู่ระบบไหลเวียนเลือดได้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ในโรคข้อเสื่อมโดยการใช้ตัวอย่างจาก synovial fluid หรือ ซีรัมของผู้ป่วยมาวินิจฉัยโดยวิธี ELISA

References

1. Williams, A.F. 1985. Immunoglobulin-related domains for cell surface recognition. *Nature*, 314:579-580.
2. Reif, A.E. and Allen, J.M. 1964. The Akr Thymic Antigen and Its Distribution in Leukemias and Nervous Tissues. *J Exp Med*, 120:413-433.
3. Marmor, M.D., Bachmann, M.F., Ohashi, P.S., Malek, T.R., and Julius, M. 1999. Immobilization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins inhibits T cell growth but not function. *Int Immunol*, 11:1381-1393.
4. Marmor, M.D. and Julius, M. 2000. The function of GPI-anchored proteins in T cell development, activation and regulation of homeostasis. *J Biol Regul Homeost Agents*, 14:99-115.
5. Doherty, P., Singh, A., Rimon, G., Bolsover, S.R., and Walsh, F.S. 1993. Thy-1 antibody-triggered neurite outgrowth requires an influx of calcium into neurons via N- and L-type calcium channels. *J Cell Biol*, 122:181-189.
6. Fujita, N., Kodama, N., Kato, Y., Lee, S.H., and Tsuruo, T. 1997. Aggregation of Thy-1 glycoprotein induces thymocyte apoptosis through activation of CPP32-like proteases. *Exp Cell Res*, 232:400-406.
7. Morita, H., Isobe, K., Cai, Z., Miyazaki, T., Matsumoto, Y., Shinzato, T., Yoshikai, Y., Kimata, K., and Maeda, K. 1996. Thy-1 antigen mediates apoptosis of rat glomerular cells in vitro and in vivo. *Nephron*, 73:293-298.
8. Lung, H.L., Bangarusamy, D.K., Xie, D., Cheung, A.K., Cheng, Y., Kumaran, M.K., Miller, L., Liu, E.T., Guan, X.Y., Sham, J.S., Fang, Y., Li, L., Wang, N., Protopopov, A.I., Zabarovsky, E.R., Tsao, S.W., Stanbridge, E.J., and Lung, M.L. 2005. THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 24:6525-6532.

9. Giovannini, S., Diaz-Romero, J., Aigner, T., Mainil-Varlet, P., and Nestic, D. Population doublings and percentage of S100-positive cells as predictors of in vitro chondrogenicity of expanded human articular chondrocytes. *J Cell Physiol*, 222:411-420.
10. Sandell, L.J. and Aigner, T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 3:107-113.
11. Hong, E.H., Yun, H.S., Kim, J., Um, H.D., Lee, K.H., Kang, C.M., Lee, S.J., Chun, J.S., and Hwang, S.G. Nicotinamide phosphoribosyltransferase is essential for interleukin-1 β -mediated dedifferentiation of articular chondrocytes via SIRT1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) complex signaling. *J Biol Chem*, 286:28619-28631.
12. Peng, H., Zhou, J.L., Liu, S.Q., Hu, Q.J., Ming, J.H., and Qiu, B. Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes in vitro. *Inflamm Res*, 59:519-530.
13. Lee, W.S., Jain, M.K., Arkonac, B.M., Zhang, D., Shaw, S.Y., Kashiki, S., Maemura, K., Lee, S.L., Hollenberg, N.K., Lee, M.E., and Haber, E. 1998. Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ Res*, 82:845-851.
14. Mason, J.C., Yarwood, H., Tarnok, A., Sugars, K., Harrison, A.A., Robinson, P.J., and Haskard, D.O. 1996. Human Thy-1 is cytokine-inducible on vascular endothelial cells and is a signaling molecule regulated by protein kinase C. *J Immunol*, 157:874-883.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Chanmee T, Phothacharoen P, Thongboonkerd V, Kasinrerker W, Kongtawelert P. Characterization of monoclonal antibodies against a human chondrocyte surface antigen. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2013; 32(3):180-6.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ : สามารถนำไปประยุกต์ทางด้านงานวิจัยพื้นฐานและประยุกต์เพื่อการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ
- เชิงวิชาการ : มีการพัฒนาใช้ ผลผลิตคือ monoclonal antibody 5D2 เพื่องานวิจัยด้านอื่นที่มี นศ. บัณฑิตเป็นหลัก ทำให้เกิดนักวิจัยรุ่นใหม่อีกเป็นจำนวนมาก

3. อื่นๆ : ได้มีการประเมินการยื่นจดสิทธิบัตร แต่ได้รับการปฏิเสธ จากหน่วยงาน อย่างไรก็ตาม น่าจะนำไปใช้จดสิทธิบัตรต่อไปเมื่อมีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูป เพื่อการวินิจฉัยโรค

Characterization of Monoclonal Antibodies Against a Human Chondrocyte Surface Antigen

Theerawut Chanmee,¹ Peraphan Phothacharoen,¹ Visith Thongboonkerd,²
Watchara Kasinrerker,³ and Prachya Kongtawelert¹

Chondrocytes express a number of cell-surface molecules that mediate cell-cell or cell-matrix interactions. Identification and full characterization of new chondrocyte surface molecules will lead to a better understanding of the function of the chondrocyte. Researchers used primary human chondrocytes as an immunogen, and various monoclonal antibodies (MAbs) were generated using standard hybridoma technology. A monoclonal antibody named 5D2 was selected for further characterization. The antigen recognized by 5D2 MAb is expressed by primary human chondrocytes, primary synovial fibroblasts, synovial fibroblast cell lines (SW982), primary skin fibroblasts, and osteoblasts, but not expressed in blood cells. Biochemical analysis revealed that the 5D2 antigen is a protein with a molecular weight of approximately 25–35 kDa. Protein identification by mass spectrometry and molecular cloning revealed that 5D2 antigen is identical to the Thy-1 molecule. Furthermore we confirmed this specificity of the antibody by the isolated and cloned Thy-1 gene to the COS-7 and probed it with the 5D2 antibody using Western blot analysis. We examined the role of the Thy-1 molecule in arthritis models and tissue; one was papain-induced rat arthritis, the other was immunohistological staining of osteoarthritic (OA) human articular cartilage. OA cartilage showed a higher expression of Thy-1 as compared with normal tissue in all experimental approaches. The *in vitro* studies showed that the inflammatory cytokine interleukin-1 β up-regulated Thy-1 molecule expression in the cartilage tissue. It can be concluded that the Thy-1 might be a potential biomarker for cartilage pathogenesis, degradation, and metabolic turnover.

Introduction

THE CHONDROCYTE IS THE ONLY CELL TYPE found in articular cartilage, which synthesizes and secretes extracellular matrix (ECM) molecules such as collagens, polysaccharides, and proteoglycans to ECM.⁽¹⁾ The major degenerative pathology associated with joint and cartilage, which affects the chondrocyte, is arthritis. Arthritis can be subdivided into two major classes: rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA).

Osteoarthritis (OA) is a group of chronic, painful, disabling conditions affecting articular joints, which occurs from various risk factors such as aging, obesity, and trauma.^(2–4) The initial stage of inflammation plays a major role in cartilage degradation leading to osteoarthritis, especially the released interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α).⁽⁵⁾ These cytokines act in an autocrine manner, stimulating their own production and inducing chondrocytes to produce proteases, chemokines, nitric oxide, and eicosanoids to drive catabolic pathways, inhibit matrix synthesis, and promote cellular apoptosis.⁽²⁾

Chondrocytes regulate the balance between anabolism and catabolism of the extracellular matrix. An alteration in the

protein expression pattern of these cells can influence the normal matrix homeostasis. The identification of differentially expressed proteins can help us identify new markers in OA progression and better understand the underlying disease processes.

We have produced monoclonal antibodies (MAb) against chondrocyte surface molecules for use as a research tool and biomarker for cartilage degradation. One of these is considering the practical applications of MAb 5D2. This paper reports (1) the biochemical characterization and cloning of the chondrocyte surface molecule that is recognized by this antibody and (2) its expression level in normal and OA cartilage.

Materials and Methods

Cell culture

Human articular cartilage was obtained (with full informed patient consent) from the arthroscopic diagnosis of a flat pad syndrome patient at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital (Department of Orthopedics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand [approval code 070CT111016]). Chondrocytes were isolated by overnight trypsin digestion at

¹Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and Stem Cells, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine; ³Department of Clinical Immunology, Faculty of Associate Medical Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

²Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkoknoi, Bangkok, Thailand.

4°C and a subsequent 3 h digestion with collagenase (type IA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37°C. The cells were washed with PBS and then cultured in DMEM containing 10% FCS as high-density primary monolayer cultures until confluence. Cells were passaged after becoming confluent using 0.05% trypsin/0.02% EDTA.

Generation of monoclonal antibodies against chondrocyte surface antigen

The BALB/c mouse was immunized intraperitoneally three times at 2-week intervals with primary human chondrocyte (1×10^7 cells). Spleen cells were isolated and fused with mouse myeloma P3-X63Ag8.653 cells by standard hybridoma fusion techniques using 50% polyethylene glycol and HAT medium selection. The immunoglobulin isotype of the MAb was determined using an isotyping ELISA kit (Sigma-Aldrich).

Flow cytometric analysis

Human chondrocytes, human synovial fibroblasts, human skin fibroblasts, lymphocytes, monocytes, chondrosarcoma cell lines, SW-982, Daudi, U937, K562, hFOB 1.19, and HepG2 cells were pre-incubated at 4°C for 30 min with 10% human AB serum. Thereafter 5×10^5 cells were stained with 5D2 culture supernatant at 4°C for 30 min. After washing twice with 1% BSA-PBS, the binding of antibody was detected by using FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibodies. Cells were incubated with conjugate at 4°C for 30 min. Then, cells were washed three times with 1% BSA-PBS and analyzed by flow cytometer.

Labeling of cells and immunoprecipitation

The primary human chondrocytes were washed with PBS. The cells ($1\text{--}5 \times 10^7$ cells/mL) were incubated with 5 mM sulfo-NHS-LC-Biotin at 4°C for 1 h. The biotinylation was quenched by washing once with 1 mM glycine in PBS first and twice with PBS. Then, labeled cells (1×10^7) were solubilized in 1 mL lysis buffer (5 mM iodoacetamide, protease inhibitor, 1% NP-40, Tris HCl [pH 8.2]) at 4°C for 30 min. The lysate was collected by centrifugation at 10,000 g, at 4°C for 20 min. The lysate was mixed with the 5D2 MAb coated CNBr Sepharose beads at 4°C overnight. After immunoprecipitation and SDS-PAGE, biotinylated proteins were transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was treated with 5% skim milk in TBS containing 0.05% Tween-20 (TBST) followed by incubation with 5D2 MAb in TBST and subsequent incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000 dilution; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) in TBST. The protein was visualized using the enhanced chemiluminescence plus detection system.

Purification and sequencing of 5D2 antigen

Primary human chondrocyte cell lysate was incubated with cyanogen bromide-activated Sepharose coupled with MAb 5D2 overnight at 4°C. After extensive washing with PBS, the bound proteins were eluted with 1x sample buffer (10% glycerol, 1% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 0.0625 M Tris-HCl [pH 6.8]). The eluted fractions containing the corresponding MAb 5D2 antigen (determined by immunoblotting) were pooled and separated by SDS-PAGE. The visualized

protein bands were excised, washed twice with 200 μ L of 50% acetonitrile (ACN)/25 mM NH_4HCO_3 buffer (pH 8.0) at room temperature (RT) for 15 min, and then washed once with 200 μ L of 100% ACN. After washing, the samples were extracted and digested with trypsin. Trypsin fragmentation products were analyzed by the Q-TOF UltimaTM mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom). Peptide sequences were compared using the MASCOT search tool.

Molecular cloning of 5D2 molecule

The total mRNA was isolated from the primary human chondrocyte. Thy-1 cDNA was generated by reverse transcription from the isolated mRNA, and the amount of cDNA was increased by RT-PCR. Thy-1 cDNA was cloned into pcDNA3.1 plasmid by using BamH1 and EcoR1 adaptors. The cDNA encoding Thy-1 was transfected to COS-7 cells by using a transfection reagent. $1\text{--}3 \times 10^5$ cells were plated in 35 mm dish, and then added with 1 μ g of DNA to GeneJuice reagent/serum-free medium mixture by adding the entire volume of mixture drop-wise to cells in the complete growth medium. The transfection mixture was removed after 2–8 h of incubation and replaced with complete growth medium. After 48 h of cultivation, cells were harvested and the expression of the Thy-1 molecule was detected by indirect immunofluorescence and analyzed by a flow cytometer.

Papain-induced arthritis

Three Wistar rats were injected with a 4% (w/v) papain saline solution into the right knee of each rat on days 1, 4, and 7 of the experimental period. Seven days after the last injection of papain, the animals were sacrificed. The cartilage samples were removed from the tibial plateau in the right knee. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and embedded, then cut into 10 μ m thick segments. Some sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Safranin O. Animal usage conformed with international and national guidelines for ethical conduct on the care and use of animals.

Immunohistochemical analysis

The expression of Thy-1 was studied during papain-induced OA. The papain model is characterized by a proteoglycan depletion of the articular cartilage. After being deparaffinized, the sections were incubated for 15 min with Chondroitinase ABC and then incubated for 10 min in 3% H_2O_2 . After blocking with 3% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated overnight with the monoclonal antibody. Each slide was stained with sheep anti-mouse IgM (μ chain specific) peroxidase conjugated for 1 h. The color was developed using diaminobenzidine substrate.

Interleukin-1 β induced human articular chondrocyte culture

To determine the expression of Thy-1 protein in cultured human chondrocytes, a Western blot analysis was performed. After the cells had grown to 80% confluence, cells were serum starved for 24 h before stimulation with the inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β , 10 ng/mL). Cells were collected at 0, 24, 48, 72, and 96 h after treatment. The cell lysate was analyzed on 12% SDS-PAGE and transferred to a

TABLE 1. FLOW CYTOMETRY SURFACE EXPRESSION OF 5D2 ANTIGEN ON VARIOUS CELL TYPES OBTAINED BY FLOW CYTOMETRY

Primary cell	
Chondrocyte	+
Synovial fibroblast	+
Skin fibroblast	+
Lymphocyte	-
Monocyte	-
Cell lines	
Chondrosarcoma (SW1353)	-
SW 982	+
Daudi	-
U937	-
K562	-
hFOB 1.19	+
HepG2	-

+, Markers staining positive in more than 98% of cells; -, markers expressed in less than 2% of cells.

nitrocellulose membrane. The membrane was treated with 5% skim milk in TBST containing 0.05% TBST, followed by incubation with the 5D2 MAb in TBST and subsequent incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (dilution, 1:2000; Amersham Biosciences) in TBST.

The expression of Thy-1 protein was visualized using the enhanced chemiluminescence plus detection system.

Results

Cellular distribution of 5D2 antigen

We characterized the molecule recognized by 5D2 MAb on various cell types, including human chondrocytes, human synovial fibroblasts, human skin fibroblasts, lymphocytes, monocytes, chondrosarcoma cell lines, SW-982, Daudi, U937, K562, hFOB 1.19, and HepG2 (Table 1) by the indirect immunofluorescence method. All peripheral blood mononuclear cells and hematopoietic cell lines, including lymphocytes, monocytes, Daudi, U937, and K562, were negative stained with 5D2 MAb. The analysis of cells, which were found in bones and joints including primary human chondrocytes, primary synovial fibroblasts, synovial fibroblast cell lines (SW982), and osteoblast cell lines (hFOB1.19), was strongly positive stained with 5D2 MAb. Its expression was also found in primary skin fibroblasts. On the other hand, neither chondrosarcoma cell lines (SW1353) nor HepG2 cells were recognized. These results indicated that 5D2 antigen is expressed in the cells associated with bones and joints, including human chondrocytes, synovial fibroblasts, and osteoblast cells.

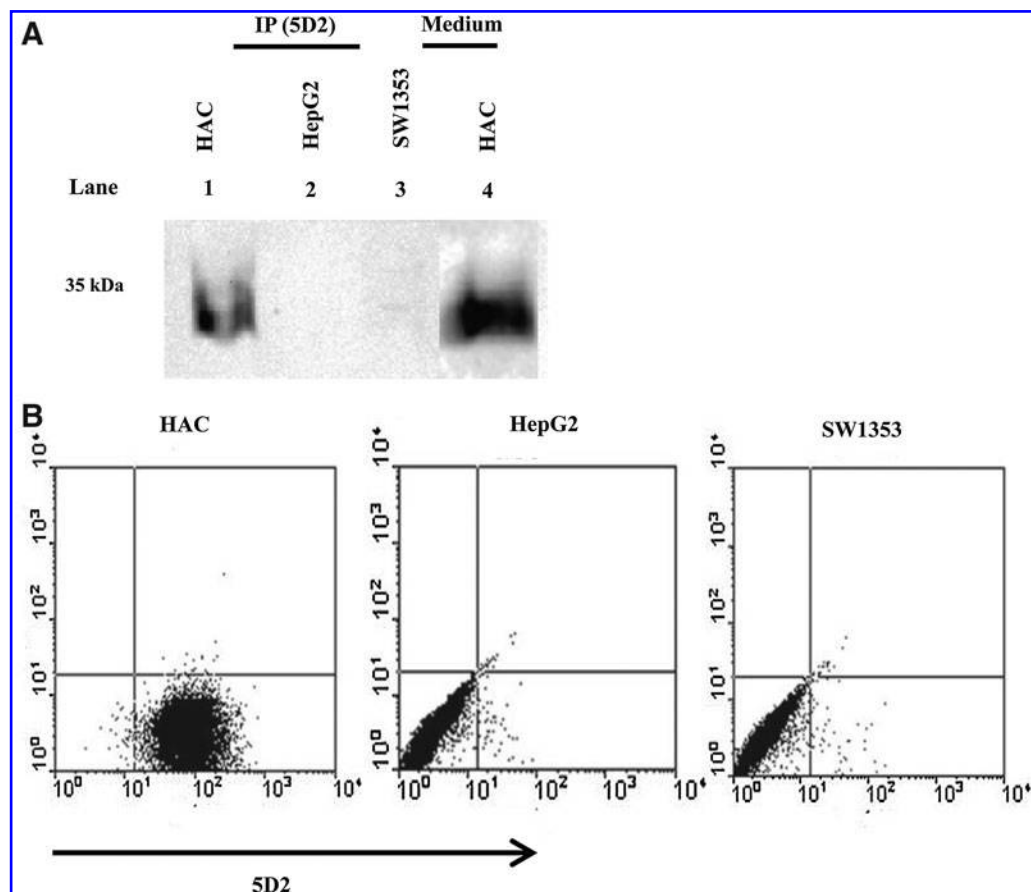


FIG. 1. Biochemical characterization of cell surface molecule recognized by 5D2 MAb. Western blot analysis of immunoprecipitates obtained with either 5D2 MAb from lysates of surface biotin-labeled HAC (lane 1), HepG2 (lane 2), and SW1353 (lane 3). (A) The culture media of HAC was subjected to Western blot analysis using 5D2 MAb (lane 4). (B) Flow cytometric analysis of 5D2 molecule expression on HAC, HepG2, and SW1353.

TABLE 2. MASS SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF 5D2 MOLECULE

Band no.	Protein name	NCBI ID	Accession no.	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	pI	MW (kDa)
c1	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS, MS/MS	55, 49	31, 18	4, 2	8.96	18.17
c2	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS/MS	NA, 71	NA, 18	NA, 2	8.96	18.17
c3	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS, MS/MS	63, 134	31, 18	4, 3	8.96	18.17
c4	Thy-1 (cell surface antigen) [Homo sapiens]	gi 339683	AAA61180	MS/MS	NA, 34	NA, 8	NA, 1	8.96	18.17

NCBI, National Center for Biotechnology Information; %Cov, % sequence coverage [(no. of matched residues/total no. of residues in entire sequence) × 100%]; NA, not applicable. Thy-1 = 100% identities with 5E10 antigen [Homo sapiens] gi|13195770 (AAB26353). Thy-1 = 80% identities with CD90 protein [Sus scrofa] gi|224697007 (CAM58077). Thy-1 = 69% identities with CD90.1 [Mus musculus] gi|38325830 (AAR17087).

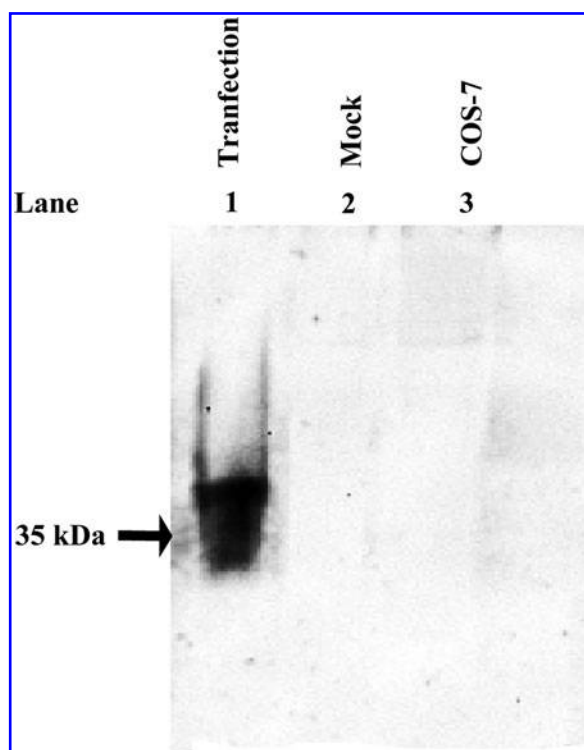


FIG. 2. Molecular cloning of Thy-1 molecule in COS-7 cell. Expression construct for Thy-1 or mock expression vector (pcDNA3.1) was used to transfect COS-7 cells. After 48 h of transfection, cells were harvested. Western blotting utilized primary antibody to Thy-1 followed by HRP-conjugated secondary antibody and enhanced chemiluminescence for visualization of Thy-1 molecule.

Biochemical characterization of surface molecule recognized by 5D2 MAb

Biochemical studies were performed to characterize the molecule that is recognized by 5D2 MAb using an immunoprecipitation technique. As shown in Figure 1, researchers were able to precipitate a 35 kDa protein from the lysates of surface-biotinylated primary human chondrocytes using 5D2 MAb coupled with cyanogen bromide-activated Sepharose, whereas the antibody did not bind to any protein in cell lysates of HepG2 and SW1353 cell lines (Fig. 1A). These results were confirmed by flow cytometric analysis (Fig. 1B). Furthermore, it was found that the 5D2 molecule can be detected in the culture medium of primary human chondrocytes (Fig. 1A, lane 4).

Mass spectrometric identification of 5D2 molecule

The analysis of 5D2 molecule by mass spectrometry revealed that the 5D2 molecule was significantly matched with Thy-1. Sequence homology search in the NCBI protein database revealed that Thy-1 is 100% identical to the 5D2 antigen [Homo sapiens] (gi|13195770) (AAB26353); 80% identical with the CD90 protein [Sus scrofa] (gi|224697007) (CAM58077); and 69% identical with the CD90.1 [Mus musculus] (gi|38325830) (AAR17087) (Table 2).

To confirm the identification of 5D2 molecule in which the structure has been revealed by mass spectrometry, the cDNA of Thy-1 was inserted via EcoRI and BamHI into the

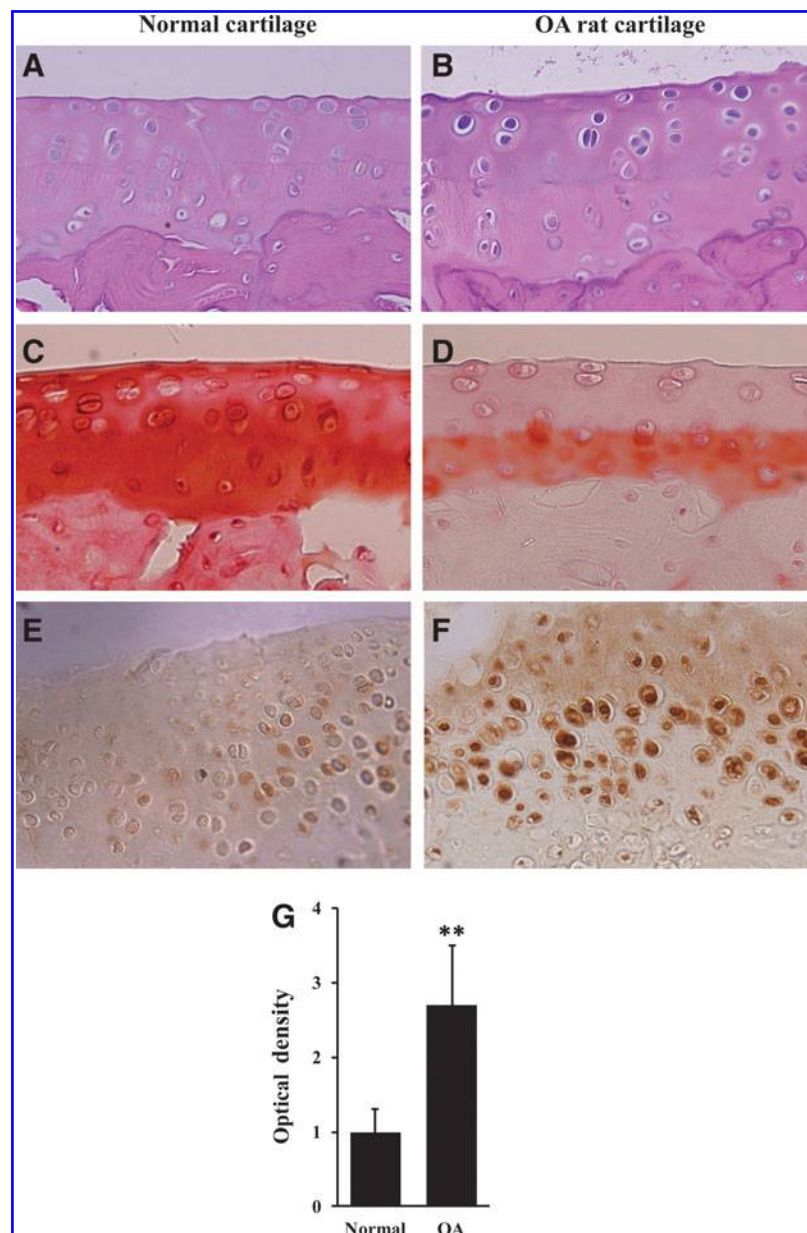


FIG. 3. Histologic analysis of papain-induced osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats. Right knee joints were injected with papain solution. The non-injected left knee joints served as internal controls. Sections of articular cartilage from the knee joints of control or OA rats were stained with H&E to visualize cell morphology (A,B) and stained with Safranin O to detect proteoglycans (C,D). Expression of Thy-1 molecule was examined by immunohistochemistry (E,F). H&E staining in normal knee joint (A) and after papain injection (B). Safranin O staining in normal knee joint (C) and after papain injection (D). Thy-1 expression in normal knee joint (E) and after papain injection (F). Average optical density of reaction products was tested by image analysis (G). Statistical significance, ** $p < 0.01$.

pcDNA3.1 vector and transfected into the COS7 cells, which were subsequently tested for binding of the 5D2 MAb. The transfected COS7 cells expressed Thy-1 molecule, which was observed by Western blot analysis (Fig. 2), demonstrating that the 5D2 antigen is indeed a determinant of the Thy-1 molecule.

Expression of Thy-1 in osteoarthritis

The Thy-1 expression was investigated in the rat model of experimental arthritis using papain-induced arthritis

by immunohistological staining. It was found that cartilage in the control rat had a normal chondrocyte structure, showing an intact surface and typical staining of the matrix with Safranin O (Fig. 3A,C). This contrasts with the OA group, which showed marked morphologic changes and the loss of matrix components (Fig. 3B,D). A further investigation of the Thy-1 expression in normal and OA rat cartilage by immunohistochemistry used MAb 5D2, and it was found that the expression of Thy-1 was significantly higher in OA than in normal cartilage (Fig. 3E-G).

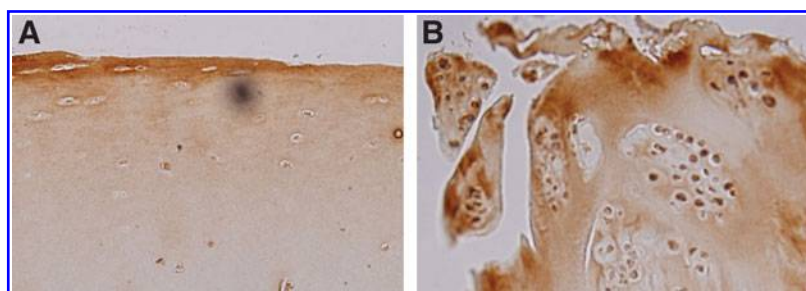


FIG. 4. Thy-1 expression on human normal (A) and osteoarthritic cartilage (B). Normal and osteoarthritic cartilage sections were stained with 5D2 MAb, which detected the stained antibody by using sheep anti-mouse IgM (μ chain specific) peroxidase conjugated. The color was developed using diaminobenzidine substrate.

Researchers further assessed the expression pattern and determined the precise immunolocalization of Thy-1 in normal and OA human articular cartilage tissue samples. It was found that there was a complete loss of cartilage and chondrocyte aggregation in arthritic lesions in OA samples. In OA tissue samples, clusters of chondrocytes showed strong im-

munoreactivity with 5D2 antibody compared with normal cartilage (Fig. 4).

Because a number of inflammatory cytokines play an important role in osteoarthritis, we then studied the effect of IL-1 β on Thy-1 expression in a human articular chondrocyte culture. It was found that there was an increased Thy-1 expression in the cell lysate at 24 h after treatment with the cytokine interleukin-1 β (Fig. 5), which was demonstrated by the Western blotting technique.

Discussion

In the present study, monoclonal antibodies were produced against the primary human chondrocyte surface antigen. A MAb named 5D2 was selected for further characterization. It was found that 5D2 antigen was a 25–35 kDa protein that is expressed in many cell types, including chondrocyte, synovial fibroblast, osteoblast, and skin fibroblast. By using a mass spectrometry analysis and cloning system, it was proven that the 5D2 antigen was a determinant on the Thy-1 molecule.

Thy-1 is a 25–37 kDa GPI-anchored cell surface protein that belongs to the immunoglobulin-like supergene family⁽⁶⁾ originally described as a marker for thymocyte differentiation in mice.⁽⁷⁾ Thy-1 was subsequently found to be expressed in various cell types, including fibroblasts, endothelial cells, neurons, and chondrocytes. Thy-1 has been reported to function in T cell activation,^(8,9) neurite outgrowth,⁽¹⁰⁾ apoptosis,^(11,12) and tumor suppression.⁽¹³⁾ In joint tissue, Thy-1 is also expressed by synovial fibroblast, chondrocyte, and mesenchymal progenitor/stem cells.⁽¹⁴⁾ The precise biological function of Thy-1 in joint tissue is not clear. It has been reported that the expression of Thy-1 in chondrocyte was correlated with its chondrogenic potential. The chondrocyte with higher chondrogenic potential showed the lack of Thy-1 expression.⁽¹⁵⁾ Interestingly, the expression of Thy-1 was increased during monolayer culture, which referred as dedifferentiation of the chondrocyte.⁽¹⁵⁾ There is increasing evidence that interleukin-1 β induced chondrocyte dedifferentiation by reducing type II collagen expression.^(5,16,17) This event played an important role in OA development.

In an *in vitro* study, the inflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α up-regulated Thy-1 expression in vascular endothelial cells.^(18,19) In the present study, we found that interleukin-1 β induced Thy-1 expression in human chondrocytes. This demonstrated that Thy-1 was up-regulated in human chondrocyte cells in response to interleukin-1 β .

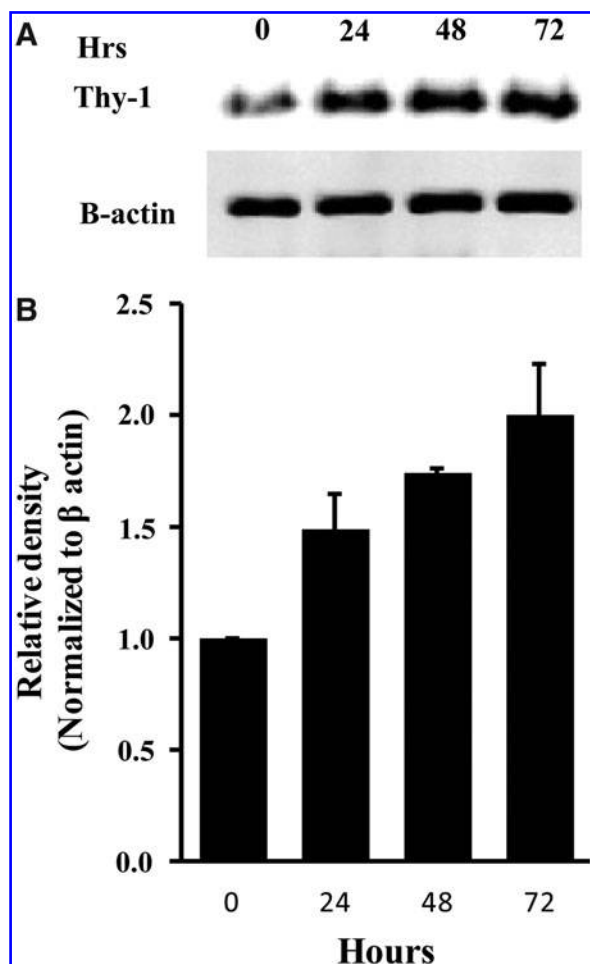


FIG. 5. Expression of Thy-1 protein in cultured human primary chondrocytes. Cells were serum starved for 24 h and incubated with the inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β , 10 ng/mL). Cells were lysed with sample buffer at 0, 24, 48, and 72 h after treatment. (A) Western blot analysis was performed with 5D2 MAb. (B) Densitometric analysis of Thy-1 expression.

In OA, the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , are increased by articular chondrocytes. The current study was designed to study the expression of Thy-1 in OA disease. The expression of Thy-1 was studied in papain-injected rat joints and compared with normal knee joints using immunohistochemical methods. It was found that in the cartilage of normal knee joints hardly any expression of Thy-1 was observed. After injection of papain, the expression of Thy-1 was enhanced. Similar results were observed in human osteoarthritis cartilage. This result indicated that Thy-1 was increased in OA, which was the outcome of the inflammation cascade. Secreted forms of Thy-1 (sThy-1) have been found to be significantly elevated in synovial fluid of patients with RA.⁽²⁰⁾ Synovial fluid contains cytokines, matrix degradation products, enzymes, and other factors. The expression of sThy-1 may be induced or enhanced under these conditions and the membrane-bound Thy-1 is shed or cleaved from the cell surface to the synovial fluid.

In summary, the up-regulation of Thy-1 by the inflammatory cytokine interleukin1- β in articular chondrocytes and the increase of Thy-1 in two experimental arthritis conditions, including papain-induced rat arthritis and osteoarthritic human cartilage, suggest that Thy-1 may be a good marker for investigating OA disease.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the following: the RGJ doctorate program (PHD/0258/2549) for scholarship support (TJ); the Thailand Research Fund (BRG 5180012) (PK); the Thailand Research Fund (RTA5380005); the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative (VT); and the NSTDA Research Chair Grant, National Sciences and Technology Development Agency (WK).

Author Disclosure Statement

The authors have no financial interests to disclose.

References

1. Archer CW, and Francis-West P: The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:401–404.
2. Bonnet CS, and Walsh DA: Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 2005;44:7–16.
3. Loeser RF: Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006;54:1357–1360.
4. Martel-Pelletier J, and Pelletier JP: Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklek Hastalik Cerrahisi* 2010;21:2–14.
5. Sandell LJ, and Aigner T: Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3:107–113.
6. Williams AF: Immunoglobulin-related domains for cell surface recognition. *Nature* 1985;314:579–580.
7. Reif AE, and Allen JM: The Akr thymus antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J Exp Med* 1964;120:413–433.
8. Marmor MD, Bachmann MF, Ohashi PS, Malek TR, and Julius M: Immobilization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins inhibits T cell growth but not function. *Int Immunol* 1999;11:1381–1393.
9. Marmor MD, and Julius M: The function of GPI-anchored proteins in T cell development, activation and regulation of homeostasis. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;14:99–115.
10. Doherty P, Singh A, Rimon G, Bolsover SR, and Walsh FS: Thy-1 antibody-triggered neurite outgrowth requires an influx of calcium into neurons via N- and L-type calcium channels. *J Cell Biol* 1993;122:181–189.
11. Fujita N, Kodama N, Kato Y, Lee SH, and Tsuruo T: Aggregation of Thy-1 glycoprotein induces thymocyte apoptosis through activation of CPP32-like proteases. *Exp Cell Res* 1997;232:400–406.
12. Morita H, Isobe K, Cai Z, Miyazaki T, Matsumoto Y, Shinzato T, Yoshikai Y, Kimata K, and Maeda K: Thy-1 antigen mediates apoptosis of rat glomerular cells in vitro and in vivo. *Nephron* 1996;73:293–298.
13. Lung HL, Bangarusamy DK, Xie D, Cheung AK, Cheng Y, Kumaran MK, Miller L, Liu ET, Guan XY, Sham JS, Fang Y, Li L, Wang N, Protopopov AI, Zabarovsky ER, Tsao SW, Stanbridge EJ, and Lung ML: THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 2005;24:6525–6532.
14. Campbell DD, and Pei M: Surface markers for chondrogenic determination: a highlight of synovium-derived stem cells. *Cells* 2012;1:1107–1120.
15. Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, Mainil-Varlet P, and Nesić D: Population doublings and percentage of S100-positive cells as predictors of in vitro chondrogenicity of expanded human articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 2010;222:411–420.
16. Hong EH, Yun HS, Kim J, Um HD, Lee KH, Kang CM, Lee SJ, Chun JS, and Hwang SG: Nicotinamide phosphoribosyltransferase is essential for interleukin-1 β -mediated dedifferentiation of articular chondrocytes via SIRT1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) complex signaling. *J Biol Chem* 2011;286:28619–28631.
17. Peng H, Zhou JL, Liu SQ, Hu QJ, Ming JH, and Qiu B: Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes in vitro. *Inflamm Res* 2010;59:519–530.
18. Lee WS, Jain MK, Arkonac, BM, Zhang, D, Shaw, SY, Kashiki, S, Maemura K, Lee SL, Hollenberg NK, Lee ME, and Haber E: Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ Res* 1998;82:845–851.
19. Mason JC, Yarwood H, Tamok A, Sugars K, Harrison AA, Robinson PJ, and Haskard DO: Human Thy-1 is cytokine-inducible on vascular endothelial cells and is a signaling molecule regulated by protein kinase C. *J Immunol* 1996;157:874–883.
20. Saalbach A, Wetzig T, Hausteiner UF, and Anderegg U: Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell Tissue Res* 1999;298:307–315.

Address correspondence to:

Dr. Prachya Kongtawelert
Thailand Excellence Center for Tissue Engineering
and Stem Cells Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
Chiang Mai University
Chiang Mai 50200
Thailand

E-mail: prachya.kongtawelert@gmail.com

Received: September 6, 2012

Accepted: January 24, 2013