เอกสารแนบหมายเลข 2/1

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380230

ชื่อโครงการ: พัฒนาการของเซลล์สร้างกระดูกต้องการออกซิเจนผ่านกลไกของวีเอชแอล

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: อ.ทพญ.ดร. สมหญิง พัฒน์ธีรพงศ์

อีเมล์: p_somying@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

ที่มา: การสูญเสียกระดูกในบริเวณที่มีการอักเสบร่วมด้วยเกิดจากหลายสาเหตุรวมถึงปริมาณของออกซิเจนในบริเวณที่มีออกซิเจนจำกัดการสร้างกระดูกจะถูกรบกวนซึ่งจะส่งผลให้เกิดการรบกวนการหายของแผลที่กระดูก อย่างไรก็ตาม บทบาทของโปรลิลไฮดรอกซิลเลส/วอนฮิปเปลลินเดาทิวเมอร์ซับเพลสเซอ/ฮายปอกเซียอินดิวซิเบิลแฟกเตอร์ (พีเอชดี/วีเอชแอล/ฮิป) ต่อกลไกการขับเคลื่อนของปริมาณของออกซิเจนต่ำในเซลล์สร้างกระดูกยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน

วิธีการทดลอง: ศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกด้วยเซลล์เคาติงคิด ดูการแสดงออกของแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการแสดงออกของยีนส์ โปรตีนฮิปแอลฟาศึกษาด้วยวิธีเวสเท

นบลอตติง การแสดงออกของยีนส์พีเอชดีและยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของเซลล์สลายกระดูกศึกษาด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอา นอกจากนี้เซลล์ตั้งต้นของเซลล์สร้างกระดูกถูกตัดยีนส์วีเอชแอลออกด้วยการทรานสเฟคด้วยเลนติไวรัสที่มีครีรีคอมบิเนสแล้วศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

ผลการทดลอง: ภายใต้ภาวะออกซิเจนต่ำเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นแต่ลดการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก รวมถึงมีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนฮิปวันอัลฟาและฮิปทูอัลฟามากขึ้น ยีนส์พีเอชดีทู พีเอชดีทรีแรงน์ไลแกน และวีอีจีเอฟเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออยู่ในปริมาณออกซิเจนที่ต่ำลง เซลล์ตั้งต้นที่ถูกตัดยีนส์วีเอชแอลออกแสดงออกในลักษณะเหมือนเซลล์ที่อยู่ในภาวะออกซิเจนต่ำคือ มีการเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นแต่ลดการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

สรุป: ภาวะออกซิเจนต่ำส่งผลกระทบต่อเซลล์ตั้งต้นและเซลล์สร้างกระดูกทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลผ่านทางฮิปพาทเวย์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการหายช้าของกระดูกที่อยู่ภายใต้ปริมาณออกซิเจนต่ำแบบเรื้อรัง

คำหลัก : เซลล์สร้างกระดูก; ภาวะออกซิเจนต่ำ; การเจริญเติบโต; การพัฒนาการ; วีเอชแอล

Abstract

Project Code : MRG5380230

Project Title : Osteogenesis requires oxygen-dependent mechanism via VHL

Investigator : Dr. Somying Patntirapong

E-mail Address : p_somying@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract:

Background: Inflammation-associated bone loss is caused by multifactorial mediators including oxygen levels. Under restricted oxygen supply, bone formation is affected, which leads to impair osseous healing. However, role of prolyl hydroxylase/von Hippel Lindau tumor suppressor/ hypoxia inducible factor (PHD/VHL/HIF)-driving machinery of hypoxia in osteoblast responses is currently poorly understood.

Methods: Cell proliferation and osteoblast differentiation were investigated using cell counting kit, alkaline phosphatase (ALP) activity assay, and quantitative reverse transcriptase- polymerase chain

reaction (qRT-PCR). Stabilization of HIF-α proteins were tested by western blotting. PHDs and osteoclastogenesis-related mRNA expressions were examined by qRT-PCR. In addition, VHL was deleted in osteoprogenitor cells flanking loxP sites by transfected with lentivirus containing Cre recombinase and subjected to cell proliferation and differentiation assays.

Results: Under hypoxic condition, osteoprogenitor cell proliferation was significantly increased and osteoblast differentiation was decreased as evident by reduced ALP activity and mRNA level. HIF-1α and HIF-2α protein bands were notably increased in cells exposed to low oxygen. Component of HIF pathway (PHD2 and PHD3) and osteoclastogenesis mediators (RANKL and VEGF) mRNA expressions were upregulated by hypoxia. VHL-deleted osteoprogenitor cells mimic hypoxic osteoprogenitor cells by enhancing cell proliferation and reducing cell differentiation.

Conclusion: Hypoxia affected osteoprogenitor cell population at the cellular and molecular levels via HIF pathway. This may lead to delayed bone formation especially in osseous healing exposed to chronic low oxygen microenvironment.

Keywords : osteoblast; hypoxia; proliferation; differentiation; VHL