



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของสารชีววาสเดตินต่อการ
กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส
ของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

โดย นายพสุธา รัญญะกิจไพศาล และคณะ

30 มิถุนายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของสารชีววาสดิติน ต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์
และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

คณะผู้วิจัย

1. นายพสุธา ธีระกิจไพศาล
2. Dr. Joseph P. Bidwell

สังกัด

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Medical school, Indiana University, USA

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ. นพ. รัชตะ รัชตะนาวิน ผศ. ทญ. ดร. วิสาขะ ลีม่วงส์ และ ผศ. ทญ ดอลลี เมธาธราธิป ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณ รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์ ที่ให้คำแนะนำการแยกเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกศีรษะของหนู และ Professor Dr. Shohei Kasugai ที่ให้คำแนะนำในการแยกเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกของหนู ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการอนุญาตใช้สถานที่และอุปกรณ์เพื่อการวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก มูลนิธิปรีดิญาณ เอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2544 และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2544

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/30/2544
 ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของสารซิมวาสเตติน ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก
 นักวิจัย และสถาบัน : 1. นายพสุธา ฐัญญะกิจไพศาล
 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 2. Dr. Joseph P. Bidwell
 Medical school, Indiana University, Indiana
 Email Address : pthunyak@hotmail.com
 ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกระดูกซี่โครงของหนูแรกเกิดและเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู โดยเซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินในระดับความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกวิเคราะห์ด้วยสารเอมทีที, [^3H] thymidine incorporation assay และ Northern blot ตามลำดับ ผลการทดลองพบสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกระดูกซี่โครงและไขกระดูกของหนูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินจะถูกยับยั้งด้วยสารเมวาโลเนตตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบด้วยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay พบสารซิมวาสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 10, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมร้อยละ 17, 25, 18 และ 32 ตามลำดับ และมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-myc ร้อยละ 32, 17, 20 และ 22 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า สารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

คำหลัก : เซลล์สร้างกระดูก ซิมวาสเตติน การเพิ่มจำนวนเซลล์

Abstract

Project Code : PDF/30/2544

Project Title : Effects of simvastatin on the proliferation and the mRNA levels of c-fos and c-myc in primary calvarial cells and primary bone marrow stromal cells

Investigators Dr. Pasutha Thunyakitpisal
Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
Dr. Joseph P. Bidwell
Medical school, Indiana University, Indiana

Email Address : pthunyak@yahoo.com

Project Period 2 years

The objectives of this study is to investigate the effect of simvastatin on the proliferation and the mRNA levels of c-fos and c-myc on primary calvarial cells and primary bone marrow stromal cells. Cells were treated with the different concentrations of simvastatin for 24 hours. After that, cells were collected and analyzed by using MTT, [³H] thymidine incorporation assay and northern blot analysis, respectively. The results revealed that the toxicity dose of simvastatin in primary calvaria and bone marrow stromal cells is 2 μM as compared to the control group (p<0.05). The toxicity of simvastatin was rebound by mevalonate in a dose-dependent manner. From [³H] thymidine incorporation assay, simvastatin, at 0.5 and 1 μM, significantly suppressed the proliferation of primary calvarial cells as compared to the control group (p< 0.05). Simvastatin, at 10, 100 and 500 nM, reduced c-fos mRNA level at 17, 25, 18 and 32 percent from the control group, respectively. In the same concentration, simvastatin downregulated c-myc mRNA level at 32, 17, 20 and 22 percent from the control group, respectively. From the results, simvastatin seems to be a suppressor of osteoblast proliferation and the mRNA level of c-fos and c-myc.

Keywords : Osteoblast, Simvastatin, Proliferation

สารบัญ

หน้าหัวเรื่อง	
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
บทนำ	1-2
วิธีการวิจัย	3-9
ผลการวิจัย	10-12
บทวิจารณ์	13-17
ส่วนอ้างอิง	18-23
รายการภาพประกอบ	
รูปที่ 1	24
รูปที่ 2	25
รูปที่ 3	26
รูปที่ 4	27
รูปที่ 5	28
รูปที่ 6	29
รูปที่ 7	30
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	31

บทนำ

กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) เป็นเนื้อเยื่อที่สำคัญของอวัยวะปริทันต์ ทำหน้าที่เป็นที่อยู่ของรากฟัน ที่ยึดเกาะของเอ็นยึดปริทันต์ รองรับและกระจายแรงที่เกิดจากการบดเคี้ยว ในผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่มีการทำลายกระดูกเบ้าฟัน จะมีการพยากรณ์โรคไม่ดี (poor prognosis) หากไม่ได้รับการรักษาทันตกรรมที่ กระดูกจะถูกทำลาย ทำให้ฟันโยก ไม่สามารถรองรับแรงบดเคี้ยว และต้องถอนออกไปในที่สุด โดยที่ฟันชิ้นนั้นอาจจะไม่ผุเลย ถึงแม้การรักษาโรคปริทันต์โดยการกำจัดหินน้ำลายและแผ่นคราบจุลินทรีย์ จะสามารถยับยั้งโรคไม่ให้มีการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อไป แต่การสร้างขึ้นมาใหม่ของกระดูกเบ้าฟันเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ พบว่าจะมีอัตราที่ต่ำมากและไม่แน่นอน¹ ดังนั้นการเร่งหรือกระตุ้นการสร้างขึ้นมาใหม่ของกระดูกเบ้าฟัน ย่อมมีส่วนสำคัญในการบูรณะอวัยวะปริทันต์ให้กลับมาทำงานได้ตามปกติ

โดยทั่วไปขั้นตอนของการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาทดแทน ประกอบด้วย 3 ระยะที่ต่อเนื่องกันคือ ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) จากนั้นเซลล์สร้างกระดูกจะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ทำงานสมบูรณ์ (cell differentiation and maturation) เพื่อเข้าสู่ระยะการสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix synthesis) และระยะการตกตะกอนสารอนินทรีย์ (mineralization) ตามลำดับ² โดยเซลล์สร้างกระดูกเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างขึ้นมาทดแทนของกระดูกเบ้าฟัน ดังนั้นสารที่มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ เร่งการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ทำงานสมบูรณ์ และการสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ ย่อมส่งผลทำให้การสร้างขึ้นมาทดแทนของเนื้อเยื่อกระดูกเร็วขึ้น

สารสเตตินเป็นยาที่ใช้ควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด และป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis)³ โดยสารกลุ่มสเตตินจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในการเปลี่ยน acetoacetyl CoA เป็นสารเมวาโลเนต

(mevalonate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างโคเลสเตอรอล³ ได้มีการรายงานถึงผลข้างเคียงของสารกลุ่มสเตตินที่มีต่อกระดูกที่ไม่สอดคล้องกัน โดยกลุ่มหนึ่งพบว่าสารกลุ่มสเตตินมีผลในการเพิ่มมวลของกระดูกโดยรวม แรงการหายของแผลและลดการหักของกระดูกในผู้ป่วยและสัตว์ทดลอง⁴⁻⁸ ในขณะที่นักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งได้รายงานว่าสารกลุ่มสเตตินไม่มีผลในการเพิ่มมวลของกระดูกโดยรวมของผู้ป่วยและชิ้นกระดูกที่แยกจากสัตว์ทดลอง⁹⁻¹³ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารซิมวาสเตติน (simvastatin) ต่อเซลล์สร้างกระดูกในแง่ของการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัสของจีน c-fos และ c-myc ซึ่งเป็นนิวเคลียสโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกในห้องปฏิบัติการ โดยความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นการสร้างข้อมูลความรู้พื้นฐานและความเข้าใจ ถึงผลและกลไกของสารซิมวาสเตตินต่อเซลล์สร้างกระดูก และอาจนำไปสู่การพัฒนาสารซิมวาสเตตินมาใช้ในการทางด้านสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับกระดูก

วิธีการทดลอง

การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกศีรษะของหนูทดลอง

รูปแบบและขั้นตอนดัดแปลงมาจากวารสารที่ดีพิมพ์¹⁴⁻¹⁶ กล่าวคือกะโหลกศีรษะของลูกหนูอายุ 1-2 วัน จะถูกแยกจากส่วนของเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) และ เนื้อเยื่อที่บีบระหว่างชั้นของกะโหลกศีรษะ (sutural fibrous tissue) จากนั้นชั้นกระดูกก็จะถูกทำให้มีขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร และย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนส ชนิดที่ II (collagenase type II, Gibco BRL, UK) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Hank's salt balance solution (Gibco BRL, UK) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นสารละลายจะถูกปั่นเพื่อรวบรวมเซลล์สร้างกระดูกที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นชั้นกระดูกก็ถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดที่ II ครั้งละ 20-30 นาที เป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยเซลล์ที่แยกได้จากการย่อยแต่ละครั้งจะถูกเรียกเป็น cell fraction ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ โดยเซลล์ fraction ที่ 3-5 จะถูกรวมด้วยกัน และนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 มิลลิเมตร (Nunc, Denmark) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ที่ประกอบด้วยซีรัม (fetal calf serum) ร้อยละ 10 กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรบโดมัยซิน ซัลเฟต 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน เซลล์จะเจริญแบ่งตัวเต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายใน 7 วัน จากนั้นจะถูกถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 โดยเซลล์สร้างกระดูกที่ใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 2-4

วิธีการแยกเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกของหนู

วิธีการแยกเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกหนู ใช้วิธี density gradient centrifugation ดัดแปลงมาจาก Lisignoli และคณะ¹⁷ โดยย่อก็คือกระดูก femur จากหนูอายุประมาณ 5-7 สัปดาห์ จะถูกนำไปจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ ประมาณ 3-5 ครั้ง จากนั้นตัดส่วนหัว (head) ของกระดูกออก ให้ต่ำกว่าส่วน epiphyseal plate ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นส่วนไขกระดูกจะถูกชำระล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ อัลฟาเอ็มอีเอ็ม (α -MEM) ที่ประกอบด้วยซีรัม (fetal calf serum) ร้อยละ 10 กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรบโดมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทนิซินบี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มเซลล์สร้างกระดูกจะถูกแยกจากเซลล์ไขกระดูกอื่นๆ ด้วย Ficoll-Paque™ Plus (Amersham, Sweden) ที่ความเร็ว 1,900 รอบต่อนาที กลุ่มเซลล์ mononucleus จะถูกรวบรวมและล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์อัลฟา-เอ็มอีเอ็มและนำไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน เมื่อเซลล์จะเจริญแบ่งตัวเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูก subculture เพื่อเพิ่มจำนวน โดยเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 2-5

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์และความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay) จะถูกนำมาใช้ทดสอบผลของสารชีวาสเตตินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งดัดแปลงและปรับปรุงจากวิธีของ Freshney¹⁸ โดยย่อก็คือ เซลล์สร้างกระดูกจะถูกหว่าน 30,000 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ แบบ 48 หลุม เมื่อจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีจำนวน

ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (80-90% confluency) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากซีรั่ม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตติน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันตามที่กำหนด จนครบเป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด ที่มีสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออก และใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide : DMSO) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การทดลองนี้ได้ถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี [³H] thymidine incorporation assay

วิธีวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี [³H] thymidine incorporation รูปแบบและขั้นตอนดัดแปลงมาจากวารสารทีดีพีเอ็มพี¹⁹⁻²¹ โดยยอเซลล์จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 48 หลุม หลุมละ 30,000 เซลล์ เซลล์จะถูกเลี้ยงจนได้ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นแบบปราศจากซีรั่ม 2 ครั้ง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง เซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยน (Phosphate buffer saline : PBS) จำนวน 3 ครั้ง และถูกตรึงด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วยสารละลาย TCA ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง สาย DNA จะถูกละลายโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

(NaOH) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 16 ชั่วโมง และปรับสภาวะความเป็นกรดต่างด้วยการดไฮโดรคลอไรด์ (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นสารละลายจะถูกใส่ในขวดพลาสติกที่มีสาร Scintillation fluid (Wallac Scintillation Product, UK) และวัดปริมาณสาร [^3H] thymidine ด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter Wallac-1414 (Biorad, USA) การทดลองนี้ได้ถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การแยกสายอาร์เอ็นเอโดยรวมจากเซลล์สร้างกระดูก

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู จะถูกเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงจนได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นแบบปราศจากซีรั่ม 2 ครั้ง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สายอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จะถูกแยกจากเซลล์ ด้วยสาร TRIzol reagent (GibcoBRL, UK) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่สาร TRI reagent 3 มิลลิลิตร จากนั้นสายอาร์เอ็นเอทั้งหมดจะถูกรวบรวมและเขย่าอย่างแรง ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนกลุ่มไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein complex) ให้ออกจากกัน สารคลอโรฟอร์มจะเติมลงไปในการละลาย เขย่าอย่างแรง และนำไปปั่นแยกชั้นสายอาร์เอ็นเอโดยรวมจากส่วนของโปรตีนและสายดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยสารละลายใสส่วนบนที่เป็นส่วนสายอาร์เอ็นเอโดยรวมจะถูกดูดแยก และทำให้ตกตะกอนด้วย isopropanol สายอาร์เอ็นเอโดยรวมที่ตกตะกอนจะถูกล้างด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นละลายสายอาร์เอ็นเอโดยรวมด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (RNase free water)

การวัดค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสายอาร์เอ็นเอโดยรวม ทำโดยคำนวณจากค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อการค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 280 โดยค่าอัตราส่วนที่ได้ ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 1.6

ส่วนความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอโดยรวม คำนวณจากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

$$= (\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260}) \times \text{Dilution factor} \times 40 / 1000$$

การสร้าง antisense radiolabeled riboprobe

pTRI vector ที่มีส่วนของท่อนจีน c-fos, c-myc และ GAPDH (Ambion Inc, USA) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ antisense radiolabel riboprobe ด้วยวิธี In vitro transcription โดยใช้ชุด Maxicript T7 RNA polymerase (Ambion Inc, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยย่อก็คือ pTRI vector 1 ไมโครกรัมจะถูกใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1 มิลลิโมลาร์ของ ATP, CTP, GTP และ 8.35 ไมโครโมลาร์ (α - ^{32}P) UTP (800 Ci/mmol, Amersham, England), 10 mM DTT, 10 unit ของ T7 RNA polymerase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงใส่เอนไซม์ Rnase-free Dnase เพื่อย่อยสารดีเอ็นเอต้นแบบ

Antisense radiolabeled riboprobe จะถูกทำให้ตกตะกอน เพื่อแยกจากนิวคลีโอไทด์อิสระ (free nucleotide) ด้วยสารละลาย ammonium acetate ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ absolute alcohol จำนวน 3 เท่าของปฏิกิริยา จากนั้น riboprobe จะถูกล้างด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ และถูกทำให้ละลายน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาณ 500 ไมโครลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยค่ากัมภาพรังสีของ riboprobe จะถูกวัดด้วยเครื่อง liquid Scintillation Counter Wallac-1414 (Biorad, USA)

การทำ Northern blot

อาร์เอ็นเอโดยรวม 1-5 ไมโครกรัม (total RNA) จากเซลล์สร้างกระดูก จะผสมกับ loading buffer (20 mM MOPs, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 0.025 (w/v) bromophenol blue, 70% formamide, 5% glycerol, 0.065% formaldehyde) และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสายอาร์เอ็นเอจะถูกแยกตามขนาดด้วย agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV illumination)

เจลจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที และปรับสภาพด้วย 10x SSC buffer (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate) สายอาร์เอ็นเอที่อยู่ในเจล จะถูกเคลื่อนย้ายมายังแผ่นเมมเบรน (Hybond N⁺, Amersham, USA) ด้วยวิธี capillary transfer เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และแผ่นเมมเบรนจะถูกทำให้แห้งและอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อยึดสารอาร์เอ็นเอให้อยู่กับแผ่นเมมเบรน

แผ่นเมมเบรนจะแช่ในสารละลาย Ultrahybrid (Ambion Inc, USA) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส และใส่สาร radiolabeled riboprobe ($0.5-1 \times 10^6$ cpm ต่อ 1 มิลลิตรของ Ultrahybrid) โดยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่ออย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นเมมเบรนจะถูกล้างด้วยสารละลาย low stringency washing buffer (2x SSC, 0.1% SDS) จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างต่อด้วยสารละลาย high stringency washing buffer (0.1x SSC, 0.1% SDS) จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยสัญญาณของจีนที่สนใจจะปรากฏด้วยวิธี autoradiograph จากนั้นจะวัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Densitometer

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารเคมีวาสเตดินกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแฉงทางเดียว (One-way Analysis of Variance) และแบบทดสอบของ scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทั้งนี้ในการวัดผลจะให้ค่าเฉลี่ยที่อ่านได้ในกลุ่มควบคุมเป็น 100 หรือแสดงในรูปอัตราส่วนเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลอง

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตติน ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ ด้วยสารเอ็มทีที ในสภาวะปราศจากซีรั่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ มีผลลดจำนวนเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 98.35 ± 3.69 , 95.49 ± 0.57 , 92.19 ± 2.07 , 93.89 ± 0.77 , 91.88 ± 1.25 , 92.62 ± 3.68 และ 87.97 ± 4.59 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย โดยสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ (2 ไมโครโมลาร์) มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู ดังแสดงในกราฟรูปที่ 1

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตติน ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกด้วยสารเอ็มทีที ในสภาวะปราศจากซีรั่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ มีผลเพิ่ม/ลดจำนวนเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 100.46 ± 5.35 , 99.93 ± 4.28 , 97.79 ± 7.96 , 97.98 ± 6.11 และ 89.25 ± 7.06 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย โดยที่ความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ (2 ไมโครโมลาร์) มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2

สารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ

ผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ
หนู ได้นำมาทดสอบด้วยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay จากการทดสอบพบว่าสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 84.23 ± 6.4 , 87.84 ± 1.98 , 79.91 ± 10.45 , 80.13 ± 6.29 , 73.39 ± 2.41 , 42.13 ± 2.94 และ 34.17 ± 9.39 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย โดยที่ความเข้มข้น 500 ($p < 0.01$), 1000 ($p < 0.001$) และ 2000 ($p < 0.001$) นาโนโมลาร์ มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินสามารถยับยั้งด้วยสารเมวาโลเนต

เมื่อทดสอบสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารเมวาโลเนต ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 500 ไมโครโมลาร์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารเมวาโลเนตมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 102.42 ± 12.23 , 118.59 ± 5.19 , 133.07 ± 6.23 , 132.95 ± 7.82 และ 138.45 ± 7.35 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารซิมวาสเตตินเพียงอย่างเดียวซึ่งให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย โดยที่ความเข้มข้นของสารเมวาโลเนต 50, 100 และ 500 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$, $p < 0.01$ และ $p < 0.005$ ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4

เซลล์สร้างกระดูกเมื่อถูกทดสอบด้วยสารเมวาโลเนตที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์เพียงอย่างเดียว พบว่าจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่วัดได้ (99.2 ± 7.51) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (100 ± 2.69) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย (รูปที่ 5)

สารชีววาสเดตินลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

เมื่อทดสอบเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ ด้วยสารชีววาสเดติน ในสภาวะปราศจากซีรั่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos และ c-myc ด้วยวิธี Northern blot พบว่า สารชีววาสเดตินที่ความเข้มข้น 10, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos ร้อยละ 17, 25, 18 และ 32 ตามลำดับ (รูปที่ 6) และที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารชีววาสเดตินมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-myc ร้อยละ 32, 17, 20 และ 22 ตามลำดับ (รูปที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ กลุ่มผู้วิจัยได้นำเสนอ ผลของการศึกษาความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดิน ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะและไขกระดูกของหนู ด้วยใช้วิธีการวัดปริมาณของเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที ผลของสารซิมวาสเตดินต่อการเพิ่ม/ ลด จำนวนเซลล์ โดยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay และผลของสารซิมวาสเตดินต่อระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos และ c-myc โดยวิธีวิเคราะห์ Northern blot

สารกลุ่มสเตอรอล ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3 methyl glutary-CoA reductase ในการสร้างสารเมวาโลเนตซึ่งจะนำไปสร้างเป็นโคเลสเตอรอลในที่สุด นอกจากนี้สารกลุ่มสเตอรอลยังมีผลยับยั้งการสร้างกลุ่ม isoprenoid เช่น geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) และ farnesyl pyrophosphate (FPP) ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมกลุ่มไขมัน (lipid attachment) ให้กับนิวเคลียสโปรตีน small GTPase เช่น Ras และ Rho GTPase²³⁻²⁴ ทำให้ ras และ rho สามารถยึดเกาะและเคลื่อนที่ไปมารอบผนังเซลล์ ไปยังตำแหน่งเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ต้องเคลื่อนที่ผ่านส่วนไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ โดยที่ส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic part) สามารถทำงานซึ่งเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดสัญญาณจากตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ (cell surface receptor) ส่งต่อมายังภายในเซลล์ (signal transduction) โดยโปรตีน ras และ rho มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์²⁵

การวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยสารเอ็มทีที ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารที่ต้องการทดสอบ โดยอาศัยหลักการที่ตรวจวัดระดับของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ที่พบอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการหายใจ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีที เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซัน (formazan) สีม่วง^{18,25} เมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม ก็จะสามารถนำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ฐานเพื่อหาปริมาณเซลล์ ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก สีม่วงของสารละลายของผลึกฟอร์มาแซนก็จะมี ความเข้มมากขึ้น และทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งวิธีนี้สามารถนำไปใช้วัดในแง่การเพิ่ม จำนวนของเซลล์และการตรวจสอบวัดความเป็นพิษกับสารที่ใช้ทดลอง

วิธีวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay อาศัยหลัก การที่เซลล์เมื่อมีการแบ่งตัวหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ จะมีการจำลองสร้างสายจีนหรือดีเอ็นเอ โดย อาศัยสารนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ adenosine, guanine, cytosine และ thymidine ดังนั้นการใส่สารนิว คลีโอไทด์ที่ถูกทำให้อยู่ในสภาพของสารกัมมันตภาพรังสีในอาหารเลี้ยงเซลล์ เช่น [^3H] thymidine ย่อมทำให้ [^3H] thymidine มีโอกาสเข้าไปเป็นส่วนประกอบของสายดีเอ็นเอ ทำให้สามารถตรวจวัด การเข้าร่วมของ [^3H] thymidine ในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่²⁶ ดังนั้นถ้าสารที่ทดสอบมีผลต่อการ เพิ่ม/ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ก็จะมีค่าสารกัมมภาพรังสีจากเซลล์ที่ทดสอบ สูง/ ต่ำกว่าเซลล์กลุ่ม ควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ หรืออาจกล่าวได้ว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมาก ก็จะพบว่ามีค่าสาร กัมมันตภาพรังสีสูงกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวช้า ซึ่งวิธีนี้จะมีความไว (sensitivity) สูง

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด และเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจาก ไชกระดูกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับการตีพิมพ์และยอมรับจากนักวิจัยว่า เป็นเซลล์ต้นแบบใน การศึกษาเซลล์สร้างกระดูก เนื่องจากแหล่งเนื้อเยื่อที่มาของเซลล์ ความสามารถของเซลล์ในการ แสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (osteoblast marker gene) และความสามารถใน การตกตะกอนสารอนินทรีย์ (calcification) เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ระดับความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดิน ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ และ เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ($p < 0.01$)

จากการศึกษาด้วยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay พบว่าสารซิมวาสเตดินที่ระดับ ความเข้มข้น 500 และ 1000 นาโนโมลาร์ มีผลยับยั้งการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้าง