

กระดูก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99.0 และ 99.9 ตามลำดับ ส่วนการลดลงของจำนวนเซลล์สร้างกระดูกเมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ เมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที คณะผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดิน ซึ่งผลของสารซิมวาสเตดินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกนี้สอดคล้องกับรายงานว่าสารกลุ่มสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดและเซลล์ mesangial ของไต ผ่านทาง โปรตีน Rho GTPase และ p21²⁷⁻²⁸

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูก สามารถถูกยับยั้งด้วยสารเมวาโลเนต ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ (by product) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใส่สารเมวาโลเนตที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ จำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การใส่สารเมวาโลเนตเพียงอย่างเดียว ไม่มีคุณสมบัติในการเพิ่มหรือลดจำนวนเซลล์สร้างกระดูก แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินบางส่วนผ่านทางกลไกการสร้างโคเลสเตอรอล หรือสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือดัดแปลงพัฒนา (intermediate substance) ในระหว่างการสร้างโคเลสเตอรอล เช่น GGPP และ FPP ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

c-myc และ c-fos เป็นนิวเคลียสโปรตีน (transcription factor) ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์²⁹⁻³¹ โดยในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน c-myc สามารถทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักตัว (quiescent) เข้าสู่ระยะการแบ่งตัว และการสร้าง c-myc อย่างสม่ำเสมอ (constitutive expression) สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวถึงจะอยู่ในภาวะปราศจาก growth factor³² โดย c-myc จะจับคู่กับนิวเคลียสโปรตีน Max เป็นกลุ่มโปรตีนต่างกัน (heterodimer) และไปจับกับ E-box DNA element ของโปรโมเตอร์ (promoter)

ของจีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น ornithine decarboxylase และ Cdc25A³³⁻³⁴ ส่วนโปรตีน c-fos จะมีการสร้างเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย growth factors เช่น transforming growth factor- β วิตามินดี ซึ่งจัดเป็นสารกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก โดยระหว่างที่เซลล์สร้างกระดูกมีการแบ่งตัว³⁵ จะพบว่าระดับโปรตีน c-fos จะสูงกว่าปกติ โดย c-fos จะจับคู่กับนิวเคลียสโปรตีน c-myc เป็นกลุ่มโปรตีน AP-1 ไปกระตุ้นการสร้าง cyclin D1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้การแบ่งเซลล์เคลื่อนจากระยะ G1 ไปสู่ระยะ S³¹ แต่เมื่อเซลล์สร้างกระดูกเข้าสู่ระยะสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ และระยะการตกตะกอนสารอนินทรีย์ ระดับ c-fos จะลดลง³⁶

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาผลของสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ ต่อระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก โดยตัดความเข้มข้นที่ 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ออก เพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเป็นพิษของสาร ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot แสดงให้เห็นว่า สารซิมวาสเตดินมีผลในการลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos ร้อยละ 17, 25, 18 และ 32 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารซิมวาสเตดินมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-myc ร้อยละ 32, 17, 20 และ 22 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ได้มีการรายงานผลของสารซิมวาสเตดินในการเร่งเซลล์สร้างกระดูกในการเข้าสู่ระยะการสร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีนบีเอ็มพี-2 (BMP : bone morphogenetic protein)^{4,37} ซึ่งเป็นสาร growth factor ที่แยกได้จากกระดูก และสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกเมื่อฝังได้เนื้อเยื่อเส้นใยของหนู กระตุ้นการสร้าง alkaline phosphatase enzyme, vascular endothelial growth factor และ osteocalcin³⁸⁻³⁹ เมื่อรวมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ซึ่งแสดงว่าสารซิมวาสเตดินยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารซิมวาสเตดินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับนิวเคลียสโปร

ที่ *c-fos* และ *c-myc* ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่แรงเซลล์สร้างกระดูกให้เข้าสู่ระยะการ
สร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์และการตกตะกอนสารอินทรีย์

จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้ทั้งหมด อาจสรุปได้ว่าสารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวน
เซลล์ และกลไกของสารซิมวาสเตตินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก อาจเกิดโดย
ผ่านทางสารเมวาโลเนตซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างโคเลสเตอรอล และ/หรือการยับยั้งการสร้าง
โปรตีน *c-myc* และ *c-fos* แต่อย่างไรก็ดีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อวัดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและโปรตีน
ของ *c-myc* และ *c-fos* ในเซลล์สร้างกระดูกที่ทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินร่วมกับสารเมวาโลเนต
ตลอดจนผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับโปรตีน Ras และ Rho อาจช่วยให้เราเข้าใจกลไกของสาร
ซิมวาสเตตินในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? J Clin Periodontol. 2002;29 Suppl 3:103-16.
2. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocr Rev. 1993;14:424-42.
3. Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. Osteoporos Int. 2003 Jun;14(4):273-82.
4. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science. 1999 ;286:1946-9.
5. Rejnmark L, Buus NH, Vestergaard P, Andreasen F, Larsen ML, Mosekilde L. Statins decrease bone turnover in postmenopausal women: a cross-sectional study. Eur J Clin Invest. 2002;32:581-9.
6. Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. Calcif Tissue Int. 2001;69:299-304.

7. Chan MH, Mak TW, Chiu RW, Chow CC, Chan IH, Lam CW. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4556-9.
8. Herrington DM, Potvin Klein K. Statins, hormones, and women: benefits and drawbacks for atherosclerosis and osteoporosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2001;3:35-42.
9. LaCroix AZ, Cauley JA, Pettinger M, Hsia J, Bauer DC, McGowan J, Chen Z, Lewis CE, McNeeley SG, Passaro MD, Jackson RD. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med.* 2003;139:97-104.
10. Sirola J, Sirola J, Honkanen R, Kroger H, Jurvelin JS, Maenpaa P, Saarikoski S. Relation of statin use and bone loss: a prospective population-based cohort study in early postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2002;13:537-41.
11. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Gungor T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res.* 2003;18:88-96.
12. Wada Y, Nakamura Y, Koshiyama H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Arch Intern Med.* 2000;160:2865.
13. Nuckolls GH, Kane A, Shum L, Slavkin HC. Lovastatin promotes cartilage growth but inhibits endochondral ossification of the cranial base in organ culture. *J Bone Miner Res.* 2000; 15:S1; S426.

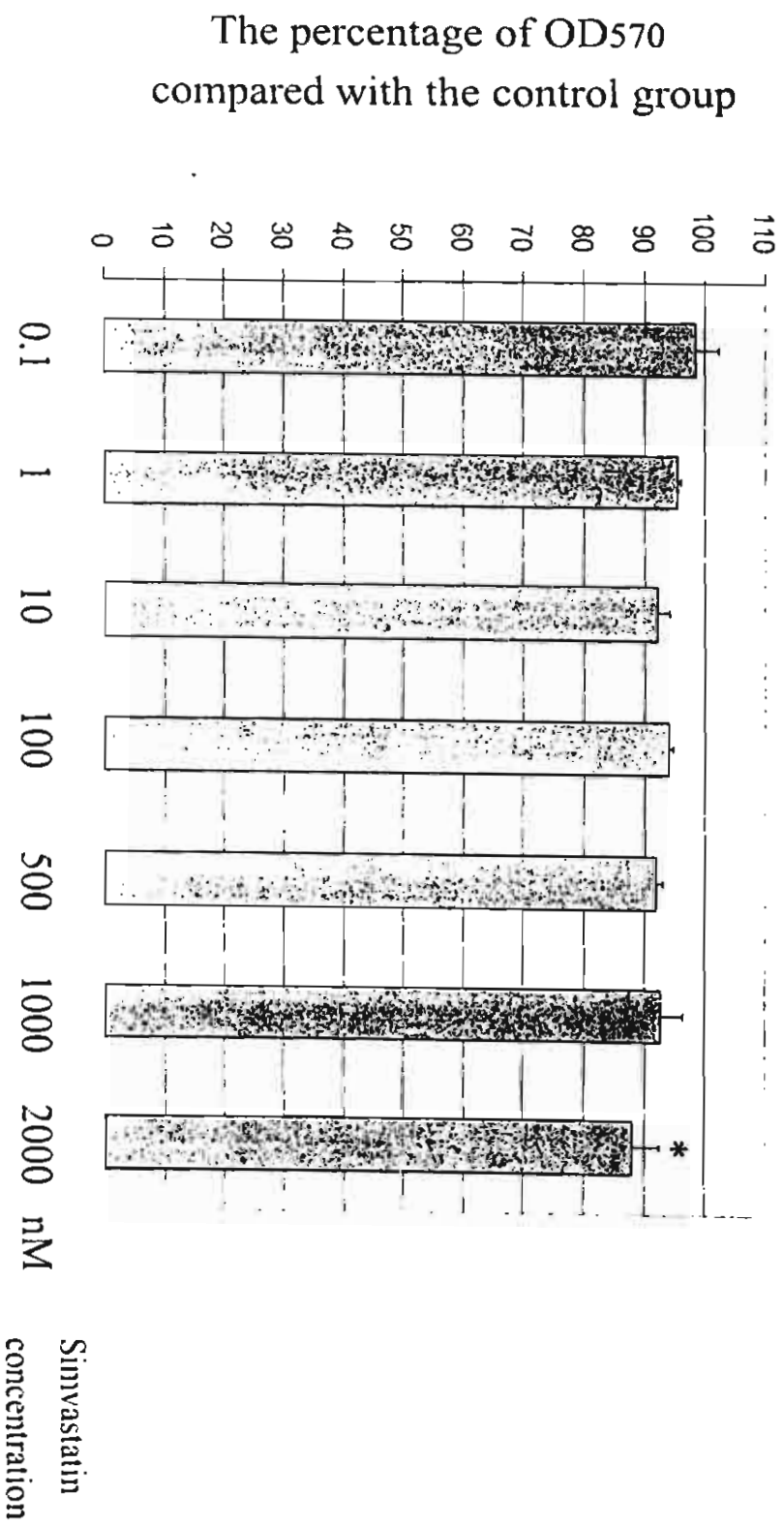
14. Uchida M, Shima M., Shimoaka T., Fujieda A., Obara K., et al. Regulation of Matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2000, 185: 207-214.
15. Wong G.L. and Cohn D.V. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surface. 1975, *PNAS*. 72: 3167-71.
16. Aronow M.A., Gerstenfeld L.C., Owen T.A., Tassinari M.S., Stein G.S. and Lian J.B. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. 1990, *Journal of Cellular Physiology* 143: 213-21.
17. Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, Cocchini B, Zini N, Fini M, Grassi F, Piacentini A, Facchini A. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure. *Connect Tissue Res*. 2001;42:49-58.
18. Freshney RI. Culture of animal cells : A manual of basic technique. 3rd edition. New York: Wiley-Liss, Inc.; 1994.
19. Abraham L.A. and Mackie EJ. Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999, 14:1320-29.

20. Dell'Era P., Mohammadi M., Presta M. Different tyrosine autophosphorylation requirement in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Molecular Biology of the Cell*. 1999, 10: 23-33.
21. Mohi M.G., Arai K., Watanabe S. Activation and functional analysis of Janus kinase2 in BAF3 cells using the coumermycin/gyrase B system. *Molecular Biology of the Cell*. 1998, 9: 3299-308.
22. Fenton JW 2nd, Jeske WP, Catalfamo JL, Brezniak DV, Moon DG, Shen GX. Statin drugs and dietary isoprenoids downregulate protein prenylation in signal transduction and are antithrombotic and prothrombolytic agents. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67:85-91.
23. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343 (6257):425-30.
24. Scita, Giorgio, Tenca, Pierluigi, Frittoli, Emanuela, Tocchetti, Arianna, Innocenti, Metello, Giardina, Giuseppina, Di Fiore, Pier Paolo. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J*. 2000;19: 2393-2398.
25. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988;48:589-601.
26. Fakan S. High-resolution autoradiography as a tool for the localization of nucleic acid synthesis and distribution in the mammalian cell nucleus. *J Microsc*. 1976;106:159-71.

27. Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickinson T, Thompson MM, London NJ. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J Vasc Surg.* 2002;36:150-7.
28. Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS. Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8301-5.
29. Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol.* 1998;8:202-6.
30. Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L. Making decisions through Myc. *FEBS Lett.* 2001;490:153-62.
31. Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001;20:2401-12.
32. Henriksson M, Luscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* 1996;68:109-82.
33. Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:7804-8.
34. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature.* 1996 ;382:511-7.
35. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999;13:3037-51.

36. McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology*. 1996;137:4398-408.
37. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271:688-92.
38. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003 Feb;144(2):681-92.
39. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 ;280:874-7.

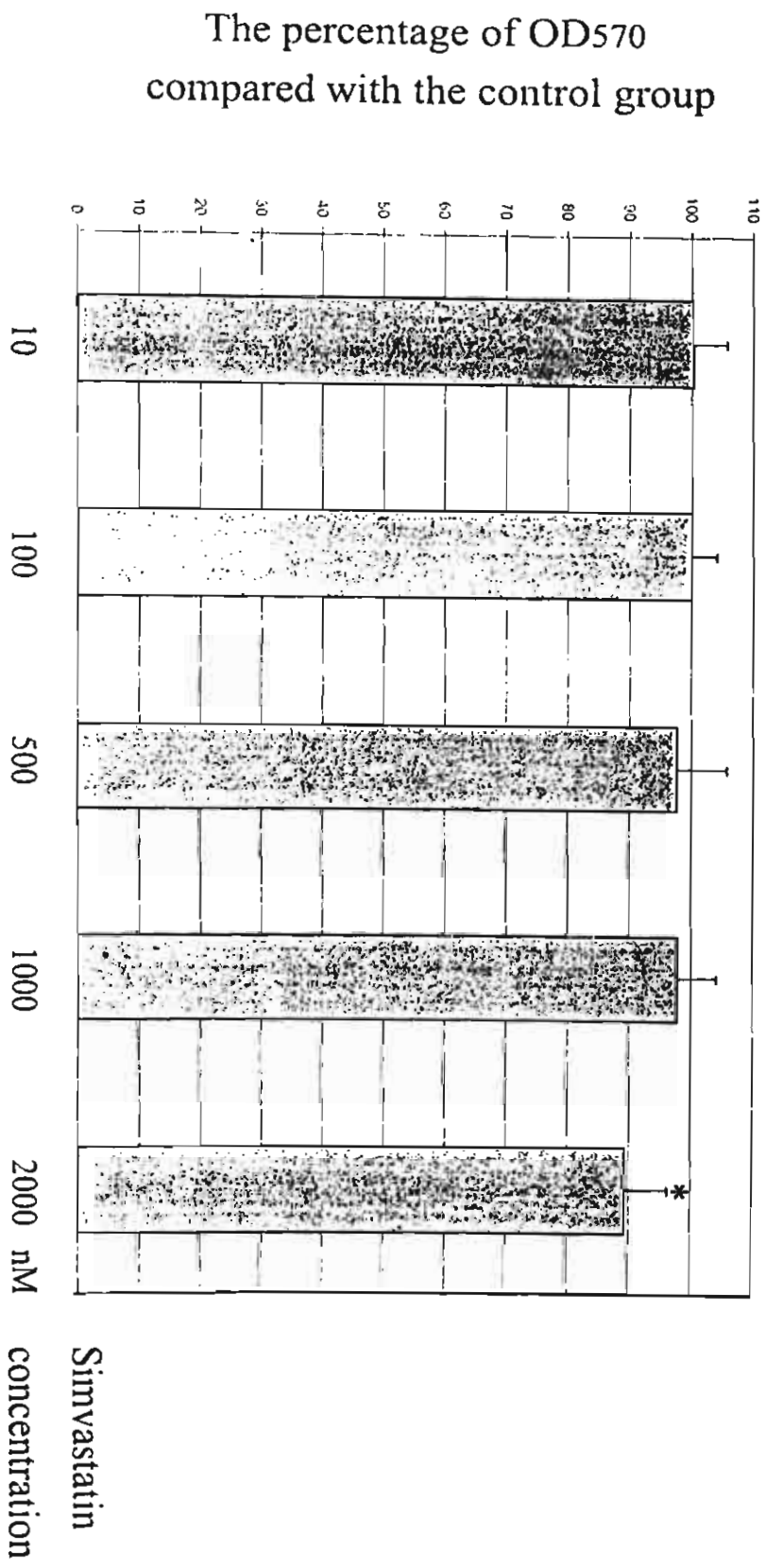
Effect of simvastatin on the toxicity of rat calvaria cells via MTT assay



รูปที่ 1 ผลของสารซิมวาสแตตินต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแร่งเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอมที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $\alpha = 0.01$ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=18)

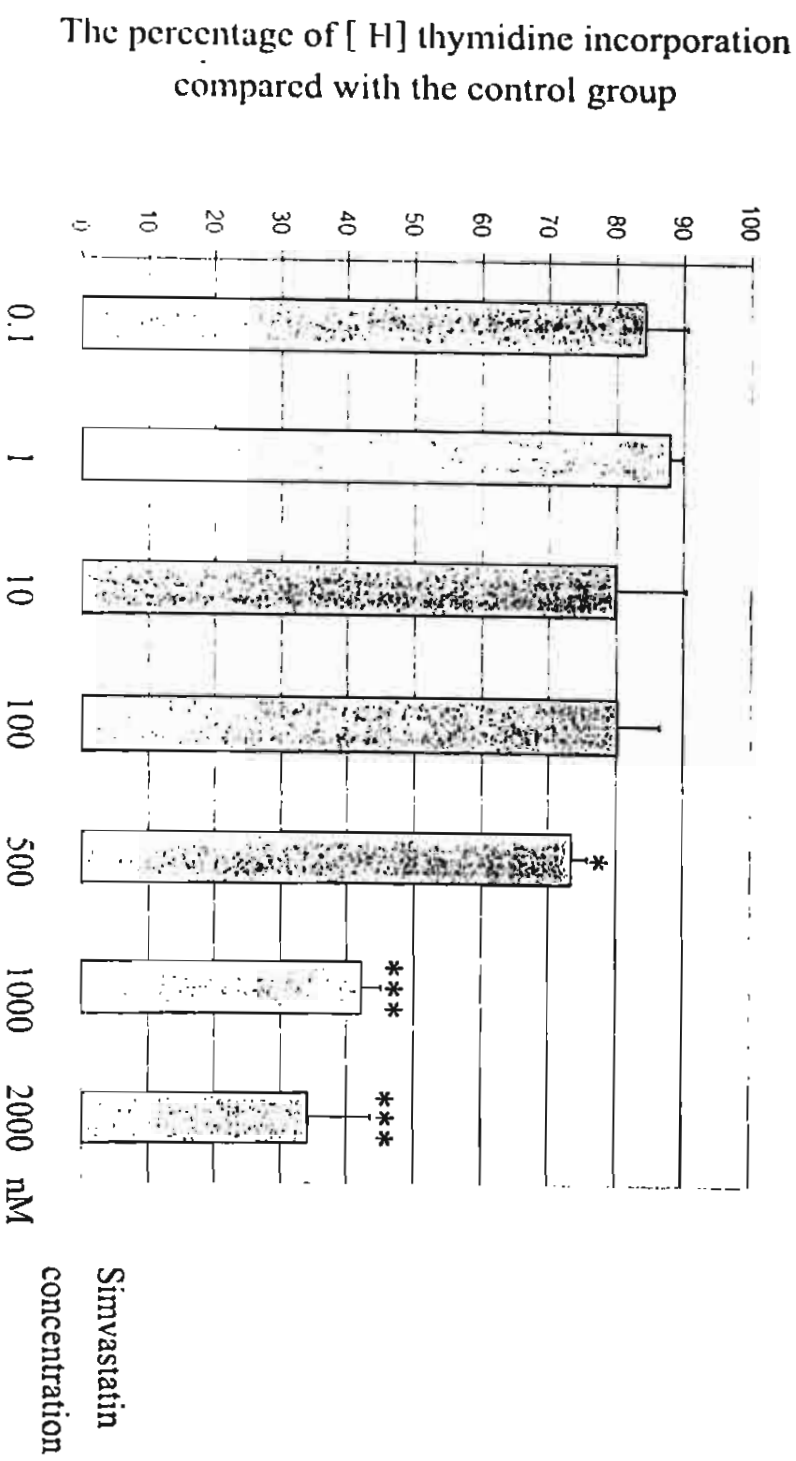
Effect of simvastatin on the toxicity of rat bone marrow stromal cells

via MTT assay



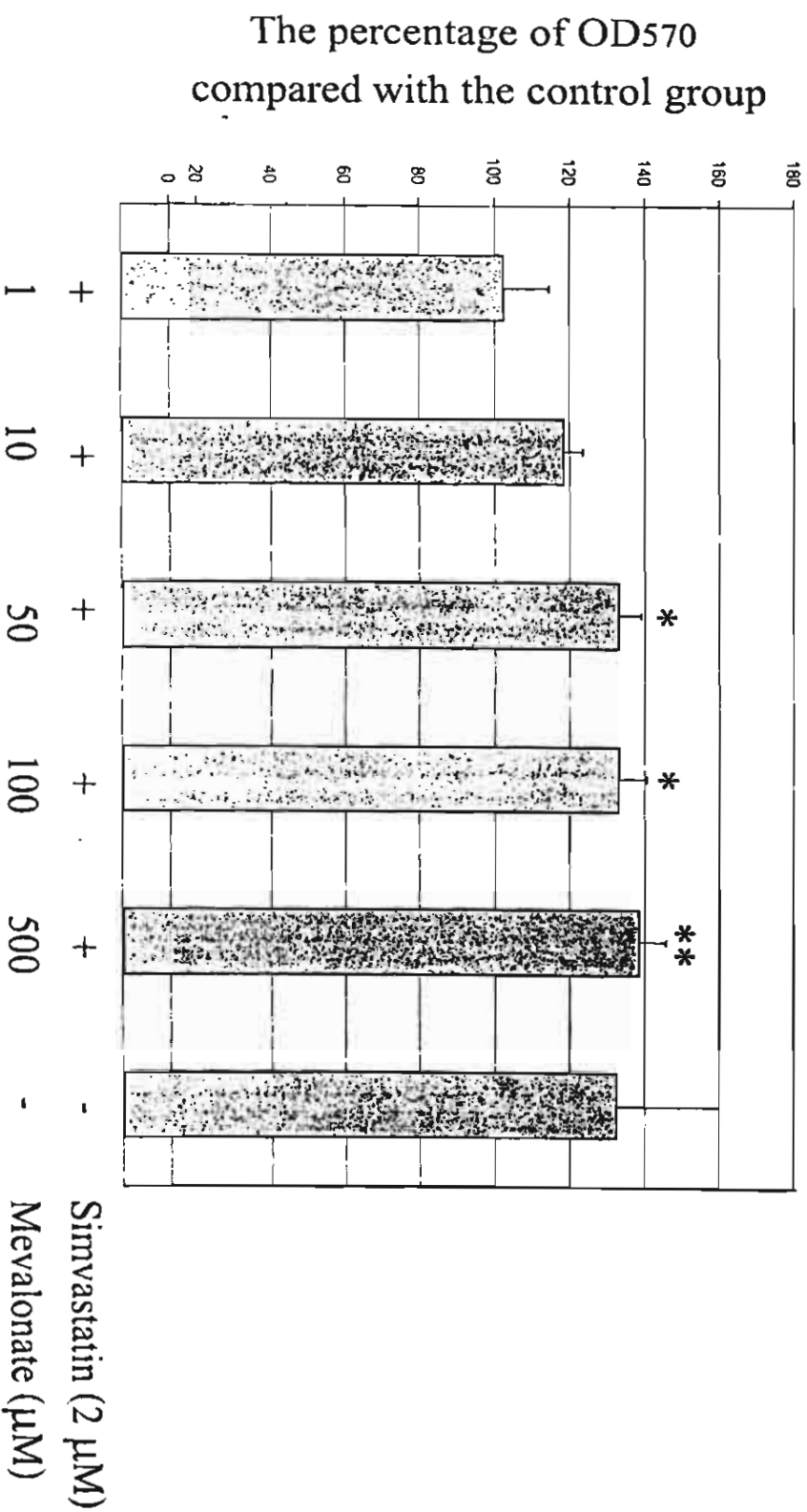
รูปที่ 2 ผลของสารซิมวาสแตตินต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $\alpha = 0.01$ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=12)

Effect of simvastatin on the proliferation of rat calvaria cells via the [^3H] thymidine incorporation assay



รูปที่ 3. ผลของสารชีวโมเลกุลแซลลิซิลิกแอซิดที่สกัดจากกะหล่ำปลีบนการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกงูของกะโหลกศีรษะของหนูแร่งเกิด เมื่อวิเคราะห์ [^3H] thymidine incorporation assay เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารชีวโมเลกุลตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * และ *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $\alpha = 0.01$ และ 0.001 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=18)

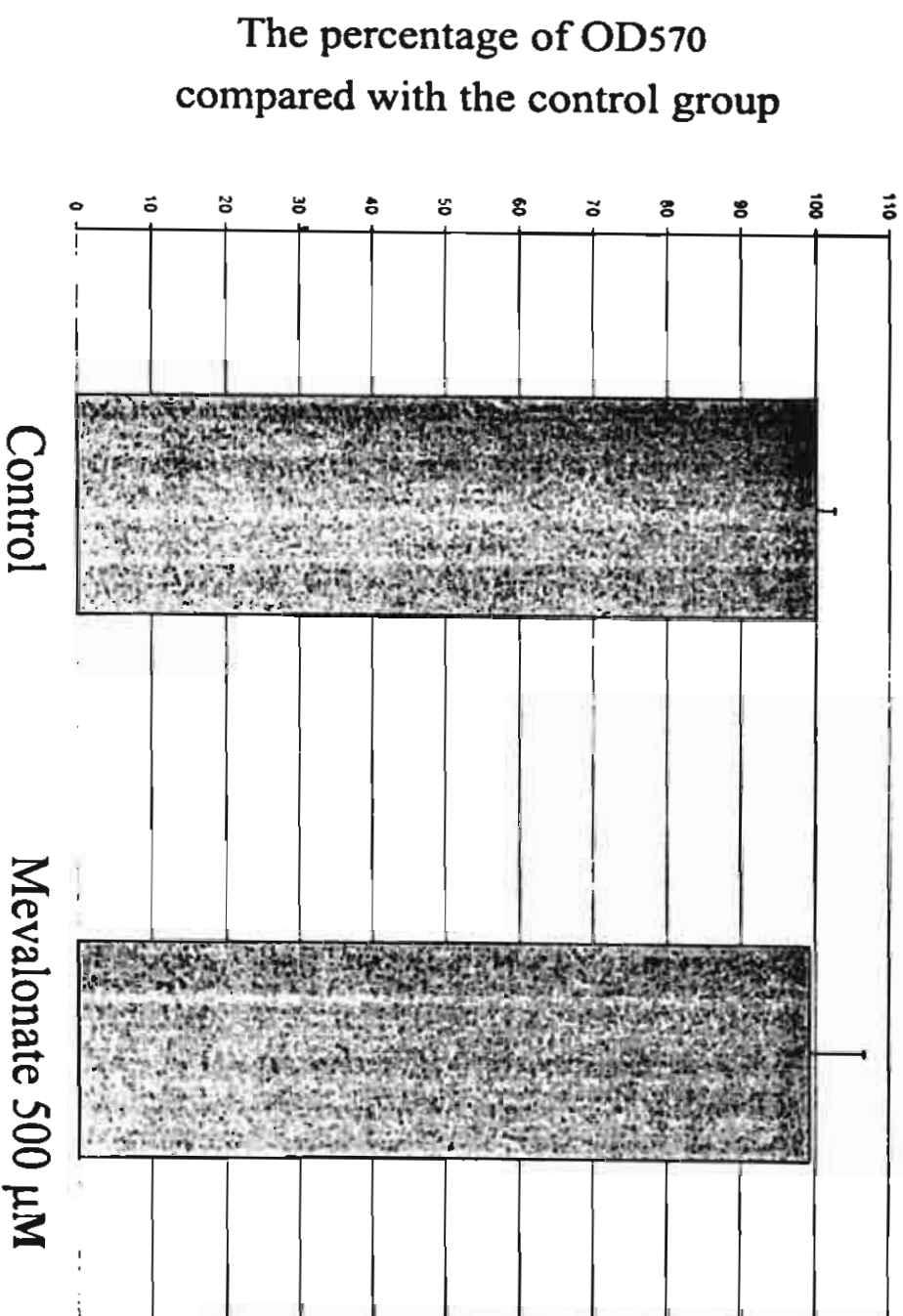
The toxicity of simvastatin in primary bone marrow stromal cells was rebound by mevalonate



รูปที่ 4 ผลของสารซิมวาสแตตินและสารเมวาลอนต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตติน 2 ไมโครโมลาร์ และสารเมวาลอนตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

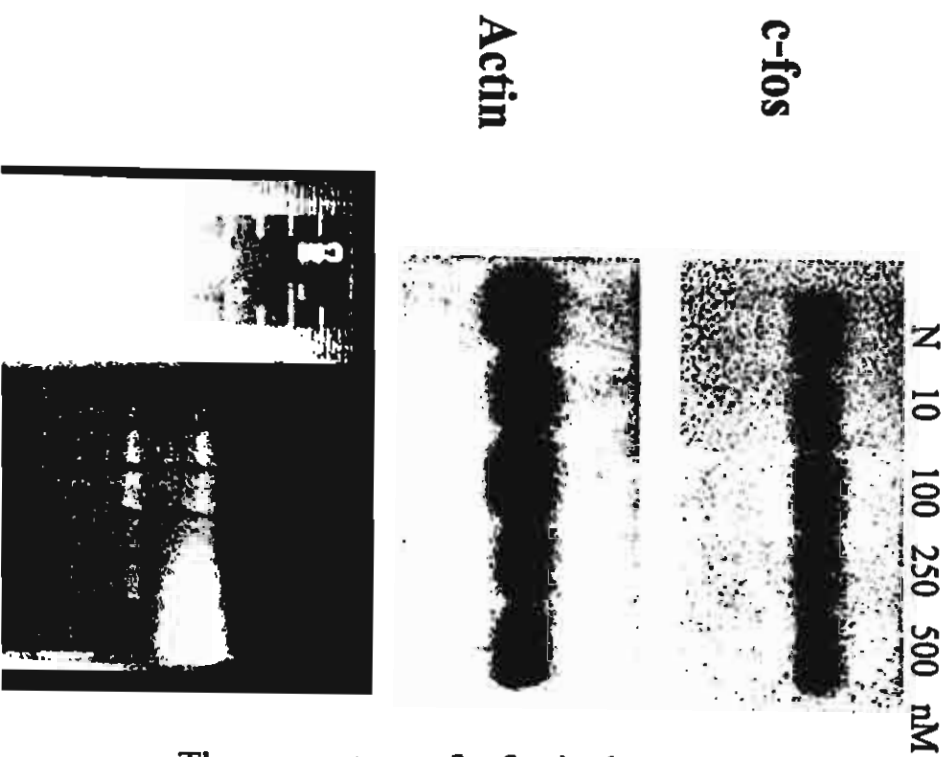
* และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินอย่างเดียว $\alpha = 0.01$ และ 0.005 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=12$)

Mevalonate does not affect the primary bone marrow stromal cells proliferation

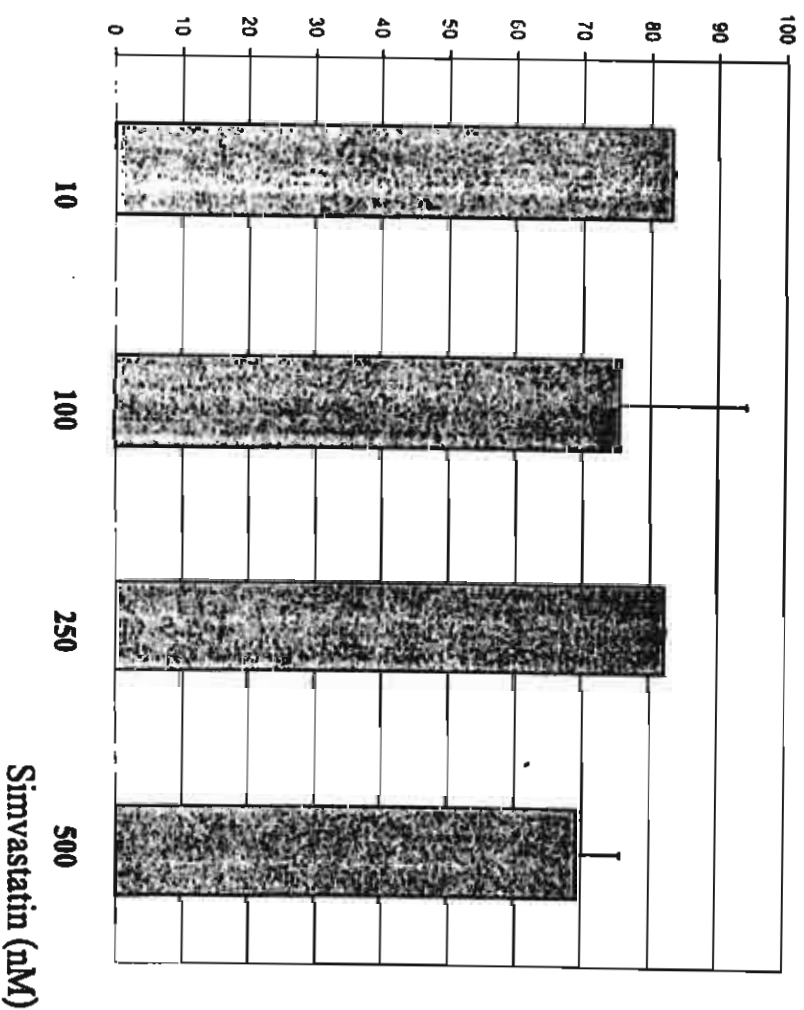


รูปที่ 5 ผลของสารเมวาโลเนตต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารเมวาโลเนตที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

Effect of simvastatin on the steady state of c-fos mRNA of primary calvaria

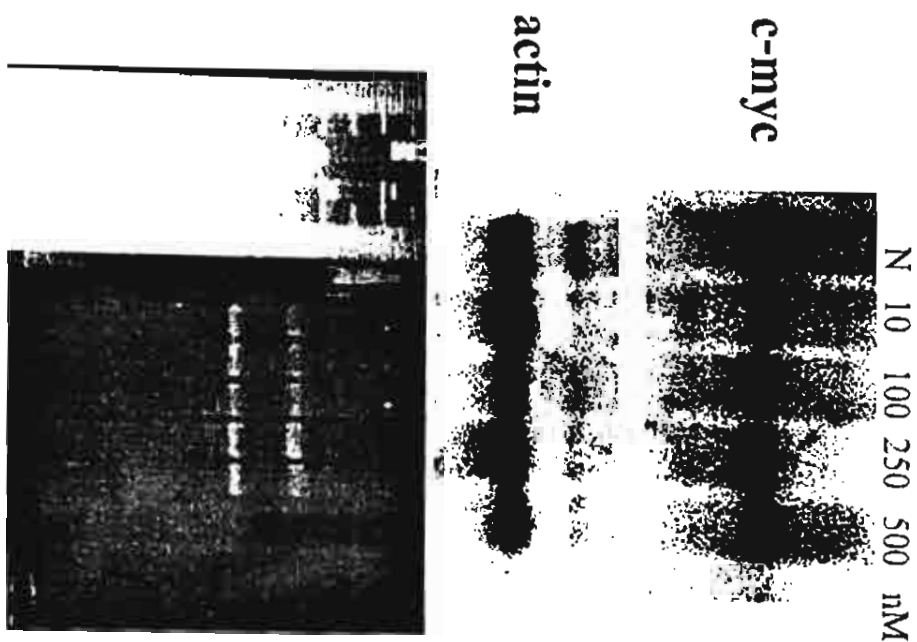


The percentage of c-fos in the experimental group compared with the control group

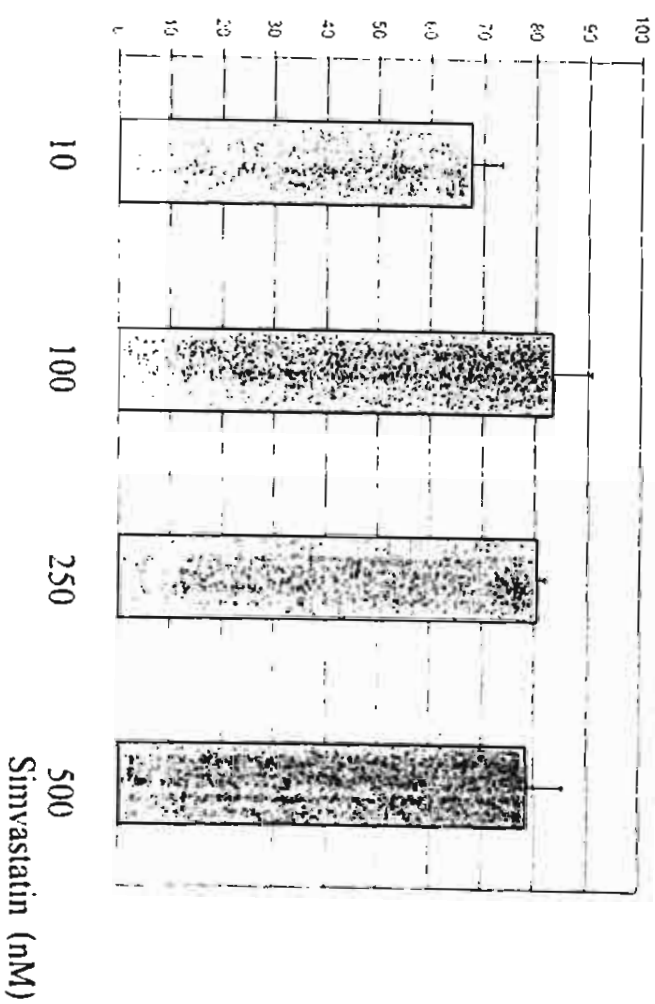


รูปที่ 6. ผลของสารซิมวาสแตตินต่อระดับอาร์เอ็นเอของยีน c-fos ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละของระดับอาร์เอ็นเอของยีน c-fos ในกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Effect of simvastatin on the steady state of c-myc mRNA of primary calvaria



The percentage of c-myc in the experimental group compared with the control group



รูปที่ 7. ผลของสารชีววาสดัตินต่อระดับอาร์เอ็นเอของยีน c-myc ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารชีววาสดัตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละของระดับอาร์เอ็นเอของยีน c-myc ในกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. กระผมได้ส่งบทคัดย่อ เพื่อนำเสนอผลงานที่ได้จากการศึกษา ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสาขาทันตแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่ เดือนตุลาคม 2546
2. กระผมได้นำข้อมูลที่ได้ มาเพิ่มเติมในการสอนวิชา Advances Oral Biology ซึ่งเป็นนิหาระดับปริญญาโท-เอก ในหัวข้อเรื่อง " Statin : Present and Future application