

## บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ** RMU4980040

**ชื่อโครงการ** การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อไตต่อการเกาะจับของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลตที่เป็นกลไกสำคัญในการเกิดโรคนี้ในไตโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์

**ชื่อนักวิจัย** นพ. วิษณุ ทองบุญเกิด  
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

**E-mail address** vthongbo@yahoo.com

**ระยะเวลาโครงการ** 3 ปี (1 กรกฎาคม พ.ศ. 2549 ถึง 30 มิถุนายน พ.ศ. 2552)

**เนื้อหางานวิจัย**

โรคนี้ในไตยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบบ่อยทั่วโลก โดยองค์ประกอบของก้อนนิ่วส่วนใหญ่คือผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลต และการเกาะจับของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลตบนเซลล์ต่อไตเป็นเหตุสำคัญทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์จนพัฒนาเป็นก้อนนิ่วในที่สุด อย่างไรก็ตามกลไกระดับโมเลกุลของการตอบสนองดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อไตต่อการเกาะจับของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลตชนิดโมโนไฮเดรต (COM) และผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลตชนิดไดไฮเดรต (COD) โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ชนิดเจล ทำการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ต่อไตชนิด MDCK ในภาวะที่มีผลึก COM หรือ COD (100 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของสารอาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีผลึกดังกล่าว การวัดจำนวนเซลล์ตายโดยวิธี annexin V/propidium iodide double staining แสดงผลร้อยละของเซลล์ตายพอๆกันในทุกตัวอย่าง จากนั้นจึงทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ แยกโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสองระนาบ และดูด้วยสียสำหรับย้อมโปรตีนทั้งหมด phosphoproteins หรือ glycoproteins (จำนวน 5 แผ่นเจลต่อกลุ่มตัวอย่าง) การวิเคราะห์เชิงปริมาณและสถิติแสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับของโปรตีนทั้งหมด 20 ชนิด phosphoproteins 20 ชนิด และ glycoproteins 5 ชนิดจากการเหนี่ยวนำโดยผลึก COM และพบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับของโปรตีนทั้งหมด 11 ชนิด phosphoproteins 11 ชนิด และ glycoproteins 18 ชนิดจากการเหนี่ยวนำโดยผลึก COD จากนั้นจึงวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงดังกล่าวโดยเทคนิคแมสสเปคโตรเมตรี โดยโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกี่ยวข้องกับ transcription, translation, signal transduction, cellular metabolism, nuclear membrane structure, cellular transport, cellular structure, stress response, biosynthesis, enzyme activation และ growth regulation ข้อมูลที่ได้เหล่านี้จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงการตอบสนองของเซลล์ต่อไตส่วนปลายต่อการเกาะจับของผลึกแคลเซียมอ็อกซาเลตที่ดียิ่งขึ้น

## คำหลัก

แคลเซียมอ็อกซาเลต; การเกาะจับของผลึก; โรคนี้ในไต; โปรตีโอม; โปรตีโอมิกส์

## ABSTRACT

**Project code** RMU4980040

**Project title** Proteomic analysis of responses in renal tubular cells to calcium oxalate crystal adhesion: Implications for stone formation

**Investigator** Visith Thongboonkerd, MD  
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

**E-mail address** vthongbo@yahoo.com

**Project period** 3 years (1 July 2006 – 30 June 2009)

### Research contents

Kidney stone disease remains a common public health problem worldwide. Major composition of kidney stones is calcium oxalate (CaOx) crystals. Adhesion of CaOx crystals to renal tubular cells is an important event that triggers a cascade of responses, leading to the development of kidney stones. However, molecular mechanisms of these cellular responses remain largely unknown. We therefore performed gel-based, differential proteomics study to examine cellular responses (as determined by altered protein expression) in renal tubular cells induced by CaOx monohydrate (COM) and CaOx dihydrate (COD) crystal adhesion. Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were cultivated in culture medium with or without COM or COD crystals (100 µg crystals per 1 mL culture medium) for 48 h. Cell death assay using annexin V/propidium iodide double staining showed that all these samples had comparable % cell death. Cellular proteins were then extracted, resolved with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE), and visualized using dyes that could stain total proteins, phosphoproteins, or glycoproteins (n = 5 gels per group). Quantitative intensity analysis and statistics revealed significantly altered levels of 20 proteins, 20 phosphoproteins, and 5 glycoproteins induced by COM crystal adhesion, and 11 proteins, 11 phosphoproteins, and 18 glycoproteins induced by COD crystal adhesion. These altered proteins were then identified by mass spectrometry, including those involved in transcription, translation, signal transduction, cellular metabolism, nuclear membrane structure, cellular transport, cellular structure, stress response, biosynthesis, enzyme activation and growth regulation. These data may lead to better understanding of cellular responses in distal renal tubular cells upon CaOx crystal adhesion.

### Keywords

Calcium oxalate; Crystal adhesion; Kidney stone disease; Proteome; Proteomics