

Abstract

Project Code: RSA4580037

Project Title: Effect of metabolic acidosis on osteoblast differentiation

Investigator: Sinee Disthabanchong, M.D.¹

Division of Nephrology, Department of Medicine, Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

E-mail Address: tesdb@mahidol.ac.th

Project Period: Aug 2002 – Jul 2005

Distal renal tubular acidosis (dRTA) is characterized by impairment of distal tubular acid secretion resulting in persistent metabolic acidosis. Recent examination of bone histology of dRTA patients showed markedly decreased bone formation with impaired bone matrix mineralization that is not entirely explained by an alteration in the mineral balance. Data from in vitro studies suggests a direct inhibitory effect of metabolic acidosis on osteoblast function. We investigated the effects of chronic metabolic acidosis on osteoblast differentiation from mesenchymal precursor cells (MSCs). Human MSCs were isolated from bone marrow aspiration specimen. Osteoblast differentiation was induced in the presence of dexamethasone in culture. Concentrated HCl was added to lower the medium pH. The expression of various osteoblastic genes was determined by quantitative real-time RT-PCR. Our isolated MSCs displayed characteristic spindle-shaped morphology. Flow cytometry revealed characteristic MSC surface marker profile. The mRNA expression of early osteoblast transcription factor, *cbfa-1*, and the major bone matrix protein, type I collagen, reached its peak at day 5-10 in control culture. Chronic metabolic acidosis was found to enhance the expression of *cbfa-1* and type I collagen in a dose dependent manner. In contrast, the mRNA expression of osterix (a transcription factor downstream of *cbfa-1*) and alkaline phosphatase (an enzyme normally upregulated in intermediately mature osteoblasts) as well as alkaline phosphatase enzyme activity was decreased. The study on the expression of mature osteoblast marker, osteocalcin is currently ongoing. Impaired bone matrix mineralization was demonstrated by a reduction in both calcium deposition and number of bone nodules visualized by von Kossa staining. In conclusion, chronic metabolic acidosis enhanced early osteoblast differentiation while attenuating bone matrix mineralization.

Keywords: acidosis, osteoblast, mesenchymal, renal tubular acidosis

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA4580037

ชื่อโครงการ: ผลกระทบของภาวะความเป็นกรดกับการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก

ชื่อนักวิจัย: พ.ญ. สินี ดิษฐบรรจง

หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์รพ.รามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address: tesdb@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: สิงหาคม 2545 – กรกฎาคม 2548

ภาวะความเป็นกรดในเลือดเกิดจากการที่ไตขับกรดออกจากร่างกายไม่ได้ ผู้ป่วยที่มีภาวะนี้มักมีความผิดปกติของระดับแคลเซียม ฟอสเฟต วิตามินดี และ ฮอร์โมนพาราไธรอยด์ในเลือด ส่งผลให้มีการลดลงของการสร้างกระดูกทำให้มีมวลกระดูกลดลง การศึกษาในห้องทดลองยังพบว่าภาวะความเป็นกรดสามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์กระดูกได้โดยตรง เนื่องจากเซลล์กระดูกเจริญเติบโตมาจาก mesenchymal stem cells (MSCs) คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลกระทบของภาวะความเป็นกรดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก โดยใช้ MSCs นี้ได้มาจากไขกระดูกของคนปกติ นำมาเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง (cell culture) แล้วกระตุ้นให้เซลล์เหล่านี้เจริญเติบโตไปเป็นเซลล์กระดูกโดยการผสม dexamethasone, β -glycerophosphate และ L-ascorbate phosphate เข้าไปในสารเลี้ยงเซลล์ และอาศัยการเติมกรด hydrochloric ปริมาณเล็กน้อย เพื่อให้ได้ระดับ pH ประมาณ 7.1-7.4 จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA โดยใช้วิธี quantitative real-time RT-PCR และ โปรตีนที่สกัดจาก MSCs เป็นระยะๆ โดยเริ่มตั้งแต่ระยะแรกที่เริ่มกระตุ้นด้วย dexamethasone จนกระทั่งระยะหลังที่เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษา mineralization ของเซลล์กระดูกโดยใช้วิธีการย้อมแบบ Von Kossa ผลการทดลองพบว่า MSCs ที่เพาะเลี้ยงได้มีรูปร่างเรียวยาว (spindle shape) และจากการทำ flow cytometry สามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ที่ได้เป็น MSCs จริง ภาวะความเป็นกรดมีผลกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ cbfa-1 (ซึ่งเป็น transcription factor ที่จำเพาะและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ osteoblast) และ type I collagen mRNA (90% ของ bone matrix protein ที่สร้างจาก osteoblast) ใน young osteoblasts เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน pH 7.4 ในขณะที่ osterix (downstream transcription factor ของ cbfa-1) และ alkaline phosphatase ซึ่งปรากฏในเซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตในระดับกลาง มีปริมาณลดลง ขณะนี้คณะผู้วิจัยกำลังทำการศึกษาปริมาณของ osteocalcin mRNA ซึ่งพบในเซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่อยู่ เมื่อย้อมเซลล์กระดูกเหล่านี้ด้วยวิธี Von Kossa พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เป็นกรดมีปริมาณ bone matrix mineralization ลดลง สรุปได้ว่าภาวะความเป็นกรดสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกในระยะเริ่มต้น แต่ยับยั้งการเกิด bone matrix mineralization

คำหลัก: acidosis, osteoblast, mesenchymal, renal tubular acidosis