



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการชีรินโปรตีนเอสและสารยับยั้งในกระดูกอ่อนของข้อ

โดยพญ. กัลยกร เขาวีศิษฐ์ และคณะ

สิงหาคม 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการซีรีนโปรตีเอสและสารยับยั้งในกระดูกอ่อนของข้อ

Serine protease and its inhibitor in articular cartilage

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. พญ. กัลยากร เชาวีวิชิต	ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. นส. นิมากร นุญอาพัทธ์เจริญ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางมด)
3. นพ. ภาณุวัฒน์ ชุตินวงศ์	ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. นายปรีชา เรืองเวชวรชัย	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ผศ. นพ. วัชร วิไลรัตน์	ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. รศ. พญ. วรณัฐ ธนากิจ	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. รศ. นพ. อิศรางค์ นุชประยูร	ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สัญญาเลขที่ TRG 4680026

ซีรีนโปรตีเอสและสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอสมีหลายชนิดในกระดูกอ่อนของข้อและไม่มีหน้าที่ในการทำลายกระดูกอ่อนโดยตรง เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในกระดูกอ่อนของข้อคือแฟคเตอร์ XIII (ซึ่งใช้ในการแข็งตัวของเลือด) อาจมีหน้าที่สลายเมทริกซ์เข้าด้วยกันโดยการสร้างพันธะไดเปปไทด์ และถูกปลุกฤทธิ์โดยทรอมบิน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแฟคเตอร์ VII ซึ่งเป็นซีรีนโปรตีเอสที่สามารถกระตุ้นทรอมบินและเปรียบเทียบปริมาณแทรปปิน-2 ซึ่งเป็นสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอสและเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในสภาพปกติและโรคข้อเสื่อม

วิธีการวิจัย กระดูกอ่อนได้มาจากข้อเข่าจากการผ่าตัดเปลี่ยนข้อและผู้ที่เสียชีวิตจากโรคอื่นนอกเหนือจากโรคข้อ อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียใช้ในการหาแฟคเตอร์ VII อิไลซ่าใช้ในการวัดปริมาณของแทรปปิน-2

ผลการวิจัย แฟคเตอร์ VII มีอยู่ในกระดูกอ่อนที่ปกติและที่เป็นโรคโดยพบอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เท่านั้นและพบในทุกโซนของกระดูกอ่อน ปริมาณของแทรปปิน-2 ในกระดูกอ่อนที่เป็นโรคมียากกว่าในกระดูกอ่อนที่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$) คือ 22.99 ± 1.28 และ 14.97 ± 1.92 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเปียกของกระดูกอ่อน

ข้อสรุป แฟคเตอร์ VII และแทรปปิน-2 อาจช่วยในการซ่อมเมทริกซ์ของโรคข้อเสื่อม แฟคเตอร์ VII เป็นซีรีนโปรตีเอสมีอยู่ในกระดูกอ่อนของข้อ อาจเป็นสารปลุกฤทธิ์ทรอมบินที่สำคัญ แทรปปิน-2 ซึ่งเป็นสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอสถูกจับอยู่ในกระดูกอ่อนที่เป็นโรคมียากกว่าที่ปกติโดยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสซึ่งถูกปลุกฤทธิ์โดยทรอมบิน

The existence of serine proteases and their inhibitors is known to be unassociated with direct damage of articular cartilage. Coagulation factor XIII, a transglutaminase present in articular cartilage, may aid in the repair of extracellular matrix by forming isodipeptide bonds. The enzyme is activated by thrombin. The aims of this study were to identify coagulation factor VII capable of thrombin activation and compare the amount of trappin-2, a serine protease inhibitor and a transglutaminase substrate, in normal and diseased cartilages.

Methods Articular cartilages were obtained from knees from total knee replacement surgery and from cadavers without arthritic conditions. Immunohistochemistry was performed to detect factor VII. ELISA was performed to measure trappin-2 levels.

Results Factor VII was detected in both normal and diseased cartilages. Only intracytoplasmic staining was found in all zones of cartilages. No difference in the staining pattern between normal and diseased cartilages was identified. Trappin-2 was present in osteoarthritic cartilages at higher amount than in normal cartilages (22.99 ± 1.28 and 14.97 ± 1.92 ng/mg of wet weight cartilage, respectively).

In conclusion We demonstrate factor VII, a serine protease, is present in articular cartilage. In the presence of thrombin capable of activating the transglutaminase, factor VII may have a role in activating thrombin. Trappin-2, a serine protease inhibitor, is integrated into osteoarthritic more than normal matrix in the presence of transglutaminase. This may aid in the repair of diseased matrix.

สรุปข้อเสนอโครงการ

โครงการ: ซีรีนโปรตีนเอสและสารยับยั้งในกระดุกอ่อนของข้อที่ปกติและที่เป็นโรคข้อเสื่อม

ผู้เสนอ	:	แพทย์หญิงกัลยากร เขาวชิษุ
หน่วยงาน	:	ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ระยะเวลาดำเนินการ	:	1 1/2 ปี (1 กรกฎาคม 2546 ถึง 31 ธันวาคม 2547)
ค่าใช้จ่ายโครงการ	:	228,151.36 บาท (สองแสนสองหมื่นแปดพันหนึ่งร้อยห้าสิบบาทสามสิบหกสตางค์)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ส่งผลให้เกิดความพิการในประชากรกลุ่มนี้ พยาธิสภาพที่สำคัญของโรคนี้คือกระดูกอ่อนที่ถูกทำลาย ซีรีนโปรตีนเอสและสารยับยั้งมีหลายชนิดในกระดูกอ่อนของข้อ แต่ไม่มีหน้าที่ในการทำลายข้อโดยตรง ทรานส์กลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ที่สານเมตริกซ์เข้าด้วยกันโดยการสร้างพันธะไคเปปไทด์และมีอยู่ในกระดูกอ่อนของข้อ และถูกกระตุ้นโดยทรอมบิน แฟคเตอร์ VII (coagulation factor VII) เป็นซีรีนโปรตีนเอสชนิดหนึ่งที่สามารถปลุกฤทธิ์ทรอมบินได้ แทรปปีน-2 (trappin-2) เป็นสารตั้งต้นของทรานส์กลูตามิเนสที่มีอยู่ในกระดูกอ่อนของข้อและเป็นสารยับยั้งซีรีนโปรตีนเอส ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับซีรีนโปรตีนเอสและสารยับยั้งนี้อาจมีความสำคัญในด้านการซ่อมแซมเมตริกซ์ของกระดูกอ่อนที่เสื่อม

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาว่าแฟคเตอร์ VII มีในกระดูกอ่อนของข้อหรือไม่
- 2.2 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของแทรปปีน-2 ในกระดูกอ่อนจากโรคข้อเสื่อมกับสภาวะปกติ

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 2.1 การหาแฟคเตอร์ VII ใช้วิธีอิมมูโนออสโตเคมีสตรี้

การวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 2.2 การวัดแทรปปีน-2 ใช้วิธีอิลลาซ่า

สัญญาเลขที่ TRG 4680026

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

แผนการดำเนินงาน	เดือน 1-6	เดือน 7-12	เดือน 12-18
เก็บตัวอย่าง สกัดโปรตีน	←→		
พัฒนาวิธีการ	←→		
เปรียบเทียบปริมาณ แทรปปิน-2		←→	
หาตำแหน่งของแฟลค เตอร์ VII		←→	
วิเคราะห์ผล			←→
เขียนรายงาน			←→

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่ตีพิมพ์ในการสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

5.1 Osteoarthritic cartilage contains increased levels of the serine protease inhibitor, trappin-2.

Osteoarthritis and Cartilage 2004;12 (suppl 8);S42.

5.2 The serine protease inhibitor, trappin-2, is present in cartilage and synovial fluid in degenerative arthritis. อยู่ในระหว่างรอการพิจารณาตีพิมพ์ที่ Arthritis and Rheumatism

5.3 ผลการวิจัยเกี่ยวกับแฟลคเตอร์ VII จะรอให้ได้ข้อมูลมากกว่านี้ก่อนส่งตีพิมพ์

โรคข้อเสื่อม (degenerative joint disease, osteoarthritis) เป็นโรคที่มีการทำลายของกระดูกอ่อนของข้อซึ่งเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ โรคข้อเสื่อมมักเกิดขึ้นในข้อที่รับน้ำหนักเช่น ข้อเข่า ข้อสะโพก ลักษณะทางพยาธิสภาพพบกระดูกอ่อนของข้อบางลงโดยมีการสูญเสียโปรตีโอไกลัยแคนและการทำลายคอลลาเจนจากผิวข้อก่อนตามด้วยการฉีกขาดในกระดูกอ่อนมากขึ้น เซลล์กระดูกอ่อน (articular chondrocytes) มีหน้าที่เปลี่ยนแปลงไปโดยมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น มีการสร้างซัยโตคายน์ที่ส่งผลทำลายมากขึ้น การสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ในระยะหลังของโรคมีการสร้างคอลลาเจนน้อยลง (1, 2)

การทำลายของเมทริกซ์นอกเซลล์เกิดจากเอนไซม์โปรตีเอสเป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้อยเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์กระดูกอ่อน โปรตีเอสมีหลายกลุ่ม แต่กลุ่มที่มีข้อมูลสนับสนุนการทำลายกระดูกอ่อนมากที่สุดคือกลุ่ม metalloproteinases (เมทัลโลโปรตีเอส) กลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ serine proteases (ซีรีนโปรตีเอส), cysteine proteases และ aspartate protease (2) ผลผลิตที่ได้จากการเสื่อม (degradation products) นี้อาจยังคงค้างอยู่ในกระดูกอ่อนเนื่องจากผลผลิตจับกับโครงสร้างอื่นในกระดูกอ่อนด้วยพันธะโควาเลนต์ หรืออาจแพร่อยู่ในกระดูกอ่อนหรือเข้าไปในน้ำไขข้อก็ได้ ทรานส์กลูตามินเนสเป็นเอนไซม์ที่ส่งเสริมการสร้างเมทริกซ์โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์และมีอยู่ในข้อคือปัจจัยการแข็งตัวของเลือดแฟคเตอร์ XIII (3, 4) ซึ่งถูกกระตุ้นโดยทროมบิน (5)

ซีรีนโปรตีเอสในกระดูกอ่อนประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ plasmin, tissue plasminogen activator (tPA), urokinase-type plasminogen activator, plasminogen (พลาสมิโนเจน), elastase (อีลาสเตส), cathepsin G, thrombin (ทროมบิน) และ kallikrein (2) ตัวปลูกฤทธิ์ของเอนไซม์เหล่านี้คือซีรีนโปรตีเอสเอง cathepsin B และแฟคเตอร์ XIIa และ XIII สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์กลุ่มนี้คือโปรเมทัลโลโปรตีเอส พลาสมิโนเจน คอลลาเจนชนิดที่ II, IX, X, XI, aggrecan, fibronectin เป็นต้น หน้าที่สำคัญของซีรีนโปรตีเอสคือการทำให้เมทัลโลโปรตีเอสออกฤทธิ์ได้ แต่ไม่มีอำนาจการทำลายมากเท่ากับกลุ่มเมทัลโลโปรตีเอส ถึงแม้ซีรีนโปรตีเอสจะไม่สามารถแยกโมเลกุลของเมทริกซ์ได้โดยตรง การยับยั้งซีรีนโปรตีเอสในการศึกษาหนึ่งได้แสดงว่าสามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของโปรตีโอไกลัยแคนออกมาจากกระดูกอ่อนได้ (6) ตัวอย่างของสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอสในกระดูกอ่อน ได้แก่ protease nexin-1, plasminogen activator inhibitor-1, alpha-1 proteinase inhibitor. ในระยะแรกของโรคข้อเสื่อมพบว่าซีรีนโปรตีเอสมีปริมาณมากขึ้นในกระดูกอ่อนโดยเฉพาะ plasminogen activator จะเห็นได้ว่าแฟคเตอร์ซึ่งเป็นปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดมีอยู่หลายชนิดในข้อ นอกจากนี้พบว่ามีการสร้างไฟบรินเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มข้อที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Weinberg 1991) สนับสนุนว่าการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นในข้อจริง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจว่าแฟคเตอร์ VII ซึ่งเป็นซีรีนโปรตีเอสอื่นที่เป็นตัวควบคุมขบวนการแข็งตัวของเลือดมีอยู่ในกระดูกอ่อนของข้อ และเพื่อสำรวจว่าทรอปิน-2 ซึ่งเป็นสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอสและเป็นสารตั้งต้นของทรานส์กลูตามินเนสมีปริมาณมากขึ้นในโรคข้อเสื่อม

ระเบียบวิธีการวิจัย

วัสดุ กระดูกอ่อนที่ปกติได้มาจากภาควิชาสัตวศาสตร์ กระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมได้มาจากผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ทางการแพทย์ให้ผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเพื่อรักษาโรคข้อเสื่อม โดยฉีกกระดูกอ่อนชนิด hyaline จากกระดูกสะบ้า ส่วนปลายของกระดูกฟีเมอร์และส่วนต้นของกระดูกทibia กระดูกอ่อนที่ใช้สำหรับการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีก่อนจนถึง subchondral bone และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 เซลเซียสจนนำมาใช้ การทดลองนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดโปรตีน โดยการใช้ TRIzol reagent ตามคำแนะนำในห่อบรรจุ โปรตีนที่ได้ถูกเก็บในสารละลายฟีนอล ผู้วิจัยได้พยายามสกัดโปรตีนโดยการใช้ guanidine hydrochloride อีกวิธีหนึ่งแต่พบว่าได้ปริมาณโปรตีนน้อยกว่าการใช้ TRIzol reagent

การวัดปริมาณโปรตีน ใช้วิธีของ Lowry (7)

การวัดปริมาณของแตรปปีน-2 โดยวิธีอีไลซ่า เพื่อเปรียบเทียบปริมาณในกระดูกอ่อนที่ปกติกับกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมโดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Hbt, The Netherlands) ซึ่งใช้หลักการแซนวิช สารละลายโปรตีนของกระดูกอ่อนถูกละลายในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 หรือใช้แบบไมเจอจาง โปรตีนมาตรฐานคือ human pre-ELAFIN/SKALP. สารที่ใช้ในการช่วยอ่านค่าความเข้มข้นคือ TMB

การทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ เริ่มด้วยการแช่กระดูกอ่อนที่ปกติและกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมในพาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 คืนแล้วอาบน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์แล้วทำบล็อกพาราฟินแล้วตัดลงบนสไลด์ การย้อมสีทำโดยการใช้ชุดสำเร็จรูป (Dako) แอนติบอดีที่ใช้คือ anti-factor VII antibody (Stago Diagnostics, ฝรั่งเศส) การประเมินค่าโดยการนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีจากจำนวนเซลล์ 100 เซลล์ในแต่ละตัวอย่าง

การคำนวณทางสถิติ

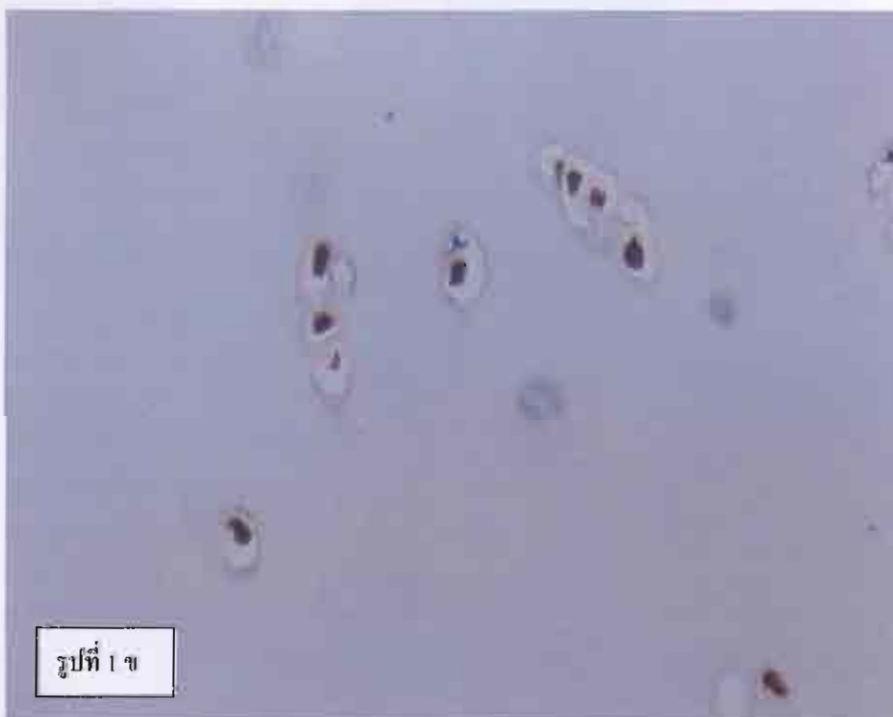
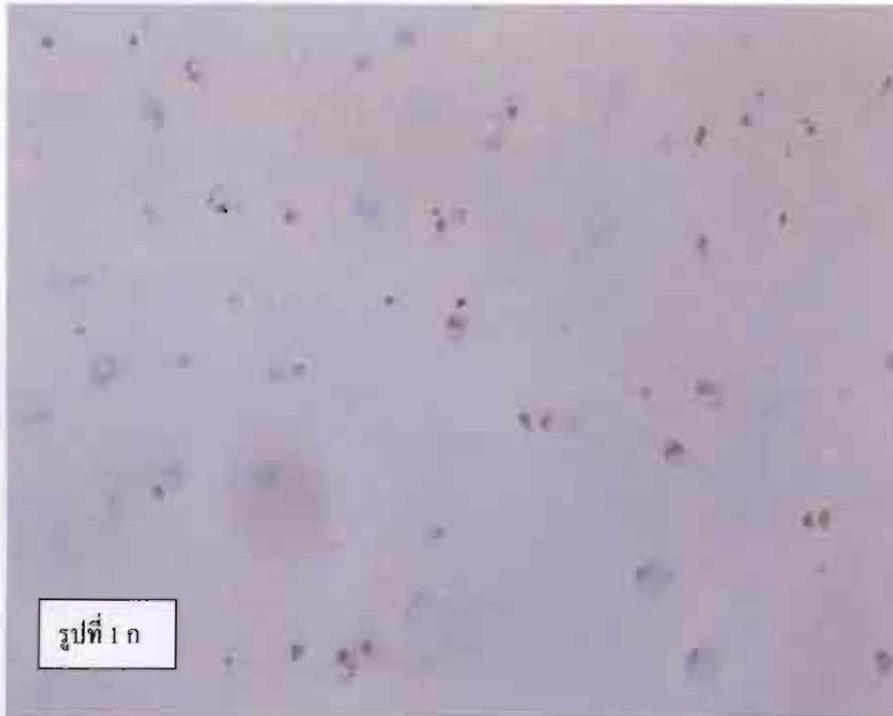
การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีระหว่างกลุ่มใช้ t-test การเปรียบเทียบปริมาณของแตรปปีน-สองระหว่างกลุ่มใช้ t-test (unequal variance) ค่า p-value ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

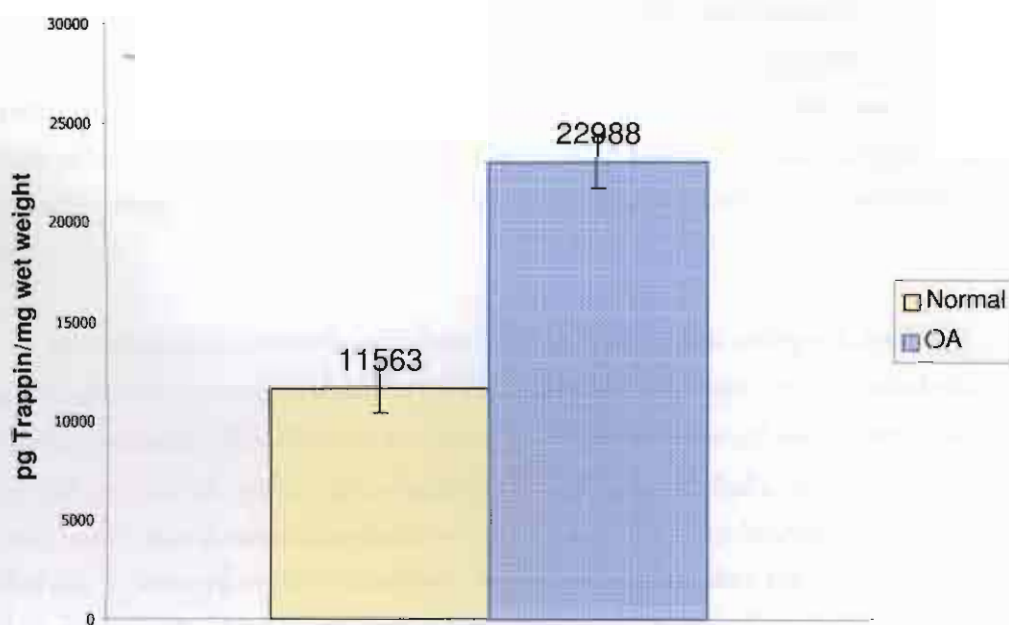
แฟคเตอร์ VII มีอยู่ในกระดูกอ่อนของข้อที่มีโรคข้อเสื่อมและกระดูกอ่อนที่ปกติ โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ แฟคเตอร์ VII พบอยู่ในทุกโซนของกระดูกอ่อน และอยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์กระดูกอ่อน ไม่พบการติดสีในบริเวณที่เป็นนิวเคลียส pericellular และ interterritorial area บริเวณที่ติดสีไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มปกติ (2 จำนวนตัวอย่าง) และกลุ่มที่เป็นโรค (30 จำนวนตัวอย่าง) (รูปที่ 1) การติดสีที่เกิดขึ้นที่บริเวณผิวข้อของกระดูกอ่อนเป็นสิ่งแปลกปลอม (artefact) จากการนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีพบว่าจำนวนเซลล์ที่ติดสีในกลุ่มกระดูกอ่อนที่ปกติคือ 1 และ 91 เปอร์เซ็นต์ในสองตัวอย่าง ในขณะที่ค่าเฉลี่ยในกลุ่มกระดูกอ่อนที่เป็นโรคคือ 22.56 ± 25.20 เปอร์เซ็นต์ (พิสัย 2-89) ความแตกต่างนี้ไม่นับว่าสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การติดสีจากอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ไม่สามารถนำมาใช้เปรียบเทียบปริมาณอย่างแม่นยำและถูกต้องได้

ปริมาณของแทรปปีน-2 ในกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมสูงกว่ากระดูกอ่อนปกติ โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ปริมาณของแทรปปีน-2 ในโรคข้อเสื่อมเท่ากับ 22.99 ± 1.28 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเปียกของกระดูกอ่อน (3 จำนวนตัวอย่าง อายุเฉลี่ย 27.5 ปี) ปริมาณในกระดูกอ่อนปกติเท่ากับ 14.97 ± 1.92 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม (23 จำนวนตัวอย่าง อายุเฉลี่ย 69.05 ปี) ความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติโดย p-value น้อยกว่า 0.01 (รูปที่ 2) การตรวจวัดแทรปปีน-2 โดยการใส่ชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ไม่สามารถวัดแทรปปีน-2 ในรูปแบบ 6 กิโลดาลตัน

รูปที่ 1 การติดสีของแฟคเตอร์ VII ในกระดูกอ่อนชนิด hyaline ของข้อเข่าโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียด้วย polyclonal antibody กระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อม (รูป ก) มีการติดสีทั่วไปในทุกโซนของกระดูกอ่อนเช่นเดียวกับในกระดูกอ่อนที่ปกติ ภาพขยายของการติดสีในกระดูกอ่อนที่ปกติแสดงให้เห็นการติดสีในไซโทพลาซึมเท่านั้นเช่นเดียวกับในกระดูกอ่อนที่เป็นโรค (รูป ข)



รูปที่ 2 ปริมาณของโปรตีนแทรปปิน-2 ในกระดูกอ่อนของข้อที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีมากกว่ากระดูกอ่อนของข้อที่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โปรตีนจากกระดูกอ่อนถูกสกัดโดยใช้ TRIzol reagent ใช้แบบไม่เจือจางหรือเจือจาง 1 ต่อ 2 การวัดปริมาณทำโดยวิธีอัสซาย



คำวิจารณ์

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าซีรีนโปรตีเอสมีอยู่ในกระดูกอ่อนของข้อ ชนิดที่พบใหม่ในการศึกษานี้คือ แฟคเตอร์ VII ซึ่งเป็นปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด และได้ค้นพบสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอสใหม่อีกชนิดหนึ่งคือ แทรปปีน-2 ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนแล้วว่าสามารถยับยั้งอีลาสเตสไดโนอวัยวะอื่น

แฟคเตอร์ VII ที่พบในกระดูกอ่อนของข้อที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีน้อยกว่าในกระดูกอ่อนที่ปกติโดยอาศัย จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีเป็นเกณฑ์ โดยในกระดูกอ่อนโรคข้อเสื่อมย้อมติดสีคิดเป็น 22.56 ± 25.20 เปอร์เซ็นต์ (ฟิลีย 2-89) ของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนทั้งหมด และในกระดูกอ่อนปกติย้อมติดสีคิดเป็น 1 และ 91 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนทั้งหมด การค้นพบแฟคเตอร์ VII ในกระดูกอ่อนอาจเกิดได้สองวิธี กล่าวคือ หนึ่ง สร้างมาจากเซลล์กระดูกอ่อน หรือ สอง แพร่มาจากกระดูกอ่อนจากน้ำไขข้อหรือ subchondral bone เรา คาดว่าปริมาณของแฟคเตอร์ VII น่าจะมีมากขึ้นในกระดูกอ่อนที่มีโรคข้อเสื่อม แต่ผลการวิจัยแสดงว่ามีน้อยลง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า หนึ่ง การนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีไม่ใช่วิธีการวัดปริมาณที่ดีที่สุด หรือสอง จำนวนตัวอย่างมี น้อย หรือสาม แฟคเตอร์ VII อาจไม่ได้อยู่ในข้อเพื่อทำหน้าที่เป็นโปรตีเอสที่ทำลายข้อโดยตรง แต่อาจมีหน้าที่ อย่างอื่น

ในเวลาที่เขียนนี้ ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับแฟคเตอร์ VII ในโรคข้อเสื่อม แต่ข้อมูลที่มีอยู่สนับสนุน ความคิดที่ว่าแฟคเตอร์ VII อาจออกฤทธิ์ผ่าน Tissue factor (ทิสซูปแฟคเตอร์) ในขบวนการหลายอย่างในข้อ เนื่องจากทิสซูปแฟคเตอร์เป็นตัวรับที่ผิวเซลล์ของแฟคเตอร์ VII ทิสซูปแฟคเตอร์มีความสำคัญต่อการทำ bone graft ช่วยให้ graft ติดเร็วขึ้น (8) ในการอักเสบในโรคข้อรูมาตอยด์ซึ่งมีไฟบรินเป็นตัวกระตุ้นการอักเสบนั้น มี อนุภาคที่มาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวคอยส่งเสริมการสร้างไฟบรินผ่านการสร้างทอมบินโดยต้องอาศัยแฟคเตอร์ VII เป็นสำคัญ (9) นอกจากนี้ การฉีดกลุ่มรวมที่เกิดจากทิสซูปแฟคเตอร์และแฟคเตอร์ VIIa ส่งผลให้เกิดการ อักเสบของข้อในหนู (10) และการให้แฟคเตอร์ VIIa ที่หมดฤทธิ์แล้วสามารถลดการอักเสบในข้อได้ (11)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณของแทรปปีน-2 ในกระดูกอ่อนอาจอธิบายได้จากการทำงานของเอนไซม์ท ทรานส์กลูตามิเนส ทรานส์กลูตามิเนสมีหน้าที่เชื่อมโมเลกุลของเมทริกซ์เข้าด้วยกันด้วยการสร้างพันธะโควาเลนต์ ทรานส์กลูตามิเนสที่พบแล้วในกระดูกอ่อนคือแฟคเตอร์ XIII ก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นในโรคข้อเสื่อม (12) ผู้วิจัยกลุ่ม เดียวกันพบว่าแทรปปีน-2 ในกระดูกอ่อนจับอยู่กับ fibromodulin (unpublished data) ซึ่งอาจทำให้สารทั้งสอง นี้ไม่ถูกปล่อยออกไปจากเมทริกซ์ แทรปปีน-2 จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นในโรคข้อเสื่อม กระบวนการนี้น่าจะเป็นส่วน หนึ่งของการลดการเสื่อมของกระดูกอ่อน ช่วยในการสมานเมทริกซ์เข้าด้วยกัน นอกจากแทรปปีน-2 แล้ว ผู้ เขียนคาดว่ายังมีโมเลกุลอื่น ๆ ในกระดูกอ่อนที่จับกับแทรปปีน-2 ได้อีกเนื่องจากโมเลกุลเหล่านี้อาจมีความ สำคัญในการก่อสร้างโครงสร้างคอลลาเจนซึ่งเป็นโครงหลักของกระดูกอ่อน

ทิสซูปแฟคเตอร์เป็นตัวควบคุมกลไกการแข็งตัวของเลือด กล่าวคือทิสซูปแฟคเตอร์จะจับกับ แฟคเตอร์ VII และแฟคเตอร์ VII ที่ถูกปลุกฤทธิ์แล้ว (แฟคเตอร์ VIIa) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือด ในลำดับสุดท้ายของขบวนการคือการสร้างทอมบิน (thrombin) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการก่อกำเนิดของไฟบริน (fibrin) การกระตุ้นเกร็ดเลือดและการเกิดลิ่มเลือด (thrombus) สิ่งที่น่าสนใจคือการปลุกฤทธิ์แฟคเตอร์ XIII

อาศัยทรมอน ซึ่งถูกกระตุ้นเป็นลำดับมาจากกลุ่มรวมที่เกิดจากพิษซูแฟคเตอร์และแฟคเตอร์ VII จึงควรมีการศึกษาต่อไปว่าการกระตุ้นให้เกิดทรมอนในกระดุกอ่อนเป็นขบวนการที่ต้องมีแฟคเตอร์ VII หรือไม่

ข้อจำกัดของการศึกษานี้คืออายุเฉลี่ยของกระดุกอ่อนที่ได้จากคนปกติและคนที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีความแตกต่างกันมาก คือกระดุกอ่อนปกติได้มาจากผู้ที่มีอายุน้อยกว่า 36 ปี ในขณะที่กระดุกอ่อนที่เป็นโรคทั้งหมดได้มาจากผู้ที่มีอายุมากกว่า 50 ปี จึงทำให้ไม่สามารถยืนยันด้วยความมั่นใจได้ว่าอายุไม่ได้มีผลต่อผลการทดลอง อีกข้อจำกัดหนึ่งคือการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ไม่ใช่วิธีที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณที่ตีรวมทั้งมีจำนวนตัวอย่างน้อย ดังนั้นจึงควรทำการเปรียบเทียบปริมาณในกระดุกอ่อนที่ปกติกับที่เป็นโรคด้วยวิธีอื่นเช่นวิธีอิลซาต่อไป

โดยสรุป การศึกษานี้ได้ค้นพบซีรีนโปรตีเอสคือแฟคเตอร์ VII และสารยับยั้งของซีรีนโปรตีเอสคือ แทรปซิน-2 ในกระดุกอ่อนของข้อ สารทั้งสองนี้อาจมีความสำคัญต่อความสมดุลของเมตริกซ์ในกระดุกอ่อนโดยผ่านทางเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส สิ่งที่ต้องการศึกษาต่อไปคือหน้าที่ของแฟคเตอร์ VII ในการปลุกฤทธิ์ทรมอนที่จะส่งผลให้เกิดการปลุกฤทธิ์ของทรานส์กลูตามิเนสซึ่งจะเชื่อมโมเลกุลในกระดุกอ่อนเข้าด้วยกันด้วยพันธะโควาเลนต์ และโมเลกุลอื่นๆที่จับอยู่กับแทรปซิน-2 โดยอาศัยทรานส์กลูตามิเนส

หนังสืออ้างอิง

1. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(9):1916-26.
2. Poole AR. Cartilage in health and disease. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions*. 14 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 226-284.
3. Aeschlimann D, Mosher D, Paulsson M. Tissue transglutaminase and factor XIII in cartilage and bone remodeling. *Seminars in Thrombosis* 1996;22(5):437-43.
4. Rosenthal AK, Masuda I, Gohr CM, Derfus BA, Le M. The transglutaminase, Factor XIIIa, is present in articular chondrocytes. *Osteoarthritis & Cartilage* 2001;9(6):578-81.
5. Rosenthal AK, Mosesson MW, Gohr CM, Masuda I, Heinkel D, Seibenlist KR. Regulation of transglutaminase activity in articular chondrocytes through thrombin receptor-mediated factor XIII synthesis. *Thromb Haemost* 2004;91(3):558-68.
6. Bryson H, Bunning RA, Feltell R, Kam CM, Kerrigan J, Powers JC, et al. A serine proteinase inactivator inhibits chondrocyte-mediated cartilage proteoglycan breakdown occurring in response to proinflammatory cytokines. *Arch Biochem Biophys* 1998;355(1):15-25.
7. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-75.
8. Philippart P, Brasseur M, Hoyaux D, Pochet R. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft: a 5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(3):411-6.
9. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan MC, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* 2002;46(11):2857-66.
10. Bokarewa MI, Morrissey J, Tarkowski A. Intra-articular tissue factor/factor VII complex induces chronic arthritis. *Inflamm Res* 2002;51(9):471-7.
11. Busso N, Morard C, Salvi R, Peclat V, So A. Role of the tissue factor pathway in synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 2003;48(3):651-9.
12. Rosenthal AK, Derfus BA, Henry LA. Transglutaminase activity in aging articular chondrocytes and articular cartilage vesicles. *Arthritis & Rheumatism* 1997;40(5):966-70.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานส่วนที่เกี่ยวกับแพรปิ่น-2 ได้ส่งไปรับการพิจารณาตีพิมพ์ใน Arthritis and Rheumatism ซึ่งยังอยู่ในระหว่างรอการตอบรับ ดังที่ได้แจ้งไปในจดหมายขอทุนว่าการทำอีไลซานี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ทำต่อเนื่องมาจากเวลาที่ผู้เขียนเป็นแพทย์ประจำบ้านต่อยอด ผลงานนี้จึงนำไปรวมกับงานที่ทำระหว่างเวลานั้น

ผลงานในส่วนที่เกี่ยวกับแฟคเตอร์ VII ให้ผลการทดลองที่ดีและน่าสนใจ แต่เนื่องจากผู้เขียนขอยุติทุนวิจัยก่อนเวลาจึงยังไม่ได้มีโอกาสดำเนินงานในส่วนนี้ต่อ ผลงานในส่วนนี้ยังไม่ได้ส่งไปตีพิมพ์ แต่ยังเป็นความมุ่งมั่นของผู้เขียนที่จะกลับไปทำต่อก่อนที่จะส่งผลงานไปตีพิมพ์ต่อไป

ภาคผนวก

ประกอบด้วย

1. abstract ที่เกี่ยวกับแทรปปีน-สองจาก Osteoarthritis and Cartilage 2004; 12; S42.
2. บทความที่ส่งไปตีพิมพ์และรอรับการพิจารณาจาก Arthritis and Rheumatism

P98

OSTEOARTHRITIC CARTILAGE CONTAINS INCREASED LEVELS OF THE SERINE PROTEASE INHIBITOR, TRAPPIN-2

K. Jaovisidha, I. Masuda, A. K. Rosenthal

Medicine/Division of Rheumatology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

Trappins are small serine protease inhibitors bound to extracellular matrix through the actions of transglutaminase enzymes. Trappin-2 is one of the better characterized members of the trappin family. It is also known as elafin or SKALP and inhibits neutrophil elastase and proteinase 3. In osteoarthritis, serine proteases contribute to cartilage destruction, and extracellular activity of the protein-crosslinking transglutaminase enzymes are increased. Yet, little is known about extracellular matrix-bound protease inhibitors in cartilage. The purpose of this work was to determine if trappin-2 is present in osteoarthritic cartilage and synovial fluids.

Osteoarthritic cartilage was obtained from tissue discarded from knee replacement surgeries. Osteoarthritic synovial fluid was from discarded fluids from diagnostic or therapeutic arthrocenteses. Normal cartilage samples were from a tissue bank. Articular cartilage samples were assayed for trappin-2 protein by Western blotting, ELISA, and immunohistochemistry. Trappin-2 mRNA was measured by RT-PCR. The presence of trappin-2 in synovial fluid was documented by Western blotting. The extracellular matrix components bound to trappin-2 in osteoarthritic cartilage were identified by 2-D gel electrophoresis and peptide fingerprinting.

Western blotting demonstrated trappin-2 in articular cartilage extracts, cultured chondrocytes, and synovial fluids from patients with osteoarthritis. Osteoarthritic articular chondrocytes secreted trappin-2 into conditioned media. A trappin-2 ELISA demonstrated trappin-2 levels of 23.1 ± 1.6 ng/mg cartilage in osteoarthritic cartilage extracts ($n = 8$) and 11.8 ± 3.2 ng/mg cartilage in normal cartilage extracts ($n = 3$) ($P < 0.004$). Immunohistochemical studies of osteoarthritic cartilage demonstrated trappin-2 protein in chondrocytes. RT-PCR supported local trappin-2 production by demonstrating the presence of trappin-2 mRNA in osteoarthritic chondrocytes. Peptide mapping of proteins bound to trappin-2 in osteoarthritic cartilage showed that fibromodulin was one of several protein partners of trappin-2.

We demonstrate the presence of trappin-2 in osteoarthritic cartilage and synovial fluid. Trappin-2 acts as a matrix-bound serine protease inhibitor in the presence of extracellular transglutaminase activity. Elevated levels of transglutaminase activity in degenerated cartilage may aid repair processes by increasing levels of trappin-2 in matrix.