

Abstract

Project Code : TRG5180017

Project Title : Investigation on the biochemical characterization and biological functions of proteoglycans from the cartilage of unossified alter of *Cervus timorensis*

Investigator : Dr. Peraphan Pothacharoen, Chiang Mai University

E-mail Address : peraphan.pothacharoen@gmail.com

Project Period : 2 years

Velvet antlers are the fastest growing mammalian tissue, reaching growth rates of approximately two centimeters per day during the growing season. In cartilage and bone cellular activity largely depends on the interaction with vast amount of extracellular matrix substances. The chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) of cartilage are dynamic components that play major roles in the normal physiology of cartilage and regulate the biological processes since many of their functions are associated with the glycosaminoglycans (GAGs), especially, the structure of the CS chains is quite considerable interest. The CSPGs from tip and mineralized cartilage of the unossified antler of *Cervus timorensis* were extracted by GuHCl and CsCl ultracentrifugation. The CS extraction and disaccharide composition were evaluated by anion exchange solid phase extraction and enzymatic using chondroitinases in combination of HPLC. A disaccharide composition demonstrated that CSA [GlcA β 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] and di-4S [GlcA β 1-3GalNAc(6-O-Sulfate)] are the major disaccharide constituents, which found in high density gradient centrifugation fraction of both cartilaginous antler tips (CSA:CSC ratio = 1:1). In addition, we reported for the first time about oversulfated disaccharide units: CSD [GlcA(2S) β 1-3GalNAc(6S)] and CS-E [GlcA(2S) β 1-3GalNAc(4S, 6S)] containing in low density gradient centrifugation fractions. The biological functions of antler CS oligosaccharides were studied 1) growth factors interaction analysis on surface plasmon resonance (SPR) system 2) chondroprotective effects using porcine explant model and 3) osteogenesis property by bone matrix proteins gene expression analysis. The antler CS oligosaccharides showed the specific binding affinity toward the recombinant FGF, which has been reported that plays an important role in the development of bone and cartilage. CS antler oligosaccharides from Cr and Mc protected IL-1 β induced cartilage degradation. In addition, the bone matrix proteins (alkaline phosphatase, collagen type I and osteocalcin) in osteoblast cell line (hFOB 1.19) were induced by antler oversulfated chondroitin sulfate treatment. CS

oligosaccharides from cartilaginous antler with their chondroprotective and osteogenesis properties, may be good candidate for therapeutic application for bone and joint diseases.

Keywords : deer antle, cartilage, chondroitin sulfate proteoglycans, oversulfated disaccharide, chondroprotective, osteogenesis

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5180017

ชื่อโครงการ: การแยกเอกลักษณ์และคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนไกลัยแคนที่สกัดได้จาก
กระดูกอ่อนเขากวางสายพันธุ์ รูซ่า (*Cervus timorensis*)

ชื่อนักวิจัย: นางสาว พิรพรรณ โพธาเจริญ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail address : peraphan.potahacharoen@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เขากวางอ่อนเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตไวที่สุดในบรรดาสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีอัตราการงอกของเขากวางประมาณ 2 เซนติเมตรต่อวัน พบว่าโปรตีนบนผิวเซลล์และสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบนอกเซลล์โดยเฉพาะโครงสร้างและองค์ประกอบของสารโปรตีนไกลัยแคนมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์สร้างกระดูก ในการศึกษาครั้งนี้สนใจศึกษาเกี่ยวกับกลไกของโปรตีนไกลัยแคนชนิดคอนดรอยติน ซัลเฟต จากโปรตีนไกลัยแคน ที่สกัดได้จากเขากวางอ่อนของเขากวางสายพันธุ์รูซ่า (*Cervus timorensis*) ในส่วนที่เป็นกระดูกอ่อนส่วนปลายสุด (Cr) และ ส่วนที่เริ่มเป็นกระดูกแข็ง (Mc) โดยได้ทำการแยกบริสุทธิ์โดยกัวนิติน ไฮโดรคอลลอยด์ และการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงจากการศึกษาน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ คอนดรอยติเนส เอบีซี และวิธี HPLC พบว่าประกอบด้วยคอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิด เอ [GlcA β 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] และ ซี [GlcA β 1-3GalNAc(6-O-Sulfate)] อัตราส่วน 1:1 ในชั้นสกัดความหนาแน่นสูงจาก ultracentrifugation นอกจากนั้นการศึกษานี้ได้รายงานเป็นครั้งแรกถึงการค้นพบ คอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิด CSD [GlcA(2S) β 1-3GalNAc(6S)] และ CS-E [GlcA β 1-3GalNAc (4S, 6S)] ในชั้นสกัดความหนาแน่นต่ำ ในส่วนคุณสมบัติทางด้านชีวภาพได้ทำการทดสอบ 1) การจับของสายคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้กับ growth factor ชนิดต่างๆ ที่มีรายงานว่าสามารถจับกับกลัยโคซามิโนไกลัยแคนได้ โดยวิธี surface plasmon resonance (SPR) system 2) คุณสมบัติการป้องกันการถูกทำลายของกระดูกอ่อน โดยการใช้ porcine cartilage explant model 3) คุณสมบัติในการเสริมสร้างกระดูก โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง bone matrix proteins จากการศึกษาพบว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ FGF ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาการของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง นอกจากนี้พบว่า สายคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้สามารถลดการทำลายของชั้นกระดูกอ่อนจากการกระตุ้นด้วย IL-1 β และสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (alkaline phosphatase, collagen type I และ osteocalcin) ในเซลล์สร้างกระดูกชนิด hFOB1.19 ได้จาก ผลศึกษาทั้งหมดพบว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง มีสมบัติป้องกันการทำลายของกระดูกอ่อนและส่งเสริมการพัฒนาการของกระดูกแข็ง จึงมีแนวโน้มในการพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกอ่อนและข้อได้

คำหลัก : เขากวางอ่อน, กระจูดอ่อน, คอนดรอยติน ชัลเฟต โปรตีนโอกลัยแคน, สมบัติการป้องกัน
การทำลายของกระจูดอ่อน, การเสริมสร้างการสร้างกระจูด