



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ  
การศึกษาแยกแยะลักษณะและคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนโอกลัยแคนที่  
สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง *Cervus timorrensis*

โดย  
นางสาว พีรพรรณ โปธาเจริญ

มีนาคม 2554

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ  
การศึกษาแยกเอกลักษณ์และคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนโอกลัยแคนที่  
สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง *Cervus timorrensis*

นางสาว พิศพรรณ โปธาเจริญ  
ภาควิชา ชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## 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 $\beta$ 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] and di-4S [GlcA $\beta$ 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) $\beta$ 1-3GalNAc(6S)] and CS-E [GlcA(2S) $\beta$ 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 $\beta$  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

เขากวางอ่อนเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตเร็วที่สุดในบรรดาสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 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 $\beta$ 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] และ ซี [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(6-O-Sulfate)] อัตราส่วน 1:1 ในชั้นสกัดความหนาแน่นสูงจาก ultracentrifugation นอกจากนั้นการศึกษานี้ได้รายงานเป็นครั้งแรกถึงการค้นพบ คอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิด CSD [GlcA(2S) $\beta$ 1-3GalNAc(6S)] และ CS-E [GlcA $\beta$  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 $\beta$  และสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (alkaline phosphatase, collagen type I และ osteocalcin) ในเซลล์สร้างกระดูกชนิด hFOB1.19 ได้จาก ผลศึกษาทั้งหมดพบว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง มีสมบัติป้องกันการทำลายของกระดูกอ่อนและส่งเสริมการพัฒนาการของกระดูกแข็ง จึงมีแนวโน้มในการพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกอ่อนและข้อได้

**คำหลัก :** เขากวางอ่อน, กระจูดอ่อน, คอนดรอยติน ซัลเฟต โปรตีนโอกลัยแคน, สมบัติการป้องกัน  
การทำลายของกระจูดอ่อน, การเสริมสร้างการสร้างกระจูด

## สารบัญภาพ

หน้า

|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปที่ 1 แสดงกระดูกอ่อนเขากวาง และชิ้นกระดูกอ่อนส่วนปลาย ( ส่วน Cartilage: tip) ที่ได้แยก เอาหนึ่ง หุ้มกระดูกอ่อนออกแล้ว                                                                                       | 3  |
| รูปที่ 2 แสดงวิธีการสกัดและตรวจสอบกลัยโคซามิโนไกล์แคนจากกระดูกอ่อนเขากวาง                                                                                                                                      | 4  |
| รูปที่ 3 แสดงการเตรียมและเพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนในหลอดทดลองในเพลทเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร และในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม                                                                  | 7  |
| รูปที่ 4 แสดง 4-20% gradient SDS-PAGE ที่ย้อมโปรตีนด้วยสี coomassie blue ของ cartilage: Cr (tip) ที่แยกได้ ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl ultracentrifugation                                          | 12 |
| รูปที่ 5 แสดง 4-20% gradient SDS-PAGE ที่ย้อมโปรตีนด้วยสี coomassie blue ของ mineralized cartilage: Mc (top) ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl ultracentrifugation                                        | 12 |
| รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของสาย คอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์ ที่แยกได้จากสารสกัดกระดูกอ่อนเขากวาง cartilaenous tip (Cr) ในชั้นสกัด Cr1-Cr6 (A-E)                       | 14 |
| รูปที่ 7 แสดงโครมาโตแกรมของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของสาย คอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์ ที่แยกได้จากสารสกัดกระดูกอ่อนเขากวาง mineralized cartilage (Mc) ในชั้นสกัด Mc1-Mc6 (A-E)                  | 15 |
| รูปที่ 8 Sensorgrams แสดงการจับกันของ FGF, EGF หรือ NGF กับ immobilized biotinylated CS                                                                                                                        | 17 |
| รูป 9 แสดงปริมาณกรดยูโรนิกที่คงเหลือในชิ้นกระดูกในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$ เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$ ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu$ g/ml | 19 |
| รูป 10 แสดงปริมาณกรดยูโรนิกที่คงเหลือในชิ้นกระดูกในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย                                                                                                                                       | 19 |

- IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Mc1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu\text{g/ml}$
- รูป 11 แสดงปริมาณไฮยาลูโรแนนที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu\text{g/ml}$  20
- รูป 12 แสดงปริมาณไฮยาลูโรแนนที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu\text{g/ml}$  21
- รูป 13 แสดงปริมาณกลัยโคซามิโนกลัยแคน (sulfated glycosaminoglycan: s-GAG) ที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu\text{g/ml}$  22
- รูป 14 แสดงปริมาณกลัยโคซามิโนกลัยแคน (sulfated glycosaminoglycan:s-GAG) ที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu\text{g/ml}$  22
- รูปที่ 15 แสดงร้อยละของการยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก hFOB1.19 เมื่ออยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อนเขากวาง ที่ความเข้มข้น 3.19 -1000  $\mu\text{g/ml}$  23
- รูปที่ 16 ภาพแสดงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกของเซลล์สร้างกระดูก hFOB 1.19 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง Cr ในชั้น Cr 1, Cr3 และ Cr5 และสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่ถูกย่อยด้วย เอนไซม์ chondroitinase ABC 24

## สารบัญตาราง

|                                                                                                                                                                                                            | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักเปียกของชิ้นกระดูกและน้ำหนักแห้งสารสกัดกระดูกที่สกัดได้                                                                                                                              | 10   |
| ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักแห้งส่วนต่างๆ ของกระดูกอ่อนส่วนยอด (Cartilage, tip) ที่แยกได้ ภายหลังการแยกบริสุทธิ์ด้วย CsCl Ultracentrifugation รวมถึงปริมาณโปรตีนและ กลัยโคซามิโนกลัยแคน                          | 11   |
| ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักแห้งส่วนต่างๆ ของกระดูกอ่อนส่วน mineralized cartilage (top) ที่แยกได้ ภายหลังการแยกบริสุทธิ์ด้วย CsCl Ultracentrifugation รวมถึงปริมาณโปรตีน และกลัยโคซามิโนกลัยแคนที่เป็นองค์ประกอบ | 11   |
| ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ ของสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรต์ ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง Cr, และ MC                                                                           | 16   |
| ตารางที่ 5 Kinetic parameters ของการจับกันได้ระหว่าง growth factors กับ biotinylated CS.                                                                                                                   | 18   |

## สารบัญ

|                                        | หน้า |
|----------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                        | i    |
| Abstract                               | ii   |
| บทคัดย่อ                               | iv   |
| สารบัญภาพ                              | vi   |
| สารบัญตาราง                            | viii |
| บทนำ                                   | 1    |
| วัตถุประสงค์                           | 2    |
| วิธีการทดลอง                           | 3    |
| ผลการทดลอง                             | 12   |
| สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง               | 26   |
| เอกสารอ้างอิง                          | 28   |
| output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน สกว | 30   |
| รายงานการเงินในรอบ 24 เดือน            | 31   |

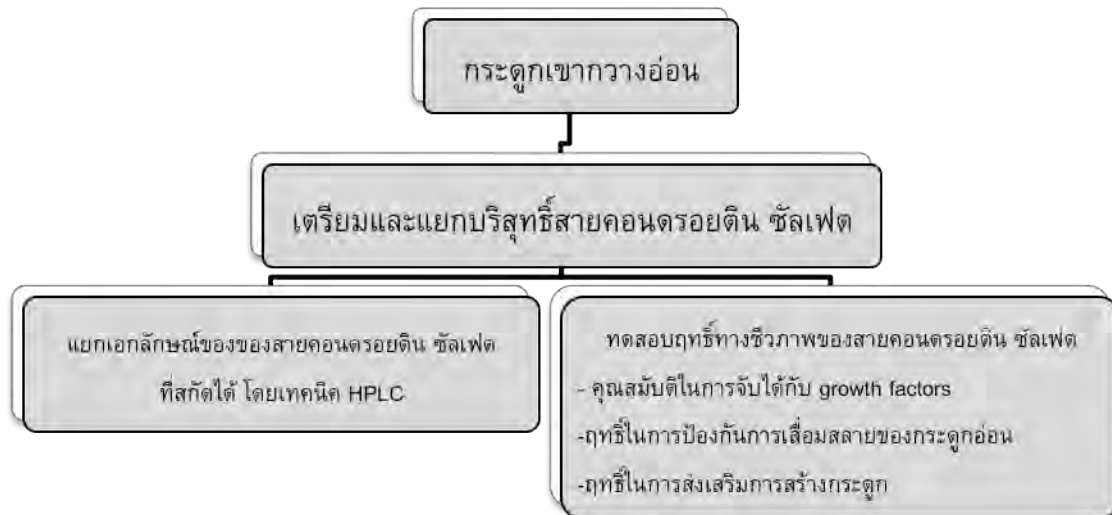
## บทนำ

กระดูกเขากว้างอ่อน เป็นเนื้อเยื่อที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเซลล์ (cellular differentiation) ไปเป็นกระดูกแข็ง ลักษณะทางกายภาพของกระดูกเขากว้างอ่อนพบว่าเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดกระดูกอ่อน (cartilage)(1, 2) ที่ประกอบด้วยเซลล์และส่วนของสารประกอบนอกเซลล์ (extracellular matrix) การศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สารชีวโมเลกุลชนิดกลัยโคซามิโนกลัยแคน (glycosaminoglycan: GAG) ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกเขากว้างอ่อน มีองค์ประกอบหลัก เป็นคอนดรอยติน ซัลเฟต (chondroitin sulfate) รองลงมาได้แก่ เคอราแตน ซัลเฟต (keratin sulfate) , เดอร์มาแตน ซัลเฟต (dermatan sulfate) (3) และ เฮปาริน ซัลเฟต (heparan sulfate) (4)

คอนดรอยติน ซัลเฟต เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลคู่เรียงต่อกันซ้ำๆ (repeated disaccharide units) มักจะรวมตัวกับโปรตีน และเป็นองค์ประกอบของโปรตีโอกลัยแคน (proteoglycan) ที่พบได้ทั้งในสารประกอบนอกเซลล์และบนเยื่อหุ้มเซลล์ มีหลักฐานการวิจัยพบว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต โปรตีโอกลัยแคน ที่พบในกระดูกอ่อนมีการสร้างขึ้นและสลายตัวในสภาวะที่สมดุลอยู่ตลอดเวลา ตลอดวงจรชีวิตของคอนดรอยติน ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเจริญเติบโต หรืออายุที่เพิ่มมากขึ้น และการเปลี่ยนแปลงนี้มีบทบาทสำคัญ ในการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพในกระดูกอ่อน เช่น การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการจดจำได้ของสารชีวโมเลกุลภายนอกเซลล์รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และการสร้างเนื้อเยื่อของเซลล์ประสาท (5, 6) โดยบทบาทเหล่านี้ขึ้นกับโครงสร้างของคอนดรอยติน ซัลเฟต และการเรียงตัวของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบ มีรายงานว่าคอนดรอยติน ซัลเฟตที่มีหมู่ซัลเฟต มากกว่าหนึ่งหมู่ต่อน้ำตาลโมเลกุลคู่ (oversulfated disaccharide units) ซึ่งพบมากในสัตว์ทะเล เช่น คอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิด อี [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4,6-O-Sulfate)] และ ดี [GlcA(2-O-sulfate) $\beta$ 1-3GalNAc(6-O-Sulfate)] สามารถพบได้ในสมองของหนู และเอ็มบริโอของหนู mice และหนู rat และในสมองของไก่ก็พบ oversulfated disaccharide units ดังกล่าวใน ปริมาณที่ใกล้เคียงกับ คอนดรอยตินซัลเฟต ชนิด เอ [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] และ ซี [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] แต่เมื่อมีการพัฒนาของสมองจะพบมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น (7)

จากการที่เขากว้างอ่อนมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกแข็งได้ในการทดลองนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงโครงสร้างของคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่แยกได้จาก กระดูกอ่อนเขากว้าง และคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยเน้นหนักไปในการแยกบริสุทธิ์ศึกษาองค์ประกอบ และศึกษาสมบัติทางชีวภาพในด้านที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและข้อ

วัตถุประสงค์ เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์และตรวจสอบเอกลักษณ์ของสายคอนตรอยดิน ชัลเฟต ที่แยกได้จากกระดูกอ่อนเขากวางสายพันธุ์ชวา (*Cervus timorensis*) และศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร คอนตรอยดิน ชัลเฟต ที่แยกได้ โดยมีแผนงานวิจัยดังแผนภาพด้านล่าง



## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมและแยกบริสุทธิ์สายคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อนของเขากวางอ่อนของกวางสายพันธุ์ซา

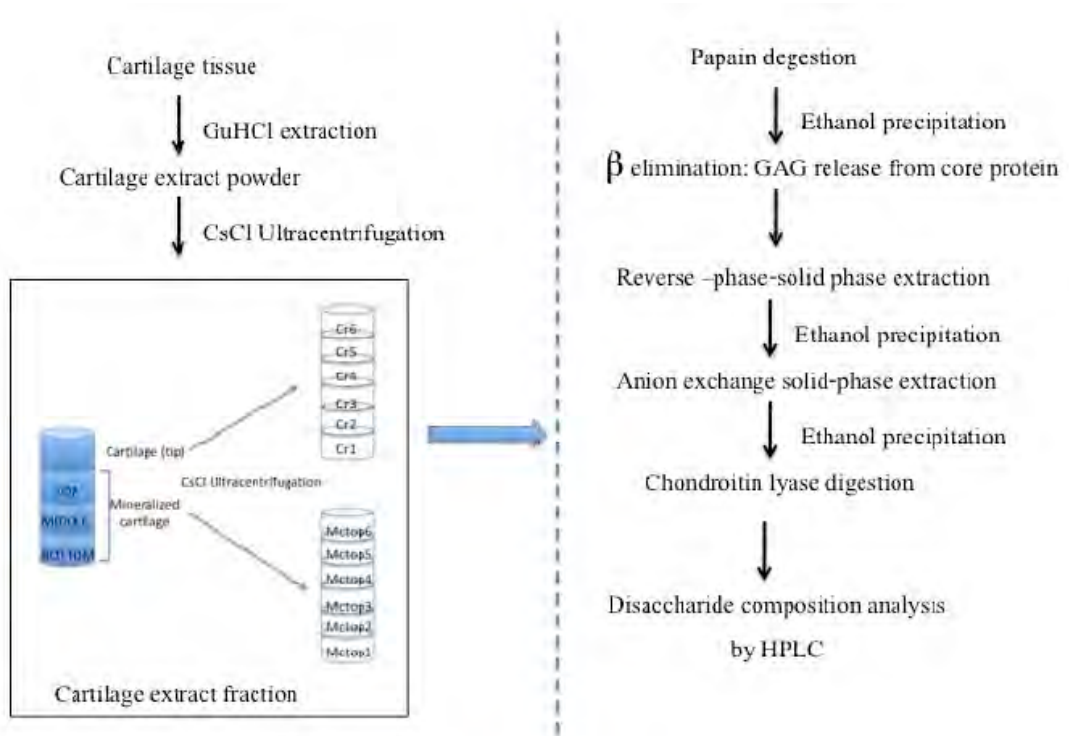
การเตรียมสารสกัดกระดูกอ่อนและกลัยโคซามิโนกลัยแคนจากกระดูกอ่อนเขากวางโดยวิธี Cesium chloride (CsCl) ultracentrifugation

นำกระดูกเขากวางรูซ่า *Cervus timorrensis* ที่ได้มาจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏจลลันนาลำปาง จ. ลำปาง มาทำการลอกเอาหนังหุ้มออก แบ่งเขา กวางออกเป็น 4 ส่วน นับจากส่วนปลายสุดที่เป็นกระดูกอ่อน (cartilage) เรียกชื่อเรียง จากปลายสุด ว่า 1) Cartilage tip (Cr) และ 2) Mineralized cartilage ส่วนปลาย (MC top) 3) Mineralized cartilage ส่วนกลาง (MC middle) 4) Mineralized cartilage ส่วนล่าง (MC bottom) แต่ละส่วนจะถูกซัง น้ำหนักเปียกและนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และล้างในน้ำเกลือ (0.9% w/v NaCl) และ 10% (v/v) triton X-100 ในน้ำเกลือเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนและเม็ดเลือดทิ้งไป สารสกัดจากกระดูกอ่อนจะถูกสกัดออกมาโดยสารละลาย 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 4M guanidine HCl, 10 mM EDTA, 10 mM aminocarproic acid, 10 mM N-ethylmaleimide, 2 mM PMSF เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำมากำจัดเกลือออกโดยกระบวนการ dialysis ด้วยน้ำกลั่นและทำเป็นผงแห้งโดยเรียกสารสกัด ที่ได้ว่าสารสกัดกระดูกอ่อน (cartilage extract)

นำสารสกัดจากกระดูกอ่อนทั้ง 4 ส่วน (Cartilage tip; Mineralized cartilage top; Mineralized cartilage middle; Mineralized cartilage bottom) มาซังและบั่นทีกน้ำหนักแห้ง สารสกัดส่วน cartilage tip และ Mineralized cartilage top จะถูกนำมาแยกเอาส่วนที่เป็นโปรตีนโกลัยแคนออกมา โดยวิธี CsCl ultracentrifugation ซึ่งมีวิธีการทำอย่างย่อคือ นำ cartilage extract มาละลายในสารละลาย 4M GuHCl และปรับความความถ่วงจำเพาะของสารละลายให้เป็น 1.7 g/ml โดยผง CsCl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 38,000 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยภายหลังจากการปั่นเหวี่ยงสารละลายใน centrifuge tube จะถูกแยกเก็บ เป็น 6 ส่วน เรียกตามลำดับจากด้านล่างมาด้านบนว่า A<sub>1</sub>-A<sub>6</sub> โดยส่วนล่างสุด (A<sub>1</sub> fraction) จะเป็นส่วนที่มีโปรตีนโกลัยแคนสูงสุดและส่วน ที่อยู่ถัดขึ้นมาจะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่มากขึ้น (8) สารสกัดแต่ละส่วนจะถูกนำมากำจัดเอาเกลือออก โดยวิธี dialysis จากนั้น ทำให้แห้งด้วย lyophilizer ทำการบั่นทีกน้ำหนักแห้ง, ความหาเข้มข้นของโปรตีน และกลัยโคซามิโนกลัยแคน



รูปที่ 1 แสดงกระดูกอ่อนเขากวาง และชิ้นกระดูกอ่อนส่วนปลาย (ส่วน Cartilage: tip) ที่ได้แยกเอาหนัง หุ้มกระดูกอ่อนออกแล้ว



รูปที่ 2 แสดงวิธีการสกัดและตรวจสอบกลัยโคซามิโนกลัยแคนจากกระดูกอ่อนเขากวาง

### การวิเคราะห์หาปริมาณ sulfated glycosaminoglycan (s-GAG) โดยวิธี Dye binding Assay

ความเข้มข้นของกลัยโคซามิโนกลัยแคน ซัลเฟต ในตัวอย่างสารสกัดกระดูกอ่อนได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี dye binding assay (9) โดยใช้สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน (คอนตรอยดิน ซัลเฟต) ซึ่งความเข้มข้นระหว่าง 0-30  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาตร 50  $\mu\text{l/well}$  เติมลงไปในไมโครเพลท จากนั้นทำการเติม 1,9-dimethylmethylene blue dye ปริมาตร 200  $\mu\text{l/well}$  แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 590 nm. คำนวณความเข้มข้นของ s-GAG ในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

### การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี BCA assay

ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดกระดูกอ่อน หาได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี BCA (bicinchoninic acid) assay (10) โดยทำการปิเปตสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน (Bovine serum albumin: BSA standards) ความเข้มข้นระหว่าง 0-1000  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาตร 20  $\mu\text{l/well}$  ลงในไมโครเพลท จากนั้นเติมสารผสมของ Copper (II) sulfate pentahydrate 4% (w/v) และ bicinchoninic acid solution ในอัตราส่วน (1:50) ปริมาตร 200  $\mu\text{l/well}$  แล้วนำไมโครเพลท ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm. คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

### การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของคอนตรอยดิน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

คอนตรอยดิน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์จะถูกนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย เทคนิค HPLC โดยใช้ amine-bound silica PA-03 column (4.6x250 mm; YMC Co., Kyoto, Japan) และใช้สารละลาย linear gradient of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  โดยมีอัตราการไหลที่ 1 ml/min ที่อุณหภูมิห้อง (11, 12) โดยสารตัวอย่าง ปริมาณ 2.5  $\mu\text{mol}$  จะถูกเตรียมโดยการละลายใน 16 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ให้ได้ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  เพื่อทำการวิเคราะห์ สารละลายที่ถูกชะออกมา (Eluate) จะถูก ตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 232 nm.

### การองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) บนสายคอนตรอยดิน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์ โดยวิธี HPLC (13)

ทำการย่อยสารโอลิโกแซคคาร์ไรด์ด้วยเอนไซม์คอนตรอยติเนส เอบีซี (chondroitinase ABC) ให้ได้น้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยผสมตัวอย่างที่แยกขนาดได้ (0.5 ถึง 1.0 nM) กับ 10 mlU เอนไซม์ chondroitinase ABC ในสารละลายบัฟเฟอร์ (250 mM Tris-HCl, pH 7.3) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที สารตัวอย่างอนุพันธ์จะนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลคู่ด้วยเทคนิค anion-exchange chromatography โดยใช้ amine-bound silica PA-03 column (250x4.6 mm) ที่ใช้ตัวชะเป็นระบบแบบ linear gradient ด้วย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ความเข้มข้น 16 ถึง 798 mM อัตราการไหล 1 ml/min เป็นเวลา 60 นาที สารละลายที่ถูกชะออกมา (Eluate) จะถูกตรวจสอบ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 232 nm

## 2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้โดยทดสอบการ binding กับ growth factors ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Surface Plasmon Resonance

การเตรียม oligosaccharide เพื่อติดกับ chip โดยการติดฉลากด้วย biotin

ทำการติดฉลากสายคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรต์ ทางด้านปลายคาร์บอกซีของ สายน้ำตาล กับไบโอตินโดย biotin hydrazide reagents ที่จะได้ผลผลิตเป็นสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่ถูกติดฉลากด้วย biotin โดยใช้ hydrazine linkage จากนั้นทำการกำจัด biotin ที่เหลือจากการติดฉลากโดยเทคนิค gel filtration โดย PD-10 column (GE Healthcare)

การทดสอบการ binding ของคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรต์ กับ growth factors โดย surface Plasmon resonance analysis (14, 15)

ทำการตรวจสอบและวิเคราะห์การจับกันของ growth factor และสายคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรต์ โดย BIACORE X system (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) โดยทำการตรึง (immobilize) และสายคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรต์ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin บน streptavidin-derivatized sensor chips (SA sensor chip) โดยใช้การจับกันอย่างจำเพาะของ biotin และ streptavidin โดย repeated injection ที่อัตราการไหล 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  เป็นเวลา 2 นาที และจนได้สัญญาณที่ resonance 3000 unit ซึ่งเท่ากับ 140  $\mu\text{g}$  of sugar chain ความเข้มข้นของ growth factor ที่ใช้เข้าไปทำการทดสอบจะมีความเข้มข้น 5-35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  โดยจะละลายใน running buffer, pH 7.4 (HBS-EP) ที่ประกอบด้วย 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA และ 0.005% (w/v) Tween 20 โดยทำการฉีดเข้าไปในอัตราการไหล 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  เป็นเวลา 2 นาที ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ resonance unit ภายหลังจากฉีด growth factor แล้วจะทำการล้าง ออกด้วย 2 M NaCl เป็นเวลา 1 นาที และ sodium acetate เป็นเวลา 1 นาที

Kinetic parameter จะคำนวณโดยใช้โปรแกรม BIAevaluation software 3.1 (BIAcore AB) โดยใช้ 1:1 binding model แล้วคำนวณหา  $k_a$  (association rate constant) ,  $k_d$  (dissociation constant) จาก sensogram และ equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) คำนวณจาก อัตราส่วนของ  $k_d/k_a$  โดยค่า kinetic constants ดังกล่าวจะคิดจากค่าเฉลี่ยของการทำการทดลองในช่วงความเข้มข้นต่างกัน 4 ค่า

## 3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการสลายกระดูกอ่อนในหลอดทดลองโดยวิธี IL-1 $\beta$ –induced cartilage explant model

การเลี้ยงกระดูกอ่อนข้อต่อในหลอดทดลอง (cartilage explant)

นำกระดูกอ่อนข้อต่อฝ่าเท้า (metacarpophalangeal joints) ของหนูอายุประมาณ 3-5 เดือน ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ โดยทำการตัดแยกเอาส่วนของ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆออก รวมทั้งส่วนของเยื่อหุ้มกระดูกอ่อนออกและแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นกระดูกอ่อนข้อ ต่อจากนั้นนำมาล้าง ใน Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ที่มี 50 units/ml penicillin, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin เป็นเวลา 30 นาที ตัดให้มีขนาดประมาณ 3x3 ตารางมิลลิเมตร นำกระดูกอ่อนข้อต่อ

ที่แยกได้เลี้ยงในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตรที่มีอาหาร เลี้ยงเซลล์ DMEM (250 units/ml penicillin, 250 µg/ml streptomycin) อยู่ 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



แท่งหมูที่ใช้เตรียมกระดูกอ่อน  
(cartilage explant)



บริเวณกระดูกอ่อนจากข้อเท้าหมู



การเลี้ยงกระดูกอ่อนในเพลทเลี้ยงเซลล์

รูปที่ 3 แสดงการเตรียมและเพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนในหลอดทดลองในเพลทเลี้ยงเซลล์  
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร และในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม

การศึกษาผลของสายคอนดรอยติน ซัลเฟตในการต้านการสลายกระดูกอ่อนในหลอดทดลอง

นำกระดูกอ่อนข้อต่อที่เตรียมได้มาชั่งน้ำหนักและใส่ลงในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ในอัตราส่วนของกระดูกอ่อนข้อต่อ 30 mg ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml โดยที่อาหารเลี้ยงเซลล์ ในขั้นตอนนี้จะมีการกระตุ้นให้เกิดภาวะการอักเสบด้วย IL-1 $\beta$  (7.5 ng/ml) ในภาวะที่มีหรือไม่มีสารสกัด คอนดรอยติน ซัลเฟต ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 25-100 µg/ml

ทำการเลี้ยงกระดูกอ่อนข้อต่อ โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ใส่สารดังกล่าวข้างต้นกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> ความชื้น 95 % เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาเก็บส่วนของกระดูกข้อต่อและอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการวิเคราะห์การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนข้อต่อในหลอดทดลองต่อไป

### การวิเคราะห์หาปริมาณ Glucuronic acid ในชั้นกระดูกอ่อนข้อต่อโดยวิธี Uronic assay

เป็นการตรวจวัดปริมาณรวมของ glucuronic acid (hyaluronan และ aggrecan) ที่เหลือในชั้นกระดูกอ่อน ขณะที่มีการเสื่อมสลายของ ECM นำกระดูกอ่อนข้อต่อที่ได้จากการเลี้ยงในมาทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นเติม re-hydration เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำกระดูกอ่อนข้อต่อมาย่อยด้วย papain solution (1 unit/ml papain, 0.01 M cysteine, 0.01 M EDTA, 0.05 phosphate buffer, pH 7.0 สารละลายนี้ได้ผ่านการ pre-activate ก่อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์) ในอัตราส่วนกระดูก อ่อนข้อต่อ 0.1 g. ต่อ papain solution 1 ml ตั้งทิ้งไว้ที่ 60 °C จนกระดูกอ่อนข้อต่อกลายเป็นสารละลาย (ใช้เวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง) นำสารละลายกระดูกอ่อนข้อต่อละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ml ดูดสารละลายมา 400 µl ลงในหลอดทดลองที่แช่เย็นเดิม 2.5 ml concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-borate (0.0125 M sodium tetraborate (Borax) in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ในที่เย็นผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5-10 นาที นำมาแช่ในน้ำแข็ง และเติม 0.1% m-phenylphenol (ใน absolute ethanol) ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยปริมาณ Glucuronic acid ในชั้นกระดูกอ่อน คำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### การวิเคราะห์หาปริมาณไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan; GAG) ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี

#### Farndale reaction

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณกลัยโคซามิโนไกลแคนที่มีหมู่ซัลเฟตในโมเลกุล ด้วยวิธี Farndale reaction โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดลอง มาตัวอย่างละ 50 µl เติม 200 µl ของ dimethylmethylene blue (DMMB) solution (1 L; 16 mg DMMB, 3.04 g glycine, 2.37 g NaCl, pH 3.0) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาคำนวณหาปริมาณ กลัยโคซามิโนไกลแคนโดยใช้สารคอนตรอยดิน ซัลเฟต ซี (chondroitin-6-sulfate; CS-C) ที่ความเข้มข้น 10-40 µg/ml เป็น สารมาตรฐาน

### การวิเคราะห์หาปริมาณไฮยาลูโรแนน (HA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี ELISA

ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮยาลูโรแนนที่ถูกสลายออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเคลือบ เพลท 96 หลุม ด้วยไฮยาลูโรแนน (0.1 mg/ml umbilical cord HA ใน coating buffer) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นทำการล้างเพลทด้วย PBS-Tween (phosphate buffer saline – Tween ) และ block เพลทด้วย 1% BSA (bovine serum albumin) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเตรียม inhibition mixture ของสารมาตรฐาน (ไฮยาลูโรแนน; HA-Healon, ที่ความเข้มข้น 3.9-1,000 ng/ml) และสารตัวอย่าง ใน B-HABP (biotinated hyaluronan binding proteins) ที่อัตราส่วน 1:200 (ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำเพลทที่ block ด้วย 1% (w/v) BSA มาล้างด้วย PBS-Tween จากนั้นเติม inhibition mixture ของสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างลงไปหลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBS-Tween และเติม Conjugate Anti-Biotin conjugated Peroxidase ที่ความเข้มข้น 1: 4,000 หลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBS-Tween และเติมสับสเตรท (8 mg OPD, 12 ml citric phosphate buffer, pH 5.0 และ 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) หลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วย 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> หลุมละ 50  $\mu$ l วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 และ 690 nm ด้วยเครื่อง Multiskan M340 multiplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไฮยาลูโรแนนเทียบกับสารมาตรฐาน

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ในการส่งเสริมการสร้างกระดูก

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกในเซลล์สร้างกระดูก (osteoblastic cell line) ชนิด hFOB1.19

##### การทดสอบความเป็นพิษของสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่สกัดได้ต่อเซลล์สร้างกระดูก

เพื่อทดสอบถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมในของสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่ใช้ในการทดสอบเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก (human osteoblast cell line) ชนิด hFOB1.19 ใน 96-well culture plate จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ด้วย Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มี 10% FCS , 100 U/ml penicillin และ 100 ug/ml streptomycin เป็นเวลาข้ามคืน ใน CO<sub>2</sub> incubator 37°C จากนั้นทำการอดอาหารเซลล์ โดยทำการเปลี่ยนไปเลี้ยงใน DMEM ที่ไม่มี FCS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟตที่ได้จากกระดูกอ่อน เขากวาง Cr<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้น 3.19-1000 ug/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาทำการเติมสารละลาย MTT ปริมาตร 5  $\mu$ l ลงในแต่ละหลุมและทำการ incubate ต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการชะสารละลายในหลุมที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป และเติม DMSO ลงไป 100  $\mu$ l ต่อหลุม ทำการวัดสีของผลึก formazan ที่ละลายโดย DMSO ที่เกิดขึ้น โดย microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell survival) คำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ cell survival} = (\text{OD of sample} / \text{OD of control}) \times 100$$

โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 จะนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

##### การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกในเซลล์สร้างกระดูก

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกชนิด hFOB ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FCS DMEM ใน 6 well plate ให้ได้ 80 % confluence ทำการอดอาหารโดยการเพาะเลี้ยงใน serum free DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ความเข้มข้น 0-100 ug/ml และทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการแตกเซลล์สกัด total RNA โดยวิธี spin column (GE Healthcare Bioscience) จากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้ 2 mg มาทำการเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Reverse Aid™ H Minus First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) จากนั้นนำ cDNA ไปตรวจหาการแสดงออกของยีนโดยวิธี Quntitative Realtime PCR โดยน้ำยาสำเร็จรูป SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA) โดยใช้ primer ดังตาราง

| Gene            | Sequence (5'-3'):           | Accession number |
|-----------------|-----------------------------|------------------|
| ALP             | F:CATGGCTTTGGGCAGAAGGA      | NM_001114107.2   |
|                 | R:CTAGCCCCAAAAAGAGTTGCAA    |                  |
| Type I Collagen | F:CAGCCGCTTCACCTACAGC       | NM_000088.3      |
|                 | R:TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC |                  |
| OC              | F: GAAGCCCAGCGGTGCA         | NM_199173.2      |
|                 | R: CACTACCTCGCTGCCCTCC      |                  |
| GAPDH           | F:GAAGGTGAAGGTCGGAGTC       | NM_002046.3      |
|                 | R:GAAGATGGTGATGGGATTTC      |                  |

## ผลการทดลอง

### การแยกบริสุทธิ์สายคอนตรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อนเขากวาง

จากการทดลองพบว่า สามารถแยกคอนตรอยติน ซัลเฟต ออกมาจากกระดูกอ่อนเขากวางได้ โดยมีปริมาณกลัยโคซามิโนกลัยแคน เท่ากับ 28.1 และ 33.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  น้ำหนักแห้งของสารสกัดกระดูกอ่อน Cr และ MC fraction ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ 3) และมีอัตราส่วนของกลัยโคซามิโนกลัยแคน ซัลเฟตต่อโปรตีนเท่ากับ 1: 2.6 และ 1:1.25 ตามลำดับ และเมื่อทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl ultracentrifugation ภายหลังจากทำการตรวจวัดปริมาณ โปรตีน, s-GAG และ SDS-PAGE electrophoresis พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์สารคอนตรอยติน ซัลเฟต โปรตีนโอกลัยแคน ได้ในชั้น A<sub>1</sub> และ A<sub>2</sub> fraction (รูปที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักเปียกของชิ้นกระดูกและน้ำหนักแห้งสารสกัดกระดูกที่สกัดได้

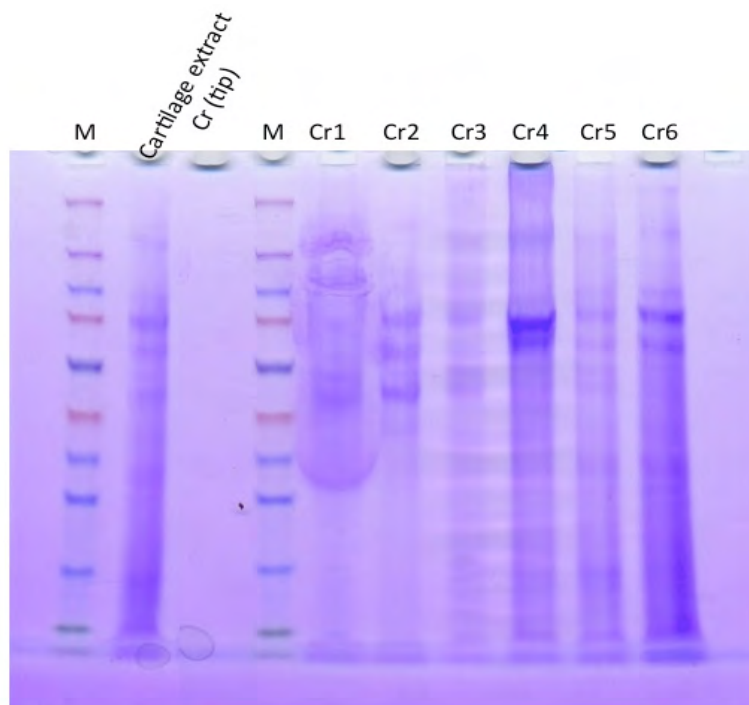
| Sample                         | Wet weight<br>(gram) | Cartilage extract<br>Dry weight (mg) |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Cartilage (Tip)                | 4                    | 124                                  |
| Mineralized cartilage (Top)    | 20                   | 587                                  |
| Mineralized cartilage (Middle) | 40                   | 662                                  |
| Mineralized cartilage (Bottom) | 24                   | 187                                  |

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักแห้งส่วนต่างๆ ของกระดูกอ่อนส่วนยอด (Cartilage, tip) ที่แยกได้ภายหลังการแยกบริสุทธิ์ด้วย CsCl Ultracentrifugation รวมถึงปริมาณโปรตีนและ กลัยโคซามิโนกลัยแคน

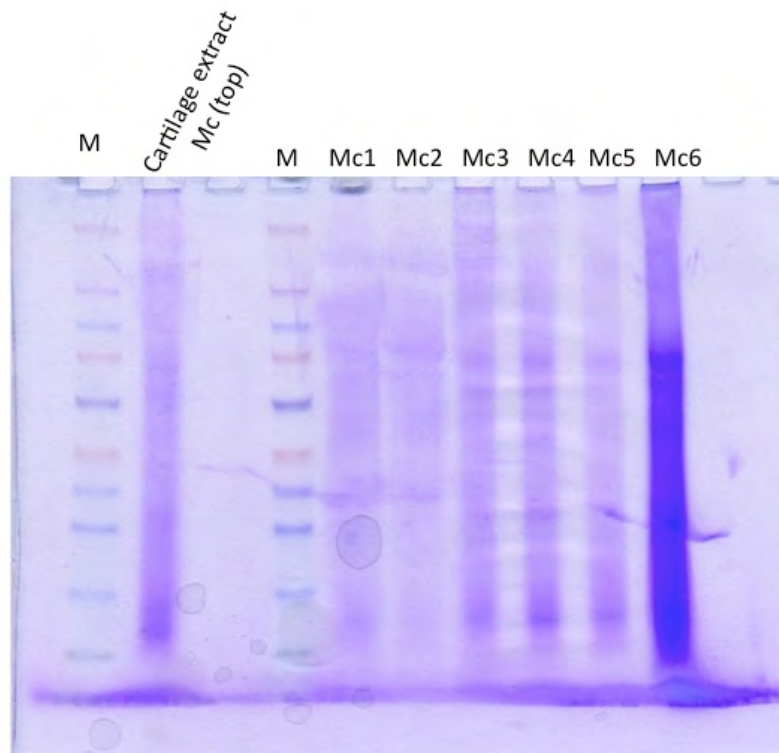
| Fraction | Dry weight (mg) | Total protein<br>( $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ ) | S-GAG<br>( $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ ) |
|----------|-----------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Cr total | 4.4             | 263.5                                           | 28.1                                    |
| Cr1      | 12.0            | 94.1                                            | 29.6                                    |
| Cr2      | 4.0             | 64.1                                            | 30.4                                    |
| Cr3      | 3.0             | 124.1                                           | 30.0                                    |
| Cr4      | 3.9             | 215.6                                           | 24.7                                    |
| Cr5      | 3.3             | 264.1                                           | 16.7                                    |
| Cr6      | 3.0             | 442.7                                           | 13.7                                    |

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักแห้งส่วนต่างๆ ของกระดูกอ่อนส่วน mineralized cartilage (top) ที่แยกได้ภายหลังการแยกบริสุทธิ์ด้วย CsCl Ultracentrifugation รวมถึงปริมาณโปรตีนและกลัยโคซามิโนไกลัยแคนที่เป็นองค์ประกอบ

| Fraction | Dry weight (mg) | Total protein ( $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ ) | S-GAG ( $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ ) |
|----------|-----------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| Mc total | 13.0            | 124.2                                        | 33.0                                 |
| Mc1      | 52.0            | 42.1                                         | 33.0                                 |
| Mc2      | 52.0            | 41.4                                         | 33.6                                 |
| Mc3      | 8.0             | 102.1                                        | 29.3                                 |
| Mc4      | 8.0             | 187.1                                        | 21.7                                 |
| Mc5      | 12.0            | 419.9                                        | 17.6                                 |
| Mc6      | 287.0           | 139.9                                        | 16.8                                 |

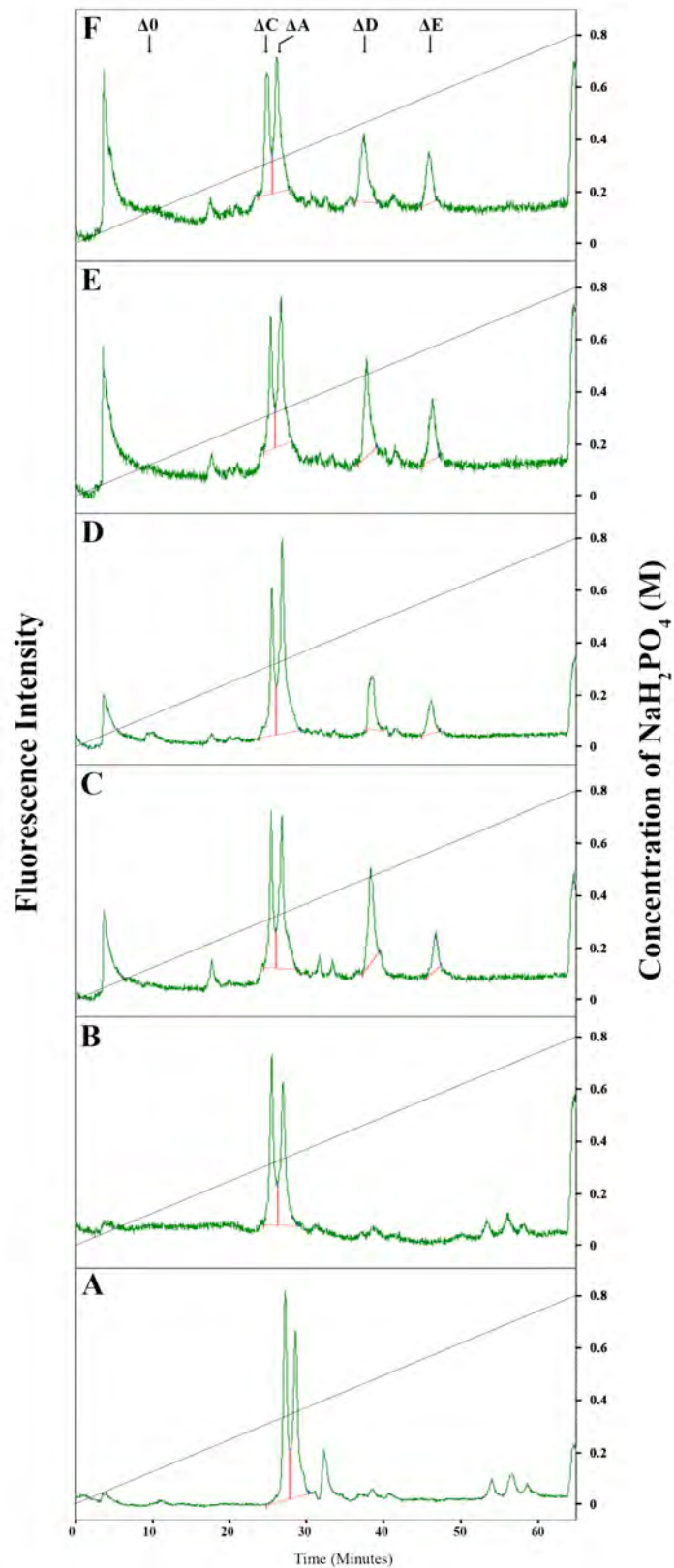


รูปที่ 4 แสดง 4-20% gradient SDS-PAGE ที่ย้อมโปรตีนด้วยสี coomassie blue ของ cartilage: Cr (tip) ที่แยกได้ ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl ultracentrifugation

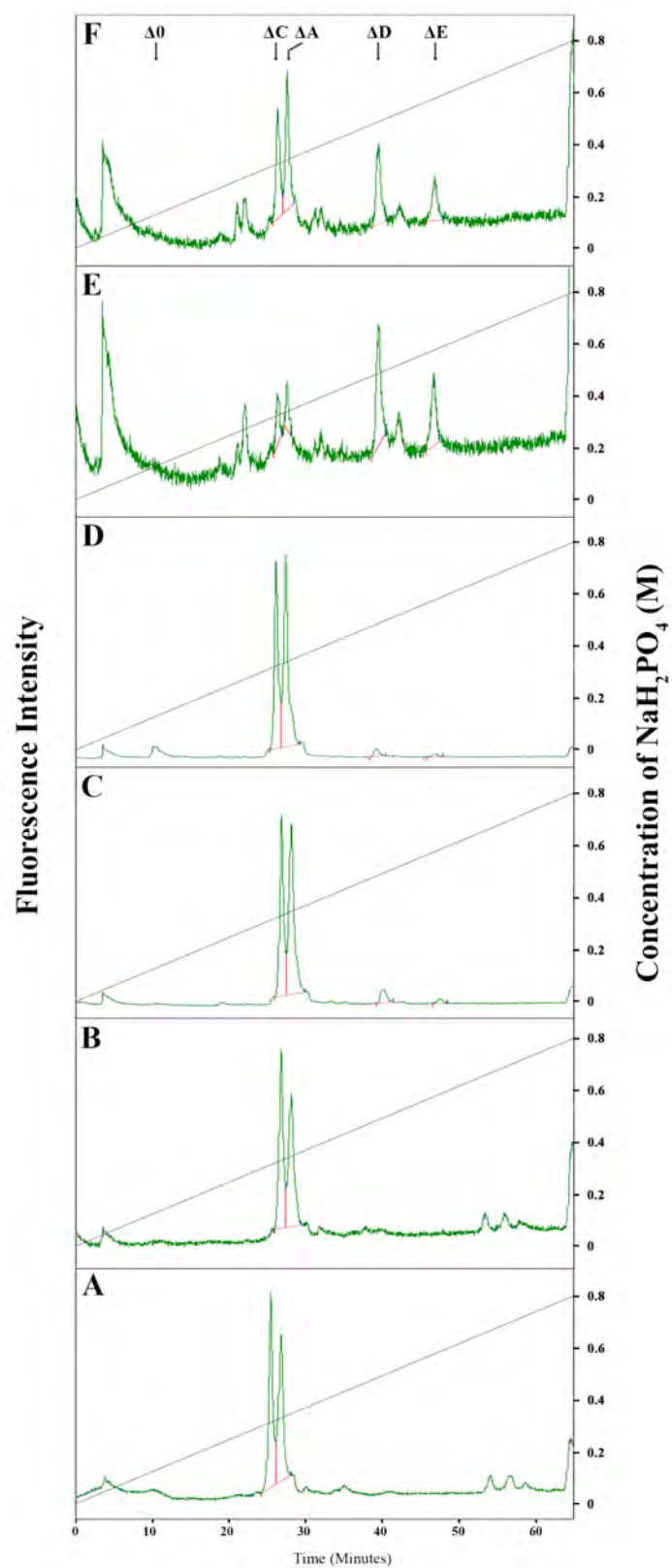


รูปที่ 5 แสดง 4-20% gradient SDS-PAGE ที่ย้อมโปรตีนด้วยสี coomassie blue ของ mineralized cartilage: Mc (top) ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl ultracentrifugation

**การหองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ของคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคารไรด์**  
 เมื่อทำการแยกสกัดกลัยโคซามิโนกลัยแคนจากกระดูกอ่อนโดยวิธี  $\beta$ -elimination, anion phase spin column และวิเคราะห์ต่อด้วย amino bound column HPLC สามารถคำนวณปริมาณของ กลัยโคซามิโนกลัยแคน และทำการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์และน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบได้ ดังแสดงในรูปที่ 6-7 และตารางที่ 4



รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของสาย คอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคารไรด์ ที่แยกได้จากสารสกัดกระดูกอ่อนเขากวาง Cartilagenous tip (Cr) ในชั้นสกัด Cr1-Cr6 (A-E)

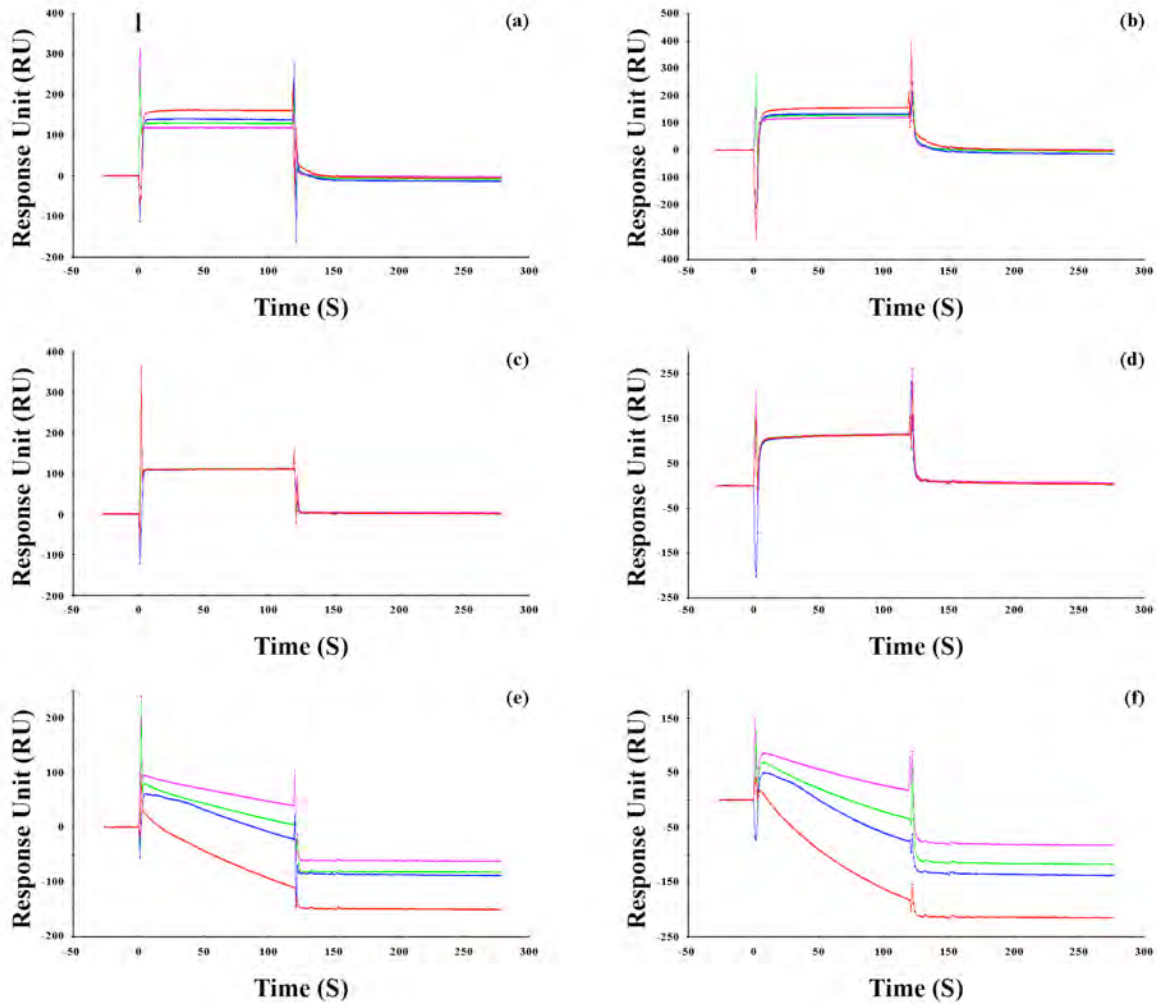


รูปที่ 7 แสดงโครมาโตแกรมของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของสาย คอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรต์ ที่แยกได้จากสารสกัดกระดูกอ่อนเขากวาง mineralized cartilage (Mc) ในชั้นสกัด MC1-MC6 (A-E)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ ของสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์ ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง Cr, และ MC

| Fraction | Unsaturated disaccharide |            |            |            |            |            |
|----------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|          | $\Delta 0$               | $\Delta C$ | $\Delta A$ | $\Delta D$ | $\Delta B$ | $\Delta E$ |
| Cr1      | -                        | 50.8       | 49.2       | -          | -          | -          |
| Cr2      | -                        | 49.7       | 50.3       | -          | -          | -          |
| Cr3      | -                        | 27.0       | 39.6       | 24.1       | -          | 9.3        |
| Cr4      | -                        | 28.2       | 49.2       | 13.9       | -          | 8.7        |
| Cr5      | -                        | 23.5       | 35.5       | 25.0       | -          | 16.0       |
| Cr6      | -                        | 25.3       | 38.6       | 22.5       | -          | 13.6       |
|          |                          |            |            |            |            |            |
| MC1      | -                        | 53.6       | 46.4       | -          | -          | -          |
| MC2      | -                        | 51.7       | 48.3       | -          | -          | -          |
| MC3      | -                        | 41.9       | 51.9       | 4.7        | -          | 1.5        |
| MC4      | -                        | 41.4       | 54.7       | 2.7        | -          | 1.2        |
| MC5      | -                        | 11.9       | 11.3       | 47.4       | -          | 29.4       |
| MC6      | -                        | 25.1       | 33.6       | 26.4       | -          | 14.9       |

ในการทำ interaction assay ระหว่างสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอ่อน เขากวางส่วน Cr และ Mc fraction จะถูกนำมาทดสอบกับ growth factors ที่มีรายงานว่าสามารถจับได้กับสายคอนดรอยติน ซัลเฟตได้ ในการทดลองนี้ได้นำ growth factor ชนิด FGF (fibroblast growth factor) , EGF (Epidermal growth factor), NGF (Neurotrophin growth factor มาทดสอบ และจากการทดสอบโดย BIAcore™ 2000 system พบว่ามีเพียง FGF เท่านั้นที่สามารถจับได้กับสายคอนดรอยติน ซัลเฟต ของสารสกัดกระดูก Cr1 ได้ ส่วนสารสกัดในชั้น Mc1 ไม่สามารถจับกับ growth factor ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยมีค่า  $K_d = 20$  nM ดังแสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 8 Sensorgrams แสดงการจับกันของ FGF (a,b), EGF (c,d) หรือ NGF (e,f) กับ immobilized biotinylated CS (Cr1; รูปด้านซ้าย, MC1 รูปด้านขวา) โดยทำการฉีด growth factors ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ ; 5  $\mu\text{g/ml}$  (สีชมพู), 15  $\mu\text{g/ml}$  (สีเขียว), 25  $\mu\text{g/ml}$  (สีฟ้า) or 35  $\mu\text{g/ml}$  (สีแดง) เข้าไปให้จับกับ biotinylated CS-immobilized SA sensor chip : RU คือ resonance units ตำแหน่งลูกศรชี้คือ การเริ่มต้นของ association ระหว่าง CS oligosaccharide กับ growth factors

ตารางที่ 5 Kinetic parameters ของการจับกันได้ระหว่าง growth factors กับ biotinylated CS.

| Growth Factors | Biotinylated CS | $k_a$                       | $k_d$                          | $K_d$ |
|----------------|-----------------|-----------------------------|--------------------------------|-------|
|                |                 | $M^{-1} s^{-1}$             | $s^{-1}$                       | $nM$  |
| FGF1           | Cr1             | $(4.9 \pm 3.2) \times 10^2$ | $(1.0 \pm 0.0) \times 10^{-5}$ | 20    |
|                | MC1             | n/a                         | n/a                            | n/a   |
| EGF            | Cr1             | n/a                         | n/a                            | n/a   |
|                | MC1             | n/a                         | n/a                            | n/a   |
| NGF            | Cr1             | n/a                         | n/a                            | n/a   |
|                | MC1             | n/a                         | n/a                            | n/a   |

The  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_d$  values were determined using a 1:1 binding model with mass transfer as described under "Experimental Procedures". The values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three or more different concentrations.

### 3. ฤทธิ์ในการป้องกันการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน

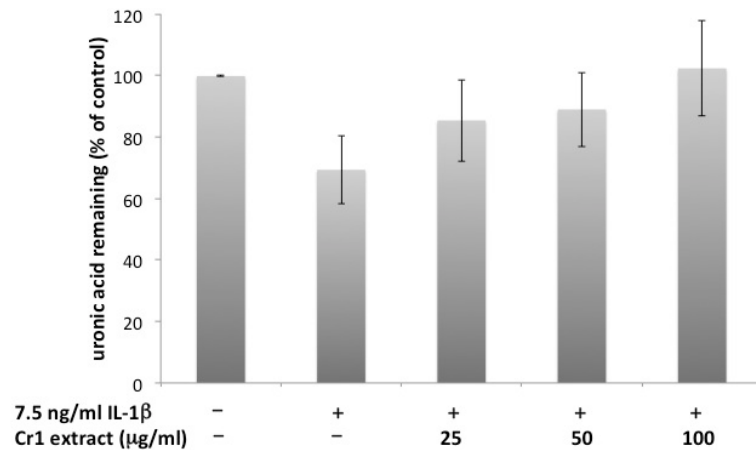
สภาวะการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน สามารถจำลองได้ในหลอดทดลองโดยการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) ชนิด อินเตอร์ลิวคิน เบต้า วัน (interleukin  $\beta$ -1) โดยสารนี้จะกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนหลั่งเอนไซม์ matrix metalloproteinase เร่งการการสลายของสารชีวโมเลกุลนอกเซลล์ในกระดูกอ่อนทำให้ตรวจพบ โมเลกุลของไฮยาลูโรแนนและโปรตีโอกลัยแคนออกมาในน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อนเพิ่มมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติและพบปริมาณของกรดยูโรนิกในขึ้น กระดูกอ่อนน้อยลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ

สารที่มีฤทธิ์ป้องกันการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน จะต้องมียุทธในการหยุดยั้งกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในภาวะดังกล่าว โดยเมื่อทำการกระตุ้นพร้อมกับ IL-1 $\beta$  จะต้อง สามารถลดการหลั่งของไฮยาลูโรแนน และ โปรตีโอกลัยแคน ออกมาในน้ำเลี้ยงกระดูกและ สามารถที่จะรักษาปริมาณของกรดยูโรนิกให้คงอยู่ในขึ้นกระดูกได้

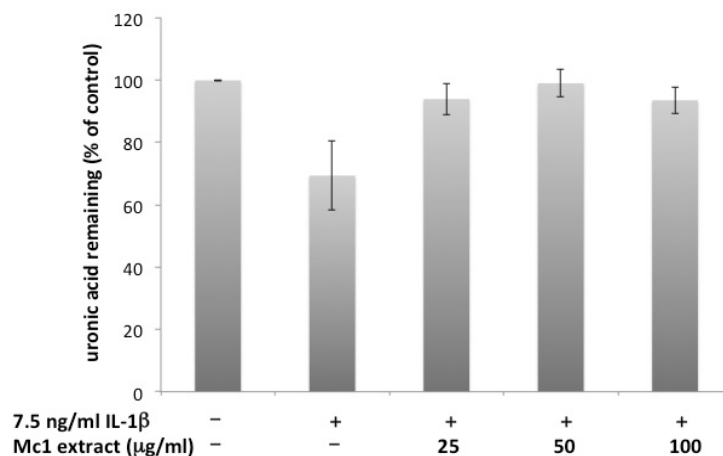
ในการทดลองนี้จึงได้นำคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวางมาทดสอบ ในสภาวะจำลองดังกล่าวโดยพบว่าคอนดรอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคารไรด์ ที่สกัดได้จาก กระดูกอ่อนเขากวาง Cr1 มีฤทธิ์ในการต้านการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจึงทำให้สามารถ การรักษาระดับการคงอยู่ของกรดยูโรนิก ในขึ้นกระดูกอ่อนไว้ได้แม้จะอยู่ในภาวะที่มีสารกระตุ้นการสลายกระดูกอ่อนก็ตาม

กลัยโคซามิโนไกลแคนซัลเฟต เป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีโอกลัยแคนซึ่งอยู่ใน เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เช่น aggrecan มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของกระดูกอ่อนข้อต่อ หากถูกทำลายหลุดออกจากเนื้อเยื่อ

จะทำให้เกิดโรคข้อเสื่อม ในการทดลองนี้ สาร IL-1 $\beta$  สามารถกระตุ้นการสลายสารกลัยโคซามิโนกลัยแคนซัลเฟตจากกระดูกอ่อนได้มาก จึงพบสารนี้ในน้ำเลี้ยงปริมาณมากเมื่อเทียบกับ control แต่เมื่อใส่สารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จาก Cr1 และ Mc1 ลงไปพร้อมกับสารกระตุ้น (IL-1 $\beta$ ) พบว่าจะช่วยต้านฤทธิ์ของสารกระตุ้นในการสลายกลัยโคซามิโนกลัยแคนซัลเฟตออกจากเนื้อกระดูกอ่อน จึงพบปริมาณกลัยโคซามิโนกลัยแคนซัลเฟตในน้ำเลี้ยงน้อยลงกว่ากลุ่มที่มีเฉพาะสารกระตุ้น (IL-1 $\beta$ )

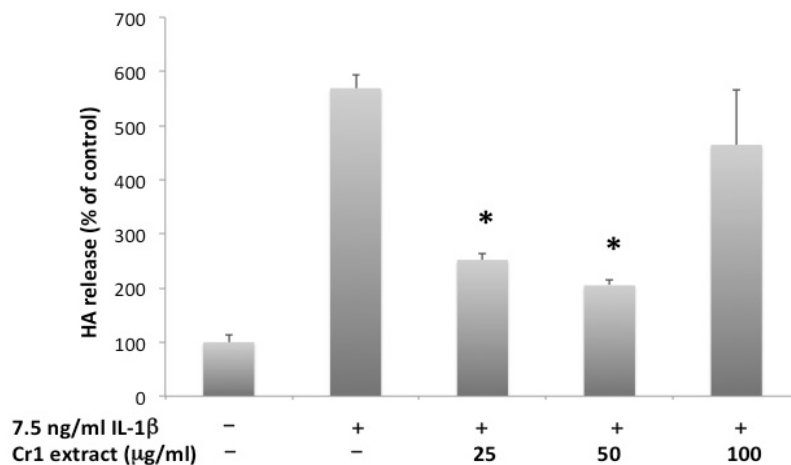


รูปที่ 9 แสดงปริมาณกรดยูโรนิกที่คงเหลือในชั้นกระดูกในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียว และภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  รวมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu$ g/ml

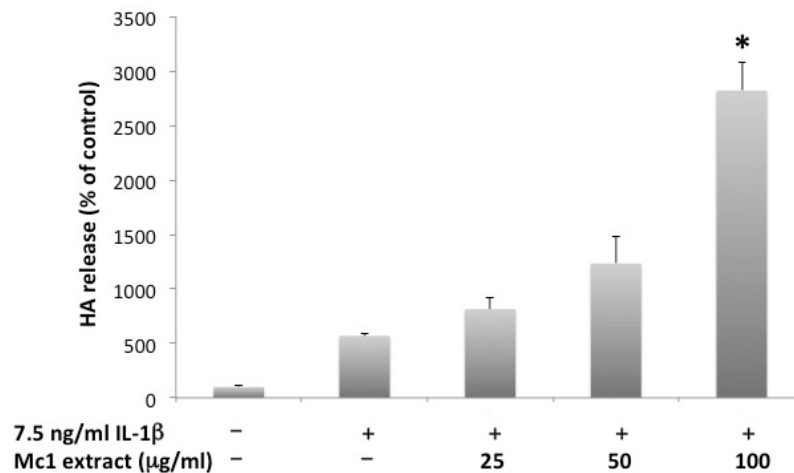


รูปที่ 10 แสดงปริมาณกรดยูโรนิกที่คงเหลือในชั้นกระดูกในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียว และภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  รวมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Mc1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu$ g/ml

ไฮยาลูโรแนน (HA) เป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน มีความสำคัญต่อการ ทำหน้าที่ของกระดูกอ่อนข้อต่อ หากถูกทำลายหลุดออกจากเนื้อเยื่อจะทำให้เกิดโรคข้อเสื่อม ในการทดลองนี้ สาร IL-1 $\beta$  สามารถกระตุ้นการสลายสารไฮยาลูโรแนนจากกระดูกอ่อนได้มาก จึงพบสารนี้ในน้ำเลี้ยงปริมาณมากเมื่อเทียบกับ control แต่เมื่อใส่สารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อน Cr1 ในช่วงความเข้มข้นน้อย 25-50  $\mu\text{g/ml}$  (รูปที่ 11 ) ลงไปร่วมกับสารกระตุ้น (IL-1 $\beta$ ) พบว่าจะช่วยต้านฤทธิ์ของสารกระตุ้นในการสลายไฮยาลูโรแนนออกจากเนื้อกระดูกอ่อน จึงพบปริมาณไฮยาลูโรแนนในน้ำเลี้ยงน้อยลงกว่ากลุ่มที่มีเฉพาะสารกระตุ้น (IL-1 $\beta$ ) ส่วนการกระตุ้นสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อน Cr1 ในช่วงความเข้มข้นสูง (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ร่วมกับ IL-1 $\beta$  พบมีปริมาณไฮยาลูโรแนนถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงมากขึ้น ซึ่งผลนี้น่าจะเป็นผลของสารคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่เร่งการผลิตไฮยาลูโรแนนและหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 11) สารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อน Mc1 พบว่าเมื่อใส่ร่วมกับสารกระตุ้น IL-1 $\beta$  สามารถกระตุ้นให้มีการผลิตไฮยาลูโรแนนออกและหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงได้โดยมีระดับสูงขึ้นตามเข้มข้น (รูปที่ 12) ซึ่งเป็นผลของสารคอนดรอยติน ซัลเฟต ในชั้น Mc1 ที่เร่งการผลิตไฮยาลูโรแนนและหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยง

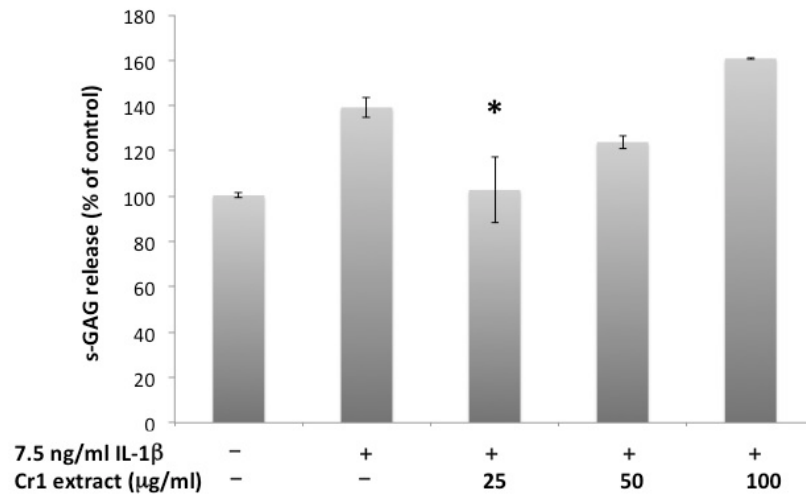


รูปที่ 11 แสดงปริมาณไฮยาลูโรแนนที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g/ml}$

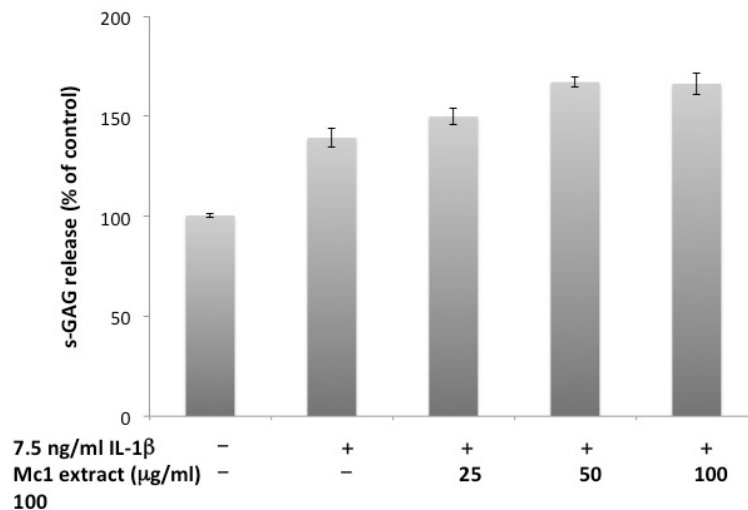


รูปที่ 12 แสดงปริมาณไฮยาลูโรแนนที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียง อย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ชัลเฟต Mc1 ที่ความเข้มข้น 25-100 µg/ml

กลัยโคซามิโนไกลแคนชัลเฟต เป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีโอไกลัยแคนซึ่งอยู่ใน เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เช่น aggrecan มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของกระดูกอ่อนข้อต่อ หากถูกทำลายหลุดออกจากเนื้อเยื่อ จะทำให้เกิดโรคข้อเสื่อม ในการทดลองนี้ สาร IL-1 $\beta$  สามารถกระตุ้นการสลายสารกลัยโคซามิโนไกลแคนชัลเฟตจากกระดูกอ่อนได้มาก จึงพบสารนี้ในน้ำเลี้ยงปริมาณมากเมื่อเทียบกับ control แต่เมื่อใส่ สารสกัดคอนดรอยติน ชัลเฟต ที่สกัดได้จาก Cr1 และ Mc1 ลงไปร่วมกับสารกระตุ้น (IL-1 $\beta$ ) พบว่าจะช่วยต้านฤทธิ์ของสารกระตุ้นในการสลายกลัยโคซามิโนไกลแคน ชัลเฟตออกจาก เนื้อกระดูกอ่อน จึงพบปริมาณกลัยโคซามิโนไกลแคนชัลเฟตในน้ำเลี้ยงน้อยลงกว่ากลุ่มที่มีเฉพาะสาร กระตุ้น (IL-1 $\beta$ ) สารสกัดคอนดรอยติน ชัลเฟต ที่ได้จาก Cr1 ในความเข้มข้นน้อย (25-50 mg/ml) สามารถที่จะลดระดับการเสื่อมสลายของกลัยโคซามิโนไกลแคนจากชั้นกระดูกได้ ดังแสดงในรูปที่ 19 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปที่ 100 µg/ml พบว่าเพิ่มระดับของสารกลัยโคซามิโนไกลแคน ชัลเฟต ในน้ำเลี้ยง ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากสารคอนดรอยติน ชัลเฟต เองมีผลกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนในชั้น กระดูกผลิตสาร ดังกล่าวเพิ่มขึ้น ในส่วนของคอนดรอยติน ชัลเฟต ที่สกัดได้จาก Mc1 ก็เช่นเดียวกัน พบว่าสามารถที่จะเพิ่มระดับของกลัยโคซามิโนไกลแคน ชัลเฟต ได้ตามระดับความเข้มข้น (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 แสดงปริมาณกลัยโคซามิโนกลัยแคน (sulfated glycosaminoglycan: s-GAG) ที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้น ด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu$ g/ml

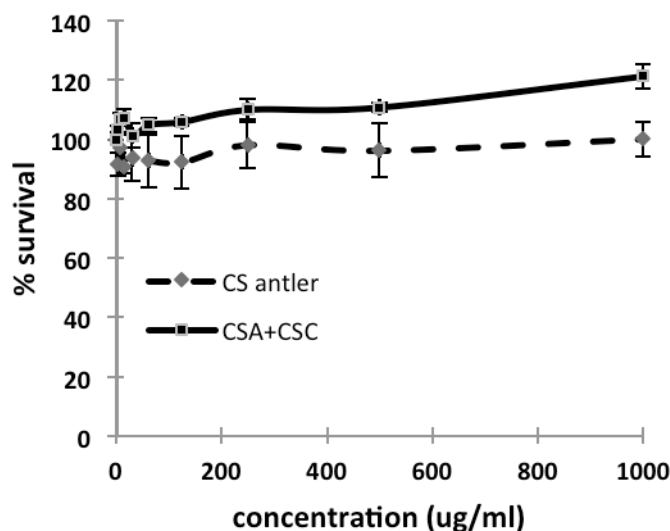


รูปที่ 14 แสดงปริมาณกลัยโคซามิโนกลัยแคน (sulfated glycosaminoglycan: s-GAG) ที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวและภาวะที่ถูกกระตุ้น ด้วย IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต Cr1 ที่ความเข้มข้น 25-100  $\mu$ g/ml

เมื่อพิจารณาทั้งหมดจะพบว่า สารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวางชั้น Cr1 และ Mc1 สามารถที่จะลดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ได้ โดยพิจารณาจากการที่สามารถจะต้านการทำลายและทำให้มีปริมาณกรดยูโรนิก คงเหลืออยู่ในกระดูกได้ในความเข้มข้นน้อย (25-50  $\mu\text{g/ml}$ ) ของ Cr1 จะเห็นว่ามีฤทธิ์ต้านฤทธิ์ของ IL-1 $\beta$  แต่ในความเข้มข้นสูง พบว่าสามารถที่จะส่งเสริมการสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในกระดูกทั้งในส่วนของไฮยาลูโรแนน และกลัยโคซามิโนไกลัยแคน ซัลเฟต นอกจากนั้น สารคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จาก Mc1 พบว่า สามารถที่จะเพิ่มการผลิตไฮยาลูโรแนน และ กลัยโคซามิโนไกลัยแคน ซัลเฟต ในทุกความเข้มข้น (25-50  $\mu\text{g/ml}$ )

#### 4. ฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างกระดูก

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก hFOB 1.19 ของสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง พบว่า สารสกัดของกระดูกอ่อน (crude extract) ที่ความเข้มข้น 3.19-1000  $\mu\text{g/ml}$  ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 14

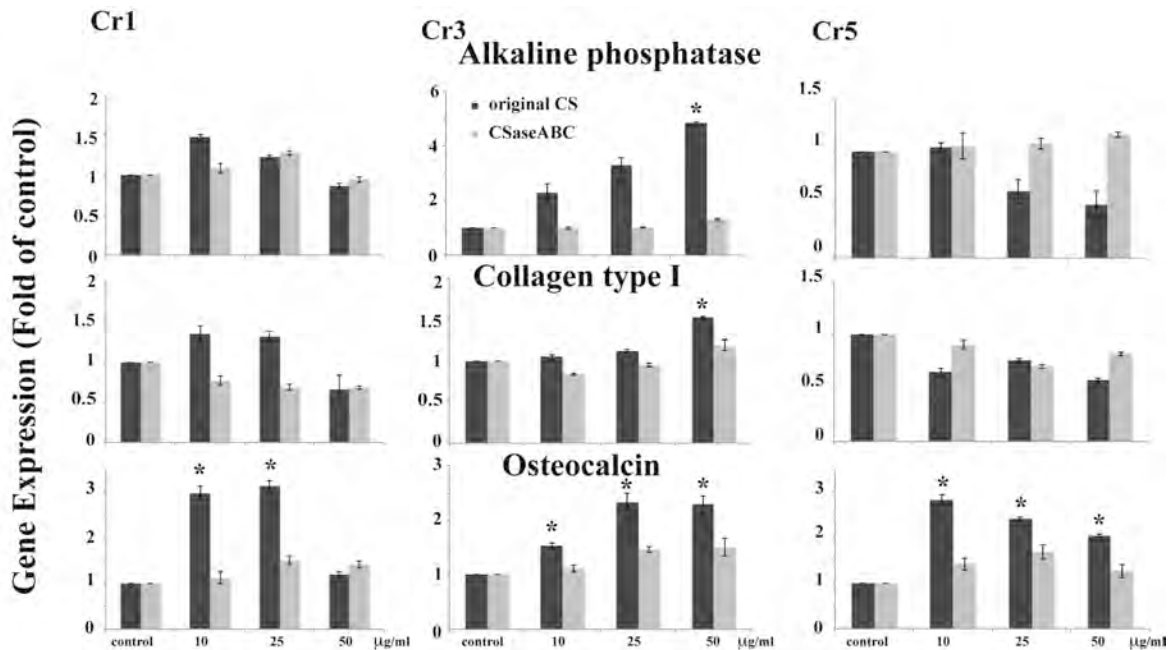


รูปที่ 15 แสดงร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก hFOB1.19 เมื่ออยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อนเขากวาง ที่ความเข้มข้น 3.19 -1000  $\mu\text{g/ml}$

เนื่องจากสารสกัดในแต่ละ fraction มีปริมาณน้อย จึงได้ทำการเลือกทดสอบกับสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่มีปริมาณมากก่อน โดยได้เลือกชั้น Cr1, Cr3 และ Cr5 เป็นตัวแทน มาทำการทดสอบในฤทธิ์กระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกอ่อน ได้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 10-50  $\text{mg/ml}$  พบว่า ในคอนดรอยติน ซัลเฟต ในชั้นสกัด Cr3 มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกให้มีการเพิ่ม การแสดงออกของยีน alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อกระดูก ในขั้นตอน mineralization ,

collagen type I ที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้างของกระดูก และ osteocalcin ซึ่งเป็นโปรตีนเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างของกระดูก มีความจำเพาะกับ hydroxyapatite อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อทำการทำลายสายโพลีเมอร์โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC ซึ่งจะทำลายสายโกลิโกแซคคาร์ไรต์ ให้ได้น้ำตาลสายคู่ พบว่าฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีนของคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จาก Cr5 นั้นหายไป ส่วนสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต จาก Cr1 และ Cr5 ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน ดังกล่าว อย่างมีนัยสำคัญ

หากพิจารณาถึงน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบพบว่า Cr3 มี oversulfated chondroitin sulfate ชนิด CSD และ CSE เพิ่มมาจาก common monosulfated chondroitin sulfate ที่มีอยู่ใน Cr1 และมีความแตกต่างจาก Cr5 ที่มีปริมาณของ CSE น้อยกว่าครึ่งหนึ่ง แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ดังกล่าวขึ้นกับ โครงสร้างคอน ดรอยติน ซัลเฟต ที่จะต้องเป็นโพลีเมอร์ และมีการเรียงตัวที่จำเพาะ และขึ้นกับ สัดส่วนของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบของ สารโพลีเมอร์นั้น ที่จะต้องมีทั้ง CSA, CSC, CSD และ CSE ในอัตราส่วนที่เหมาะสม



รูปที่ 16 ภาพแสดงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก ของเซลล์สร้างกระดูก hFOB 1.19 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อน เขากวาง Cr ในชั้น Cr 1, Cr3 และ Cr5 และสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่ถูกย่อยด้วย เอนไซม์ chondroitinase ABC

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

กระดูกอ่อนเขากวางพันธุ์ รูซ่า (*Cervus Timorensis*) ในการทดลองครั้งนี้ จากแยกจากเขากออกมาเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นกระดูกอ่อน ที่อยู่ด้านปลายสุด (cartilagenous tip: Cr) และ ส่วนถัดลงมาที่เริ่มมีการ mineralization แล้ว (mineralized cartilage: Mc) โดยการสกัดด้วย 4M GuHCl และ CSCI gradient ultracentrifugation สามารถแยกโปรตีนโกลัยแคน ออกได้เป็นสามส่วนตาม ความหนาแน่นของโมเลกุล โดยแยกจากชั้นล่างสุดที่มีความหนาแน่นมากที่สุดจนถึงชั้นบนสุดที่มีความหนาแน่นน้อยที่สุด ได้เป็น 6 ชั้น ในส่วนของกระดูกอ่อน ให้ชื่อเป็น Cr1 ถึง Cr6 ในส่วนของ mineralized cartilage ให้ชื่อเป็น Mc1-Mc6 โปรตีนโกลัยแคนที่ได้จะถูกนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อเพื่อให้ได้สายคอนดรอยติน ซัลเฟต โดยวิธีการย่อยโปรตีน ด้วยเอนไซม์ papain และแยกเอาสายคอนดรอยติน ซัลเฟตออกมาจากโปรตีน โดยวิธี  $\beta$ -elimination จากนั้นทำการแยกโดยใช้ C18 และ anion exchanged spin column คอนดรอยติน ซัลเฟตที่สกัดได้ จะถูกนำมาหาค่าองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 2-AB และการวิเคราะห์โดย HPLC พบว่า น้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบของชั้นที่มีความหนาแน่นมากจาก ultracentrifugation (Cr1, Cr2, Mc1 และ Mc2) พบชนิด CSA [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4-O-Sulfate)] และ CSC [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(6-O-Sulfate)] ในอัตราส่วน 1:1 ทั้งในส่วนของ Cr และ Mc ซึ่งตรงกับการทดลองก่อนหน้านี้ (Sunwoo HH et al., 2000) นอกจากนั้นการศึกษานี้ได้รายงานการพบ CSD [GlcA(2S)  $\beta$ 1-3GalNAc(6S)] และ CS-E [GlcA $\beta$ 1-3GalNAc (4S, 6S)] เป็นครั้งแรก โดยพบในชั้นที่มีความหนาแน่นปานกลางถึงความหนาแน่นต่ำ (Cr3-Cr6 และ Mc3-Mc6)

ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วนย่อย คือ

- 1) การศึกษาถึงการจับกัน ได้ของสารสกัดคอนดรอยติน ซัลเฟต กับ growth factor ที่มีบทบาทในการเจริญ (proliferation) และการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และ เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ซึ่งได้แก่ EGF, FGF และ NGF โดย BIACORE system พบว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต ของ Cr และ Mc สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ FGF ซึ่งเป็น growth factor ที่สำคัญในการพัฒนาของ กระดูกอ่อน (cartilage) และกระดูกแข็ง (bone)
- 2) เนื่องจากมีการใช้สารสกัดกระดูกเขากวางอ่อนในทางการค้า และมีการอ้างคุณสมบัติในการเสริมสร้างความแข็งแรงของกระดูกและกระดูกอ่อนได้ จึงได้ทำการทดสอบคุณสมบัติในการป้องกันกระดูกอ่อน (chondroprotective effects) ในชั้นกระดูกอ่อนที่สกัดได้จากเท้าหมู พบว่า สารสกัด Cr และ Mc มีฤทธิ์ในการต้านการทำลายกระดูกอ่อนโดย IL-1 $\beta$  ได้ โดยสามารถที่จะลดการสลายกรดยูโรนิกออกจากชั้นกระดูก และลดการหลั่งกลัยโคซามิโนกลัยแคน และไฮยาลูโรแนน ที่ออกมาในน้ำเลี้ยงได้ นอกจากนั้นในความเข้มข้นสูง (50-100 mg/ml) ยังพบคุณสมบัติการกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนในชั้นกระดูกให้เพิ่มการสร้างกลัยโคซามิโนกลัยแคนและหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงด้วย ซึ่งคุณสมบัตินี้ควรจะได้รับการศึกษาต่อไป
- 3) เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณน้อยไม่สามารถนำมาศึกษาได้ทุกส่วน จึงได้เลือกนำสารสกัดที่ได้จากส่วนที่เป็นกระดูกอ่อน (Cr) มาทำการศึกษา โดยได้เลือกเอา Cr1, Cr3 และ Cr5 ซึ่งเป็นตัวแทนและมียีนองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่แตกต่างกัน นำมาศึกษาคุณสมบัติในการสร้างกระดูก (osteogenic property) ในเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ชนิด hFOB1.19 โดยนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์

ดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10-25  $\mu\text{g/ml}$ ) พบว่า Cr3 สามารถที่จะเพิ่มระดับของ mRNA ของ alkaline phosphatase, collagen type I และ osteocalcin ตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (dose dependent manner) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในคุณสมบัตินี้จะหายไป เมื่อทำการย่อยสารโพลีเมอร์ด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC ในขณะที่ Cr1 และ Cr5 ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้สามารถอนุมานได้ว่า คุณสมบัติในการเพิ่มการแสดงออกของ ยีนที่จำเพาะ กับเซลล์สร้างกระดูกของสายคอนดรอยติน ชัลเฟต นั้นจะต้องขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลที่จะต้อง เป็นสายยาว ร่วมกับองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ และการจัดเรียงตัวที่เฉพาะ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของสายคอนดรอยติน ชัลเฟต ในการแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพ

ผลศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวภาพทั้งหมดพบว่า คอนดรอยติน ชัลเฟต โอลิโกแซคคาร์ไรด์ ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนเขากวาง มีสมบัติป้องกันการทำลายของกระดูกอ่อนและส่งเสริมการพัฒนาการของกระดูกแข็ง จึงมีแนวโน้มในการพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกอ่อนและข้อได้ การศึกษาต่อไป ควรจะมีการแยกบริสุทธิ์คอนดรอยติน ชัลเฟต ในแต่ละชั้นสกัดของ ultracentrifugation ให้มากขึ้น โดยการแยกตามขนาดความยาวของสายโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และความเป็นประจุลบซึ่งขึ้น กับ องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบ เพื่อให้ได้คอนดรอยติน ชัลเฟต ที่มีความบริสุทธิ์ (homogenous) แล้วนำมาศึกษาถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของโมเลกุลเหล่านั้น

## เอกสารอ้างอิง

- 1.Price JS, Oyajobi BO, Nalin AM, Frazer A, Russell RG, Sandell LJ. Chondrogenesis in the regenerating antler tip in red deer: expression of collagen types I, IIA, IIB, and X demonstrated by in situ nucleic acid hybridization and immunocytochemistry. *Dev Dyn*. 1996;205(3):332-47.
- 2.Li C, Suttie JM. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? *Anat Embryol (Berl)*. 2001;204(5):375-88.
- 3.Sunwoo HH, Nakano T, Hudson RJ, Sim JS. Isolation, characterization and localization of glycosaminoglycans in growing antlers of wapiti (*Cervus elaphus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;120(2):273-83.
- 4.Ha YW, Jeon BT, Moon SH, Toyoda H, Toida T, Linhardt RJ, et al. Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*. *Carbohydr Res*. 2005;340(3):411-6.
- 5.Letourneau PC, Condic ML, Snow DM. Extracellular matrix and neurite outgrowth. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(4):625-34.
- 6.Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:531-70.
- 7.Yamada S, Sugahara K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr Drug Discov Technol*. 2008;5(4):289-301.
- 8.Heinegard D. Polydispersity of cartilage proteoglycans. Structural variations with size and buoyant density of the molecules. *J Biol Chem*. 1977;252(6):1980-9.
- 9.Ratcliffe A, Doherty M, Maini RN, Hardingham TE. Increased concentrations of proteoglycan components in the synovial fluids of patients with acute but not chronic joint disease. *Ann Rheum Dis*. 1988;47(10):826-32.
- 10.Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
- 11.Sugahara K, Tohno-oka R, Yamada S, Khoo KH, Morris HR, Dell A. Structural studies on the oligosaccharides isolated from bovine kidney heparan sulphate and characterization of bacterial heparitinases used as substrates. *Glycobiology*. 1994;4(4):535-44.
- 12.Yoshida K, Miyauchi S, Kikuchi H, Tawada A, Tokuyasu K. Analysis of unsaturated disaccharides from glycosaminoglycuronan by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1989;177(2):327-32.
- 13.Kinoshita A, Sugahara K. Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal Biochem*. 1999;269(2):367-78.

14. Deepa SS, Umehara Y, Higashiyama S, Itoh N, Sugahara K. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43707-16.
15. Kawashima H, Atarashi K, Hirose M, Hirose J, Yamada S, Sugahara K, et al. Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J Biol Chem.* 2002;277(15):12921-30.

**Output** จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. Manuscript ที่ได้ส่งไปตีพิมพ์ที่ วารสาร Bone

Title : Characterization of chondroitin sulfate from deer tip antler and osteogenic properties

ตั้งเอกสารแนบ

สัญญาเลขที่ TRG5180017

โครงการ: การศึกษาแยกเอกลักษณ์และคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนกลัยแคนที่สกัดได้

จากกระดูกอ่อนเขากวาง *Cervus timorensis*

แบบฟอร์มรายงานความก้าวหน้าของโครงการรอบ 24 เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้ได้รับทุน: น.ส. พิรพรรณ โปธาเจริญ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 16 มีนาคม 2552 ถึงวันที่ 15 มีนาคม 2554

รายจ่าย (งวดที่ 4)

| หมวด<br>(ตามสัญญา) | รายจ่ายสะสม<br>จากรายงาน<br>ครั้งก่อน | ค่าใช้จ่าย<br>งวดปัจจุบัน | รวมรายจ่าย<br>สะสมจนถึง<br>งวดปัจจุบัน | งบประมาณ<br>รวมทั้งโครงการ | คงเหลือ<br>(หรือเกิน) |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1. ค่าตอบแทน       | 180,000.00                            | 30,000.00                 | 210,000.00                             | 240,000.00                 | 30,000.00             |
| 2. ค่าจ้าง         | 0                                     | 0                         | 0                                      | 0                          | 0                     |
| 3. ค่าวัสดุ        | 141,128.50                            | 68,100.00                 | 209,228.50                             | 240,000.00                 | 30,771.50             |
| 4. ค่าใช้สอย       | 0                                     | 0                         | 0                                      | 0                          | 0                     |
| 5. ค่าครุภัณฑ์     | 0                                     | 0                         | 0                                      | 0                          | 0                     |
| 6. ....            | 0                                     | 0                         | 0                                      | 0                          | 0                     |
| รวม                | 321,128.50                            | 98,100.00                 | 419,228.50                             | 480,000.00                 | 60,771.50             |

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

|                     |            |     |       |          |
|---------------------|------------|-----|-------|----------|
| งวดที่ 1            | 120,000.00 | บาท | เมื่อ | 20/5/52  |
| งวดที่ 2            | 120,000.00 | บาท | เมื่อ | 20/5/52  |
| งวดที่ 3            | 90,000.00  | บาท | เมื่อ | 26/3/53  |
| งวดที่ 4            | 90,000.00  | บาท | เมื่อ | 26/3/53  |
| ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1 | 69.17      | บาท | เมื่อ | 30/6/52  |
| ดอกเบี้ย ครั้งที่ 2 | 135.89     | บาท | เมื่อ | 31/12/52 |
| ดอกเบี้ย ครั้งที่ 3 | 107.28     | บาท | เมื่อ | 30/6/53  |
| ดอกเบี้ย ครั้งที่ 4 | 66.85      | บาท | เมื่อ | 31/12/53 |

รวม

420,379.19 บาท ①

จำนวนเงินที่จ่าย

|          |          |            |       |
|----------|----------|------------|-------|
| งวดที่ 1 | เป็นเงิน | 119,706.00 | บาท   |
| งวดที่ 2 | เป็นเงิน | 80,700.00  | บาท   |
| งวดที่ 3 | เป็นเงิน | 120,722.50 | บาท   |
| งวดที่ 4 | เป็นเงิน | 98,100.00  | บาท   |
| รวม      |          | 419,228.50 | บาท ② |

จำนวนเงินคงเหลือ ① - ②

1,150.69 บาท

|                                                                                       |                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| .....<br>ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน                                            | .....<br>ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ |
| *หมายเหตุ เนื่องจากเปิดบัญชีเงินส่วนตัว 100 บาท ทำให้มียอดคงเหลือในบัญชี 1,250.69 บาท |                                         |

## **Characterization of chondroitin sulfate from deer tip antler and osteogenic properties**

Perpahan Pothacharoen\*<sup>+</sup>, Kanchanok Kodchakorn<sup>+</sup>, and Prachya Kongtawelert  
Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and Stem Cells, Department of  
Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

\*Corresponding author. Fax: +665 3894 1888.

Email address: peraphan.pothacharoen@gmail.com (P. Pothacharoen),  
tkanchanok@gmail.com (K. Kodchakorn), Prachya.kongtawelert@gmail.com (P.  
Kongtawelert).

<sup>+</sup>Equal Contribution

## **Abstract**

Deer antler is a highly regenerative tissue that involves cellular differentiation, osteogenesis and ossification processes. Chondroitin sulfate is the major glycosaminoglycan contained in antler connective tissue and has been isolated from cartilaginous antler by 4M GuHCl extraction, gradient ultracentrifugation and chromatography techniques. We examined the disaccharide composition by 2-AB labeling and anion exchange HPLC analysis of the 3 resultant fractions (high, medium and low density fractions). The high density fraction consists of CSA and CSD oligosaccharides in the ratio of 1:1, whereas, the CS disaccharide composition of medium and low density fractions are CSA (27.0%), CSC (39.6%), CSD (24.1%), CSE (9.3%) and CSA (23.5%), CSC (35.5%), CSD (25.0%), CSE (16.0%), respectively. The only intact CS oligosaccharides of the medium density fraction up-regulated gene expression of bone-specific proteins of a human osteoblastic cell line (hFOB1.19). Thus, CS oligosaccharides from cartilaginous deer antler, with their over-sulfated chondroitin sulfate composition, demonstrated the physiological properties of CS deer antler and may be good candidates for osteogenetic agents in humans.

## Introduction

Velvet antlers are the fastest growing mammalian tissue and constitute an interesting model for cartilage and bone research. Antlers develop from pedicles that appear transiently during the fetal life of calves and grow to permanent protuberances during puberty from the lateral crests of deer frontal bone (1) . They grow in length by a continuous process of cellular differentiation, from undifferentiated progenitors in the perichondrium into chondroblasts and chondrocytes (2, 3). The progenitor cells develop from the tip by a combination of intramembranous and chondrochondral ossification from the tip, involving both cellular differentiation and bone development processes.

Structurally, antler cartilage is similar to other hyaline cartilage but is highly vascularized, which accounts for the high level of metabolic processes in such a rapid regenerative tissue (4, 5). Previous studies have reported that chondroitin sulfate is major component of glycosaminoglycan contained in red deer antler (*Cervus elaphus*), whereas keratan sulfate, dermatan sulfate (6) and heparan sulfate are found in small amounts (7). Antler has been used as a Chinese traditional medicine in Asian countries and is mainly used for anti ageing effects, as well as to treat sexual dysfunction in elderly men and menopause in women. Scientific research has demonstrated pharmacological effects of deer antler in aqua-acupuncture, using the water extract (DAA; Cervi Pantotricum Cornu) for treatment of bone and joint disease (8, 9).

In cartilage and bone, cellular activity largely depends on the interaction with the components of the extracellular matrix (ECM). Also, the composition of the matrix reflects changes in the pattern of gene expression during tissue differentiation. To date,

however, only a few components of the antler ECM have been described. Collagens have been identified in antler tissue extracts (3, 10). mRNAs for collagen I, X, and both splice forms of collagen II were detected by *in situ* hybridization in the developing antler tip (4). Aggrecan and decorin were also identified by biochemical means (6). Most recently, deer antler proteome analysis has identified biglycan and desmocollin 1 and 3 (11).

Cartilage generally contains chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) that consists of one or more chondroitin sulfate (CS) chains attached to a core protein. They are increasingly implicated as important regulators of many biological processes, including the physical strength of tissues, cell adhesion, and signal transduction (12, 13). Many reports confirm that the CS-PGs of cartilage are dynamic components that play several key roles in the normal physiology of cartilage tissues and regulate biological processes such as cell migration, cytokine recognition, extracellular matrix deposition, morphogenesis, organogenesis and wound repair (14, 15). The complexity and diversity of CS structure vary with sulfation pattern, epimerization and chain length, and are usually associated with their functions. The CS chain is an unbranched repeating disaccharide consisting of an acid sugar, either glucuronic acid (GlcUA) or iduronic (IdoA), and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), which can be modified by *O*-sulfation reactions at various positions. Each chain is linked through a neutral trisaccharide (Gal-Gal-Xyl) to a serine residue in a PG. In mammals, common monosulfated CS-A plays a role in the canine ossification process (16), oversulfated CS-D and -E support neuritogenesis (17-19) and growth factor binding (20).

Antler development involves osteoblasts, progenitor cells responsible for osteogenesis and the ossification process. It thus should be of interest to analyze the CS structural details that are related to its osteogenic function. The present study focuses on the

separation, characterization and biological functions of antler CS from the cartilagenous antler tip from *Rusa* deer.

## **Materials and methods**

### **Materials**

The following sugars and enzymes were purchased from Sigma Aldrich Chemical and Co (USA): CS-C from shark cartilage, chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4) from *Proteus vulgaris*. Six unsaturated chondroitin sulfate disaccharide standards were purchased from Seikagaku Corp., Ltd. (Tokyo, Japan). Amine-bound silica PA-03 column (4.6×250 mm) was obtained from YMC Corp., Ltd. (Kyoto, Japan). The 2-aminobenzamide (2AB) and sodium cyanoborohydride (NaCNBH<sub>3</sub>) were obtained from Sigma–Aldrich Chemical Corp., Ltd. (Missouri, USA).

### **Extraction of the GAG fraction from antler cartilage**

Samples of 45-60 days after casting antler were obtained from 3 month-old male Rusa (*Cervus timorensis*). The animals were bred at Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang, Thailand. The harvested antler was skinned and macroscopically dissected out; only the tip containing cartilaginous tissue antler without bony structure was retained. The cartilaginous tip was stored at -20°C until extraction.

### **Preparation of antler CS**

The cartilaginous tip of the antler was cut into small pieces and proteoglycans were extracted with buffer containing 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 4 M guanidine HCl, 10mM EDTA, 10 mM aminocaproic acid, 10 mM *N*-ethylmaleimide, and 2 mM PMSF, and then dialyzed against distilled water. The A<sub>1</sub> fraction was purified by CsCl isopycnic centrifugation (21). After stirring overnight at 4 °C, the solution was brought to a density of 1.7 g/ml with solid CsCl. A density gradient was established by centrifugation at 48,000 rpm at 4 °C for 48 h. The gradient was partitioned into 3 fractions. The bottom fraction (A<sub>1</sub> fraction) which contained most of the aggregated aggrecan was pooled and subjected to dialyze again distilled water. Each fraction (A<sub>1</sub>-

A<sub>3</sub>) was subjected to  $\beta$ -elimination for releasing GAG polysaccharides from core proteins by 0.1 M NaBH<sub>4</sub> /0.05 M NaOH solution at 45 °C for 16 h. The resultant materials were then subjected to Pepclean™ C18 spin column (Pierce, USA) and strong anion exchange microspin column (Thermo Scientific, USA) respectively for removing hydrophobic and cationic molecules from the GAG pellet as described previously (22). Each eluted GAG mixture was dried and precipitated in 4 volumes of cold ethanol.

### **Analytical methods**

Protein was determined by the Bradford assay (23). Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard.

Glucuronic acid concentrations were determined by a colorimetric assay using cabazol reagent (24) with GlcUA as a standard. Unsaturated uronic acid was quantified spectrophotometrically based on an average millimolar absorption coefficient of 5.5 at 232 nm (25).

Sulfated glycosaminoglycan (s-GAG) was determined by the dimethylene blue (DMB) dye binding method (26). Chondroitin sulfate C from shark cartilage was used as a standard.

### **2-Aminobenzamide (2AB) derivatization**

The derivatization of CS oligosaccharide with 2AB was performed essentially as described by Bigge *et al.* (27). Briefly, 0.1- 0.5 nmol of a given oligosaccharide were lyophilized in a microcentrifuge tube. An aliquot (5 ml) of derivatization reagent mixture (0.35 M 2AB/0.1 M NaCNBH<sub>4</sub>/30% (v/v) acetic acid in dimethyl sulfoxide) was added to the oligosaccharide sample, and the mixture was incubated at 65 °C for 2h. The derivatized oligosaccharide was purified by paper chromatography using Whatman 3 MM paper in a solvent system of butanol:ethanol:water (4:1:1, v/v).

### **Disaccharide composition analysis using 2AB labeling and HPLC**

The fractions were individually incubated with 10 mIU of chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4) in a total volume of 20  $\mu$ l of 250 mM Tris-HCl buffer, pH 7.3 at 37 °C for 60 min. Each digest was labeled with a fluorophore 2AB and analyzed by anion-exchange HPLC on an amine-bound silica PA-03 column (4.6 $\times$ 250 mm; YMC Corp., Kyoto, Japan) eluted with a linear gradient of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at a flow rate of 1 ml/min at room temperature for the separation of CS disaccharides (28). Samples prepared as described above were diluted using 16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> containing 5 pmol of each oligosaccharide in 50  $\mu$ l. Eluates were monitored using a SpectraSYSTEM™ FL3000 fluorescence detector (Thermo Electron Corp.) with excitation and emission wavelengths of 330 and 420 nm, respectively. Unsaturated oligosaccharides unlabeled with 2AB were monitored by absorbance at 232 nm using 300 pmol aliquots.

### **Osteogenic gene expression**

Human osteoblastic cells (hFOB 1.19) were grown and treated with purified antler CS at various concentrations (10-50  $\mu$ g GAG/ml). Total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions (Amersham Bioscience) after 24 hr. treatment. Two  $\mu$ g of tRNA were converted to cDNA using a RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, Germany). For determination of gene expression, SYBR Green detection was used and the values were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed via a Chromo4™ Real-Time Detector System (Bio-Rad, USA) using SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, USA). Primer sequences (from Invitrogen) were as follows: Alkaline phosphatase

(NM\_001114107.2) 5'-3' CATGGC TTTGGGCAGAAGGA; Reverse 5'-3' CTAGCCCCAAAAAGAGTTGCAA: collagen type I (NM\_000088.3) 5'-3' CAGCCGCTTCACCTACAGC; Reverse 5'-3' TTTTGTATTCAATCACTGTCTT GCC: osteocalcin (NM\_199173.2) 5'-3' GAA GCCCAGCGGTGCA; Reverse 5'-3' CACTACCTCGCTGCCCTCC: GAPDH (NM\_002046.3) Forward 5'-3' GAAG GTGAAGGTCGGAGTC; Reverse 5'-3' GAAGATGGTGAT GGGATTTC. Relative expression levels for each primer set were normalized to the expression of GAPDH by the  $2^{-\Delta CT}$  method (29).

## Results

### Chondroitin sulfate in deer tip antler characterization

Cartilage extract from cartilaginous antler tip was prepared by 4 M GuHCl extraction and was isolated into 3 fractions (from bottom to top: Cr1, Cr2 and Cr3) by density gradient ultracentrifugation. The distribution of the extracted proteoglycans after density gradient centrifugation under associative conditions is shown in Table 1. The bottom fraction (Cr1) accounted for the high molecular weight molecules with the highest density and sGAG/protein ratio (0.31). The middle (Cr2) and the upper (Cr3) fractions contained lower molecular weight molecules with less s-GAG (s-GAG/protein ratio = 0.2 and 0.06, respectively). The peptide chains were papain digested and sequentially removed by alkaline treatment. The resultant glycosaminoglycans were further purified by Pepclean™ C18 and via a strong anion exchange spin column. Following the extraction protocol, 500 pmole of the chondroitin sulfate from each fraction were subjected to characterization by anion-exchange HPLC and determined by absorbance at 210 nm. as shown in Figure 2.

### Analysis of disaccharide composition of deer antler chondroitin sulfate

To further analyze the disaccharide composition of fractionated chondroitin sulfate, the chondroitin sulfate chain was exhaustively digested with chondroitinase ABC (CS'ase ABC), labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide (2AB) and analyzed by anion-exchange HPLC. The analysis for disaccharide composition is shown in Table 2 and Figure 3. The Cr1 fraction contained common monosulfated chondroitin sulfate, 55% CSA ( $\Delta^{4,5}\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc(4S)}$ ) and 45 % CSC( $\Delta^{4,5}\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc(6S)}$ ) with the CSA/CSC ratio is 1:1. Interestingly, in addition to common monosulfated disaccharide units, there were significant amounts of over-sulfated chondroitin sulfated CS-D ( $\Delta^{4,5}\text{HexA(2S)}\alpha 1\text{-3GalNAc(6S)}$ ) and CS-E ( $\Delta^{4,5}\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc}$

(4S, 6S)) found in Cr2 (24.1, 9.3%, respectively) and Cr3 (25.0, 16.0%, respectively) fractions.

### **Effects of deer antler chondroitin sulfate on the bone matrix protein marker gene expression**

The bone matrix markers (alkaline phosphatase, type I collagen and osteocalcin) gene expression was used to investigate the osteogenic activity of deer antler chondroitin sulfate. The human osteoblastic cell line (hFOB 1.19) was treated with chondroitin sulfate or chondroitinase ABC digested chondroitin sulfate from fraction Cr1-Cr3 at various conditions (10-50 mg s-GAG/ml). After 24 hr. treatment, tRNA was extracted and converted to cDNA. Quantitative real time PCR was performed to analyze mRNA expression (Figure 4). Low doses (10-25 mg/ml) of common monosulfated component in Cr1 showed significant increase only with osteocalcin mRNA at 2.9, 3.1 fold, respectively. Interestingly, alkaline phosphatase, collagen type I and osteocalcin mRNA levels significantly increased when cells were treated with chondroitin sulfate extract from Cr2 with respective increases 4.8, 1.5 and 2.3 fold at the high dose (50 µg/ml), compared with the control. In addition, the mRNA induction effects were completely abolished after exhaustive digestion with chondroitinase ABC. Chondroitin sulfate from Cr3 showed significant increase in osteocalcin mRNA level at the low dose (10-25 mg/ml).

## Discussion

In this study, we characterized and investigated the biological function of chondroitin sulfate oligosaccharide purified from rusa deer (*Cervus timorensis*) antler tip. Cartilaginous antler tip mainly contains chondroitin sulfate (6), while hyaluronan, keratin sulfate, dermatan sulfate and heparin sulfate (7) also found in smaller amounts. The highest density gradient ultracentrifugation fraction, Cr1, accounted for the most highly aggregated major proteoglycan, which was aggrecan (30), and thus contained highly sulfated glycosaminoglycan (s-GAG) (s-GAG/protein ratio = 0.31). The common monosulfate disaccharide CSA (HexA $\alpha$ 1-3GalNAc(4S)) and CSC (HexA $\alpha$ 1-3GalNAc(6S)) were detected from 2-AB labeling and HPLC analysis in a ratio of 1:1 (49.2 and 50.8%, respectively). The ratio of CSC/CSA found in antler aggrecan chondroitin sulfate is similar to that of human fetal aggrecan chondroitin sulfate, which is about 0.96 (30, 31). We report the presence of oversulfated chondroitin sulfate contained in antler cartilage for the first time. CSD (HexA(2S) $\alpha$ 1-3GalNAc(6S)) and CS-E (HexA $\alpha$ 1-3GalNAc (4S,6S)) in addition to common monosulfate chondroitin sulfate disaccharide were detected both in the middle and upper fractions after ultracentrifugation. The chondroitin sulfate disaccharide composition for Cr2 and Cr3 were CSA (27.0%), CSC (39.6%), CSD (24.1%), CSE (9.3%) and CSA (23.5%), CSC (35.5%), CSD (25.0%), CSE (16.0%), respectively. Bone matrix proteoglycans play roles in bone mineralization and calcium accumulation (32). Glycosaminoglycans in addition to proteoglycan have high affinity for hydroxyapatite (33). Chondroitin sulfate is reported to be involved in regenerative biological events such as cell proliferation (34, 35) and wound healing (35, 36). Thus, antler chondroitin sulfate may play a role in osteogenesis in antler production. The osteogenic activity of antler chondroitin sulfate in human fetal

osteoblastic cell line (hFOB 1.19) was measured by mRNA expression of the bone specific proteins alkaline phosphatase, collagen type I and osteocalcin. Among the three ultracentrifugation fractions, only Cr2 chondroitin sulfate significantly induced mRNA expression of all the above bone specific proteins.. Considering the disaccharide composition, the Cr2 fraction contained additional oversulfated chondroitin sulfate CSD and CSE units, whereas CSE accounted for only half of CSE containing Cr3. The effect was abolished by treatment with chondroitinase ABC predigested chondroitin sulfate. This finding suggests that the bone specific mRNA induction activity is dependent on the disaccharide composition and sequencing, which contributes intact chondroitin sulfate oligosaccharide rather than the individual oversulfated disaccharide content.

In conclusion, we report the presence of oversulfated chondroitin sulfate –D and –E contained in cartilaginous antler tip for the first time. The osteogenic poteintial of overulfated CS was demonstrated and may play a significant role in antlerogenesis. Because chondroitin sulfate oligosaccharides are heterogeneous regarding composition and sequence, further studies are needed concerning oversulfated chondroitn sulfate in cartilaginous antler with the goal of defining specific structures that are related to its biological functions.

## **Acknowledgement**

The Thailand Research Fund (Research Grant TRG5180017 to PP) , Faculty of Medicine Chiang Mai University and the National Research Council of Thailand jointly funded this work.

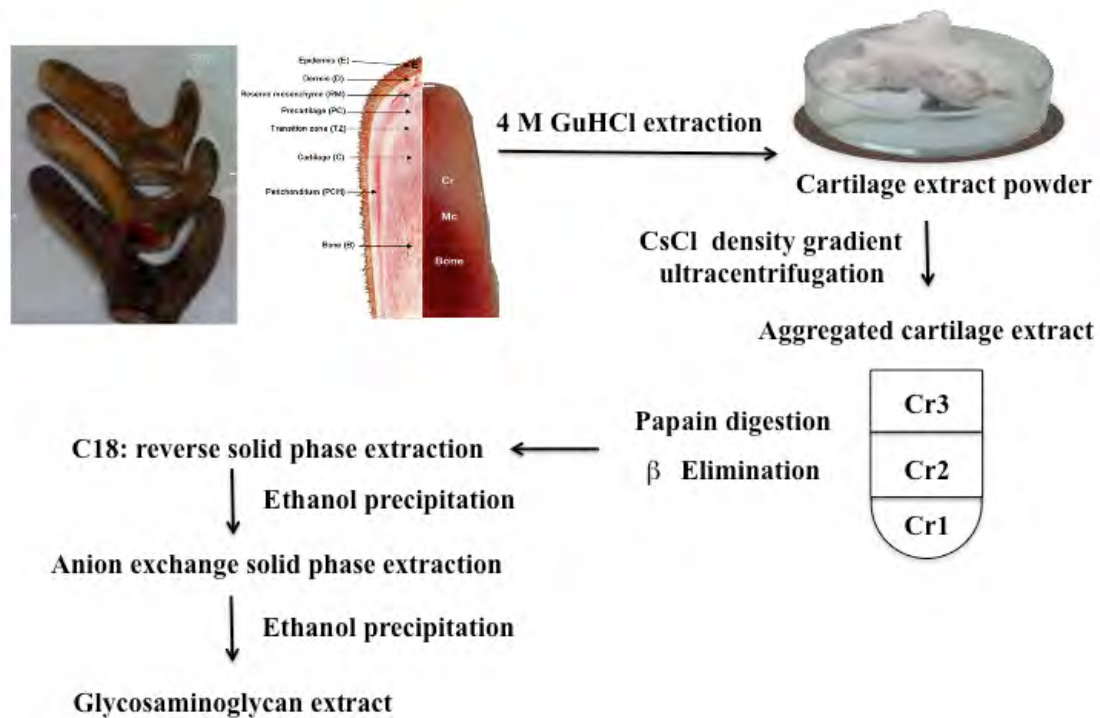
## References

1. Li C, Suttie JM. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? *Anat Embryol (Berl)*. 2001;204(5):375-88.
2. Banks WJ. The ossification process of the developing antler in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Calcif Tissue Res*. 1974;14(4):257-74.
3. Newbrey JW, Banks WJ. Ultrastructural changes associated with the mineralization of deer antler cartilage. *Am J Anat*. 1983;166(1):1-17.
4. Price JS, Oyajobi BO, Nalin AM, Frazer A, Russell RG, Sandell LJ. Chondrogenesis in the regenerating antler tip in red deer: expression of collagen types I, IIA, IIB, and X demonstrated by in situ nucleic acid hybridization and immunocytochemistry. *Dev Dyn*. 1996;205(3):332-47.
5. Fauchaux C, Nesbitt SA, Horton MA, Price JS. Cells in regenerating deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation. *J Exp Biol*. 2001;204(Pt 3):443-55.
6. Sunwoo HH, Nakano T, Hudson RJ, Sim JS. Isolation, characterization and localization of glycosaminoglycans in growing antlers of wapiti (*Cervus elaphus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;120(2):273-83.
7. Ha YW, Jeon BT, Moon SH, Toyoda H, Toida T, Linhardt RJ, et al. Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*. *Carbohydr Res*. 2005;340(3):411-6.
8. Kim KS, Choi YH, Kim KH, Lee YC, Kim CH, Moon SH, et al. Protective and anti-arthritic effects of deer antler aqua-acupuncture (DAA), inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, on phosphate ions-mediated chondrocyte apoptosis and rat collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(7):963-73.
9. Kim KH, Kim KS, Choi BJ, Chung KH, Chang YC, Lee SD, et al. Anti-bone resorption activity of deer antler aqua-acupuncture, the pilose antler of *Cervus koreanus* TEMMINCK var. *manchuricus* Swinhoe (Nokyong) in adjuvant-induced arthritic rats. *J Ethnopharmacol*. 2005;96(3):497-506.
10. Rucklidge GJ, Milne G, Bos KJ, Farquharson C, Robins SP. Deer antler does not represent a typical endochondral growth system: immunoidentification of collagen type X but little collagen type II in growing antler tissue. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1997;118(2):303-8.
11. Park HJ, Lee DH, Park SG, Lee SC, Cho S, Kim HK, et al. Proteome analysis of red deer antlers. *Proteomics*. 2004;4(11):3642-53.
12. Letourneau PC, Condit ML, Snow DM. Extracellular matrix and neurite outgrowth. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(4):625-34.
13. Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:531-70.
14. Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K, Kitagawa H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*. 2003;13(5):612-20.
15. Yamada S, Sugahara K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr Drug Discov Technol*. 2008;5(4):289-301.
16. Harab RC, Mourao PA. Increase of chondroitin 4-sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. *Biochim Biophys Acta*. 1989;992(2):237-40.
17. Clement AM, Nandanaka S, Masayama K, Mandl C, Sugahara K, Faissner A. The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin

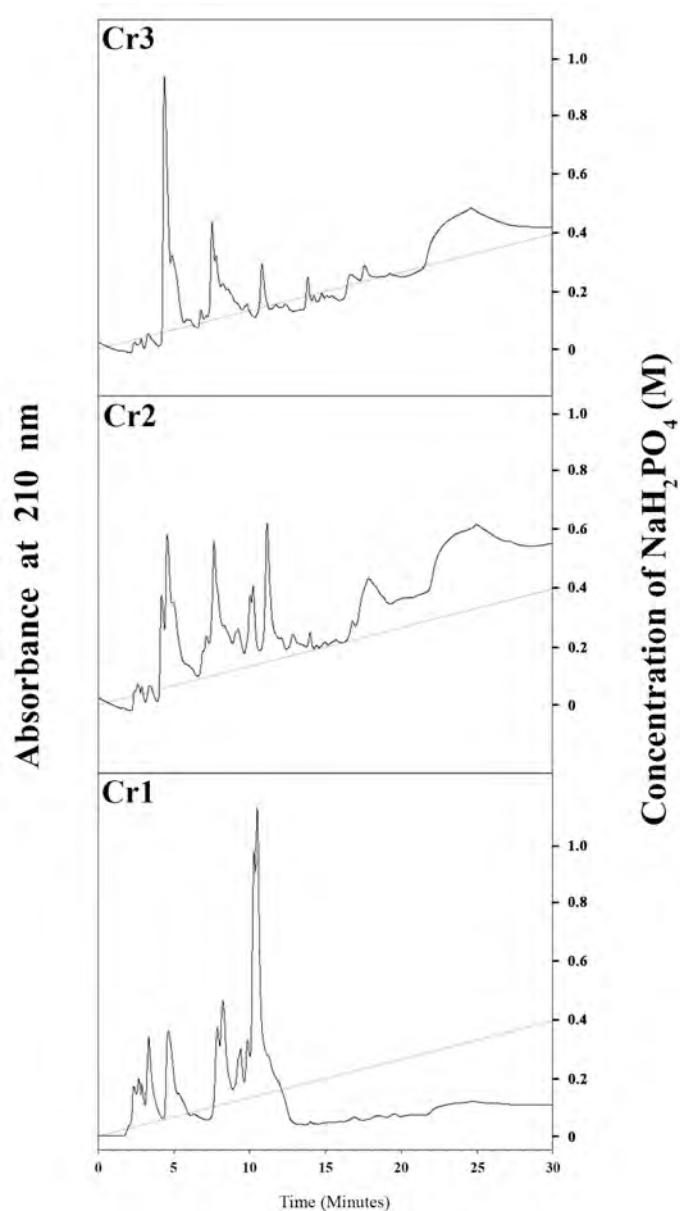
- sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1998;273(43):28444-53.
18. Clement AM, Sugahara K, Faissner A. Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 1999;269(3):125-8.
  19. Ueoka C, Kaneda N, Okazaki I, Nadanaka S, Muramatsu T, Sugahara K. Neuronal cell adhesion, mediated by the heparin-binding neuroregulatory factor midkine, is specifically inhibited by chondroitin sulfate E. Structural and functional implications of the over-sulfated chondroitin sulfate. *J Biol Chem.* 2000;275(48):37407-13.
  20. Deepa SS, Umehara Y, Higashiyama S, Itoh N, Sugahara K. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43707-16.
  21. Heinegard D. Polydispersity of cartilage proteoglycans. Structural variations with size and buoyant density of the molecules. *J Biol Chem.* 1977;252(6):1980-9.
  22. Hitchcock AM, Yates KE, Shortkroff S, Costello CE, Zaia J. Optimized extraction of glycosaminoglycans from normal and osteoarthritic cartilage for glycomics profiling. *Glycobiology.* 2007;17(1):25-35.
  23. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
  24. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem.* 1962;4:330-4.
  25. Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem.* 1968;243(7):1523-35.
  26. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res.* 1982;9(4):247-8.
  27. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem.* 1995;230(2):229-38.
  28. Kinoshita A, Sugahara K. Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal Biochem.* 1999;269(2):367-78.
  29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
  30. Plaas AH, Wong-Palms S, Roughley PJ, Midura RJ, Hascall VC. Chemical and immunological assay of the nonreducing terminal residues of chondroitin sulfate from human aggrecan. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20603-10.
  31. Calabro A, Hascall VC, Midura RJ. Adaptation of FACE methodology for microanalysis of total hyaluronan and chondroitin sulfate composition from cartilage. *Glycobiology.* 2000;10(3):283-93.
  32. Hoshi K, Ejiri S, Ozawa H. Localizational alterations of calcium, phosphorus, and calcification-related organics such as proteoglycans and alkaline phosphatase during bone calcification. *J Bone Miner Res.* 2001;16(2):289-98.

33. Rees SG, Hughes W, Embury G. Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23(2):481-9.
34. Nandini CD, Sugahara K. Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv Pharmacol*. 2006;53:253-79.
35. Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, Gallo RL. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem*. 2002;277(45):42815-20.
36. Zou XH, Jiang YZ, Zhang GR, Jin HM, Nguyen TM, Ouyang HW. Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing. *Acta Biomater*. 2009;5(5):1588-95.

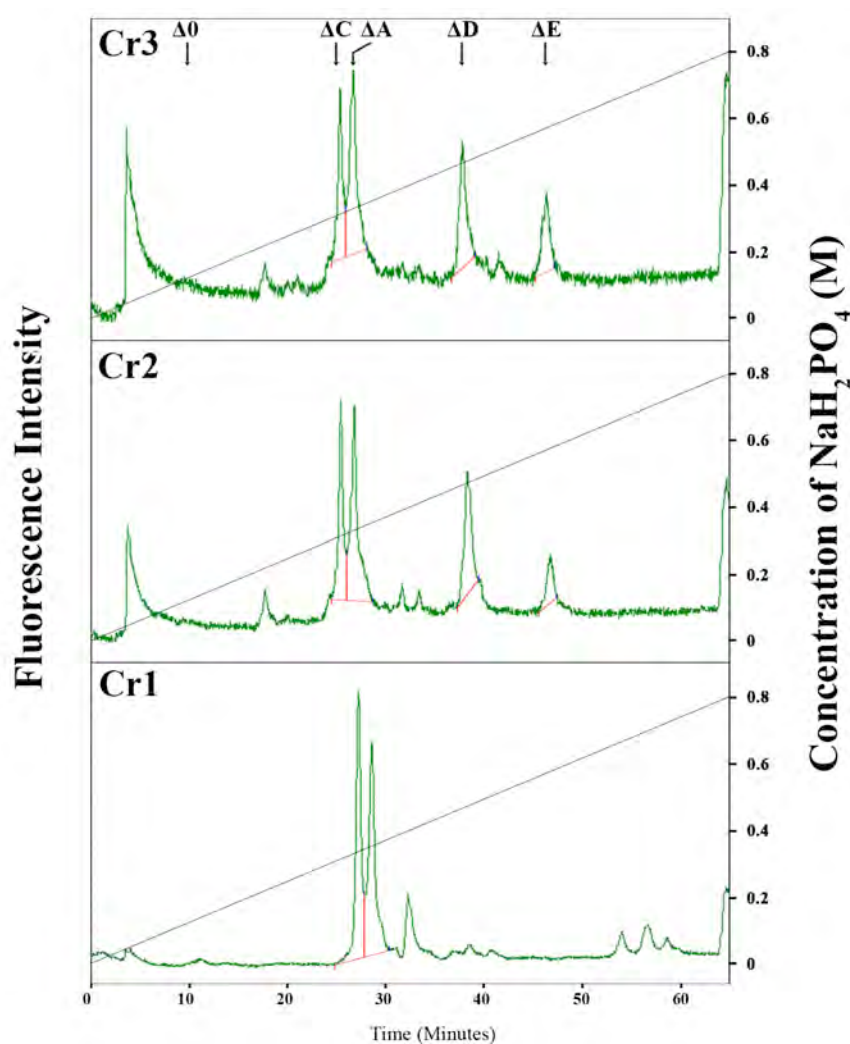
## Figure legends



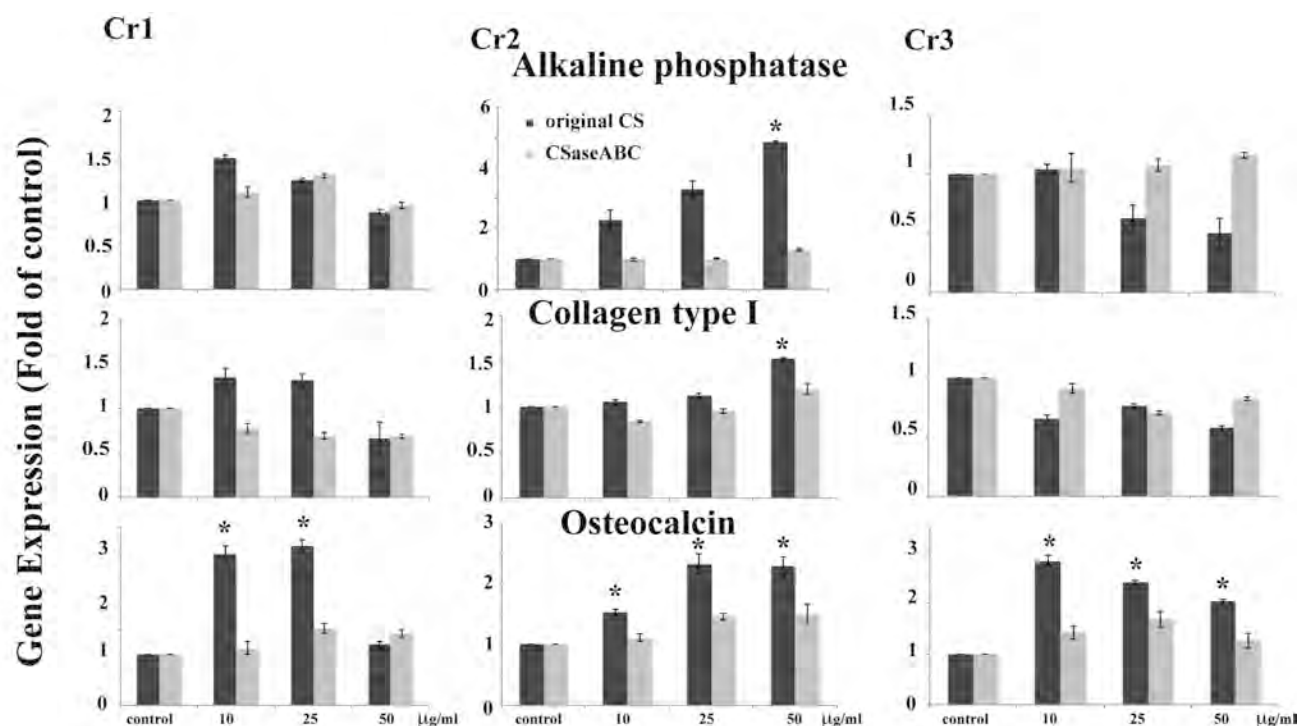
**Figure 1** Extraction and purification schematic of chondroitin sulfate from cartilaginous deer tip antler (Cr). Proteoglycans were extracted with 4 M GuHCl and sequentially isolated by CsCl density gradient ultracentrifugation. The attached proteins were removed by papain digested and  $\beta$  elimination. The resultant glycosaminoglycans were further purified by C18 reverse solid phase and anion exchanged spin column as described under experiment and procedure.



**Figure 2** Chondroitin sulfate oligosaccharide extract profiles. Purified chondroitin sulfate oligosaccharide from fraction Cr1-Cr3 were individually analyzed on anion exchange HPLC on an amine bound silica PA-03 column using linear gradient of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  as indicated. Eluted fractions were monitored with absorbance 210 nm.



**Figure 3** Disaccharide composition of chondroitin sulfate oligosaccharide extract. Purified chondroitin sulfate oligosaccharides from fraction Cr1-Cr3 were individually exhaustively digested with chondroitinase ABC, labeled with 2AB and subjected to anion exchange HPLC on an amine bound silica PA-03 column using linear gradient of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . The elution positions of standard 2-AB labeled unsaturated disaccharides are indicated:  $\Delta\text{O}$ , ( $\Delta^{4,5}\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc}$ );  $\Delta\text{A}$ , ( $\Delta^{4,5}\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc(4S)}$ );  $\Delta\text{C}$ , ( $\Delta^{4,5}\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc(6S)}$ );  $\Delta\text{D}$ , ( $\Delta^{4,5}\text{HexA(2S)}\alpha 1\text{-3GalNAc(6S)}$ ); CS-E, ( $\Delta^{4,5}\text{HexA } \alpha 1\text{-3GalNAc(4S, 6S)}$ ).



**Figure 4** Effects of antler cartilaginous chondroitin sulfate extract (Cr1-Cr3) on gene expression level of alkaline phosphatase, collagen type I and osteocalcin. Human osteoblastic cell line (hFOB1.19) were cultured in serum free DMEM at various concentration of original chondroitin sulfate or chondroitinase ABC digested chondroitin sulfate for 24 hr. The mRNA concentrations were quantified and normalized to GAPDH mRNA. Values are mean  $\pm$  SD. (n=3), Mean with different superscript asterisk within a histogram are significantly different at  $p \leq 0.05$  by Man Whitney Test.