

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของไขมันไมเอิมตัวชนิดโอเมก้า-3
ต่อโรคข้อเสื่อมในโมเดลที่ใช้เลพตินและ/หรือ
อินเตอรลิวคิน-1-เบต้าเป็นตัวกระตุ้น

โดย นางสาวธัญญลักษณ์ พิทักษ์

31 กรกฎาคม 2560

สัญญาเลขที่ TRG5880040

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า-3
ต่อโรคข้อเสื่อมในโมเดลที่ใช้เลพตินและ/หรือ
อินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้าเป็นตัวกระตุ้น

นางสาวธัญญลักษณ์ พิทักษ์
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880040

ชื่อโครงการ: ผลของไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า-3 ต่อโรคข้อเสื่อมในโมเดลที่ใช้เลพตินและ/หรืออินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้าเป็นตัวกระตุ้น

ชื่อนักวิจัย: นางสาวธัญญลักษณ์ พิทักษ์

E-mail Address: thanyaluck.phitak@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis, OA) คือโรคข้อที่พบบ่อยที่สุด สามารถบ่งชี้ได้จากความไม่สมดุลของการสร้างและสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดย IL1 β และ TNF α นั้นถูกพบว่าเป็น cytokine หลักที่เกี่ยวข้องกับการเกิดและการดำเนินไปของโรคนี้ นอกจากนั้นโรคอ้วนก็ยังคงถูกเชื่อว่าเป็นอีกปัจจัยเสี่ยงหนึ่ง ที่ทำให้เกิดโรคข้อเสื่อมได้ ทั้งในข้อที่รับน้ำหนักและข้อที่ไม่ได้รับน้ำหนัก โดย adipokine ที่เพิ่มขึ้นในโรคอ้วนตัวหนึ่ง คือ leptin ได้รับความสนใจว่าอาจเกี่ยวข้องกับโรคอ้วนและโรคข้อเสื่อม

ในการศึกษานี้ผลของ leptin ที่ pathological (100ng/ml) หรือ supra-pathological (10 μ g/ml) อย่างเดียว หรือในสภาวะร่วมกับ IL1 β ต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะถูกศึกษาในใช้โมเดลเนื้อเยื่อ กระดูกอ่อนหนู และกลไกต่างๆ หรือการส่งสัญญาณภายในเซลล์จะถูกศึกษาในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ (HACs) นอกจากนั้นยังจะทำการศึกษผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการ สลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นอีกด้วย

Leptin (10 μ g/ml) เพียงอย่างเดียวหรือในสภาวะร่วมกับ IL1 β สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ แต่ leptin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ไม่สามารถกระตุ้นได้ โดยการกระตุ้นนี้ของ leptin เกิดผ่านการกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ NF κ B and MAPKs คือ ERK, JNK และ p38 นำไปสู่การกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 ออกมาจากเซลล์ HACs นอกจากนี้ การเสริมฤทธิ์ของ leptin ต่อ IL1 β นั้น ส่งผลให้มีการกระตุ้นเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งการเสริม ฤทธิ์ดังกล่าวเกิดผ่านการกระตุ้นสัญญาณ NF κ B และ JNK ภายในเซลล์ HACs ที่เพิ่มขึ้น เป็นที่น่าสนใจ อย่างยิ่ง กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด EPA และ DHA นั้นสามารถยับยั้งผลของ leptin และ IL1 β ได้ผ่านการ ยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน NF κ B และ JNK ทำให้การหลั่งของ ADAMTS4 ลดลง

โดยภาพรวมการศึกษานี้พบว่า เฉพาะ supra-pathological concentration ของ leptin เท่านั้นที่กระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ในขณะที่ pathological concentration นั้นไม่สามารถกระตุ้นได้ นอกจากนั้น leptin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวยังเสริมฤทธิ์กับ IL1 β ในการกระตุ้นการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อีกด้วย เป็นที่น่าสนใจว่าการเสริมฤทธิ์นี้ถูกยับยั้งได้ด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด EPA และ DHA นอกจากนั้นเพื่อทำความเข้าใจเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ leptin และโรคข้อเสื่อม ควรทำการศึกษผลของ leptin หลายๆ ความเข้มข้นต่อตัวอย่างกระดูกอ่อนที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมหลายๆระยะ

คำสำคัญ : Osteoarthritis, leptin, interleukin1beta, n-3 polyunsaturated fatty acids

Abstract

Project Code: TRG5880040

Project Title: Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid on leptin- and/or interleukin-1-beta induced osteoarthritis

Investigator: Miss Thanyaluck Phitak

E-mail Address: thanyaluck.phitak@cmu.ac.th

Project Period: 2 years

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and is characterized by an imbalance in the degradation and synthesis of articular cartilage. IL1 β and TNF α , were found to be major cytokines involved in OA progression. Obesity has been believed as an important risk factor for OA development and progression not only load-bearing joints but also others non-load-bearing joints. The increased adipokine, leptin, was focused as a link of obesity and OA.

The effect of pathological (100ng/ml) or supra-pathological (10 μ g/ml) concentrations of leptin alone or in combination with IL1 β was investigated in porcine cartilage explant. All involved mechanism and intracellular signaling were examined in human articular chondrocytes (HACs). Moreover the inhibitory effect of EPA or DHA on cartilage damage was also investigated.

Leptin (10 μ g/ml) alone or in combination with IL1 β could induce cartilage destruction but lower concentrations used in the study had no effect. Leptin activated NF κ B and MAPK cascades ERK, JNK and p38 in HACs led to the induction of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 secretions. The combination effect could further induce those enzymes through the additive effect on activation of NF κ B and JNK. Interestingly, both EPA and DHA could inhibit cartilage damage induced by leptin+IL1 β by reduce the activation of NF κ B and JNK led to the decrease of ADAMTS4 secretion.

Altogether this study found that only supra-pathological concentration of leptin could induce normal cartilage destruction whereas pathological one could not. Moreover, only this level of leptin showed additive effect with IL1 β on the cartilage damage. This combination effect was inhibited by n-3 PUFAs, EPA and DHA. To understand more about the link of leptin and OA, the effect of different level of leptin on metabolism in many states of OA cartilage should be further investigated.

Keywords : Osteoarthritis, leptin, interleukin1beta, n-3 polyunsaturated fatty acids

บทนำ

1. โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA)

โรคข้อเสื่อม (OA) เป็นโรคที่พบได้มากที่สุดในระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ และเป็นโรคที่เป็นสร้างความไม่สบายแก่ประชากรทั่วโลก ทั้งยังก่อให้เกิดค่าใช้จ่ายปริมาณมากในการรักษา อัตราการเกิดโรคข้อเสื่อมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตามอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรผู้สูงอายุและกลุ่มประชากร โรคอ้วนที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การรักษาในปัจจุบันมีตั้งแต่การให้ยา การปรับเปลี่ยนพฤติกรรม และการผ่าตัดเปลี่ยนข้อ แต่โดยมากเป็นการรักษาตามอาการ[1] ดังนั้นการพัฒนาวิธีการรักษาหรือการป้องกันโรคข้อเสื่อม จึงเป็นที่น่าสนใจและต้องการอย่างเร่งด่วน

ลักษณะเด่นของโรคข้อเสื่อม คือ การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่เกิดจากความไม่สมดุลของการสร้างและการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยมีการสร้าง catabolic factors ได้แก่ (1)inflammatory cytokines ต่างๆ โดยเฉพาะ IL-1beta และ TNF-alpha (ที่จับกับ receptor แล้วทำให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณผ่าน MAPK และ NF-KB), (2)เอนไซม์ที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteineases (MMPs) และ a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs) จากเซลล์กระดูกอ่อน โดยการสร้าง catabolic factors นี้เกิดขึ้นมากกว่าการสร้าง anabolic factors ซึ่งได้แก่ extracellular matrix molecules (ECM molecules) ของกระดูกอ่อนที่สำคัญคือ type II collagen, aggrecan และ hyaluronan (HA) ทำให้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบางกว่าปกติ จึงไม่สามารถรองรับแรงกระแทกได้เหมือนในสภาวะปกติ ปัจจัยเสี่ยงของโรค OA มีได้หลายปัจจัย ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งคือ โรคอ้วน โดยโรคอ้วนนั้นเคยถูกเชื่อว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคข้อเสื่อมเฉพาะที่ โดยเฉพาะข้อที่รับน้ำหนัก ได้แก่ ข้อเข่า หรือ ข้อเท้า ซึ่งเชื่อว่าแรงกระแทกในข้อต่อที่มากขึ้นจะก่อให้เกิดการอักเสบ และส่งผลต่อการกำเนิดโรคข้อเสื่อมตามมา[2-4] อย่างไรก็ตาม พบว่าในผู้ป่วยโรคอ้วนยังพบมีปัญหของข้อต่ออื่นๆที่ไม่ใช่ข้อที่รับน้ำหนัก เช่น ข้อนิ้วมือ หรือข้อมือ[5] ซึ่งเป็นข้อต่อที่ไม่ได้รับน้ำหนักเลย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าภาวะอ้วนนั้นอาจไม่ได้กระตุ้นการเกิดโรค OA เฉพาะที่เท่านั้น แต่สามารถกระตุ้น systemic OA ได้ โดยปัจจัยที่น่าจะเกี่ยวข้องน่า จะเป็น cytokines ที่เพิ่มขึ้นในภาวะโรคอ้วน เช่น leptin เป็นต้น

2. Adipokine ชนิด leptin และความสัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อม

Leptin คือฮอร์โมนขนาด 16 kDa ที่ถูกสร้างมาจากเซลล์ไขมัน (adipocytes) ทำหน้าที่ควบคุมความอยากอาหาร และการใช้พลังงาน[6] โดย leptin มักมีระดับที่สูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วยโรค อ้วน[7] Leptin จะส่งสัญญาณโดยการจับกับ receptor ที่ชื่อว่า OB-Rb โดยจะกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน JAK-STAT, PI3K, NF-KB, PKC, และ MAPK[8] โดยพบว่าในหนูที่มีการ knock out leptin ทำให้เกิดการตายเนื่องจากภาวะอ้วนที่ควบคุมไม่ได้[6] โดย leptin ทำหน้าที่ควบคุมการใช้พลังงานของร่างกาย ได้แก่ การควบคุม neuroendocrine communication, reproduction, angiogenesis and bone formation[9, 10]

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระดับของ leptin ใน synovial fluid (น้ำไขข้อ) และใน plasma มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับค่า BMI และยังพบอีกว่า leptin ถูกสร้างได้จากเนื้อเยื่อต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของข้อต่อและ leptin ที่สร้างจากข้อต่อนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ leptin ในเลือด[11-15] นอกจากนั้นยังพบว่า leptin ยังกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) สร้าง IL-1beta, MMP3, MMP9 และ ADAMTSs ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine และ catabolic factors ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อมได้[12, 13]

นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ leptin สามารถกระตุ้นการอักเสบในโมเดลกระดูกอ่อนมนุษย์ที่แยกได้จากผู้ป่วย OA ที่มีการสร้าง IL-1beta สูงอยู่แล้ว โดยพบว่าสามารถกระตุ้นการสร้าง iNOS, PEG2, COX2, IL6, และ IL8 ได้ โดยเป็นที่น่าสนใจว่าฤทธิ์ดังกล่าวของ leptin นั้นถูกยับยั้งได้โดย JNK inhibitor, PKC inhibitor และ NFkB inhibitor นอกจากนั้นผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันยังพบว่า leptin ยังสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอีกด้วย[16] ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า leptin อาจมี cross-talk signaling กับ IL-1beta ได้ โดยเฉพาะ MAPK (JNK) และ NFkB แต่ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับ cross-talk signaling ของ cytokine ทั้งสองชนิดในเซลล์กระดูกอ่อน

3. ผลของ omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) ต่อการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อม

กรดไขมันชนิด omega-3 (n-3 PUFAs) คือกรดไขมันจำเป็นของมนุษย์ซึ่งต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น เนื่องจากร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ มีการศึกษาและรายงานอย่างกว้างขวางถึงฤทธิ์ในการป้องกันโรคหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบเรื้อรัง เช่น โรคข้อเสื่อม โรค Crohn's disease เป็นต้น[17] โดยพบว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบของ n-3 PUFA นั้นเกิดจากความสามารถของมันในการลดการสร้าง eicosanoids และ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบบางชนิด[18] นอกจากนั้นมันยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารต้านการอักเสบ ได้แก่ สารในกลุ่ม resolvins อีกด้วย[19] เป็นที่น่าสนใจมากที่มีการรายงานที่ n-3 PUFAs ชนิด DHA และ EPA สามารถยับยั้งการ activation ของ IKK-NFkB signaling ในเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย IL-1beta ได้ ส่งผลให้มีการลดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta ได้[20, 21] แต่ยังไม่มีการศึกษาใดรายงานฤทธิ์ของ n-3 PUFAs ต่อการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นโดย leptin หรือ IL-1beta+leptin

นอกจากนี้ ยังมีการรายงานที่ EPA และ DHA สามารถป้องกันภาวะอ้วน และสามารถลดน้ำหนักของทั้งหนูและคนที่มีภาวะอ้วนได้[22] ดังนั้น n-3 PUFAs ซึ่งมีหลักฐานว่ามีผลดีต่อทั้งภาวะโรคข้อเสื่อม และโรคอ้วน อาจจะมีความสามารถในการยับยั้งปัจจัยเชื่อมโยงของทั้ง 2 โรค คือ leptin ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะทดสอบว่า leptin สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน หรือ สามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้หรือไม่ และหากได้มีกลไกหรือ molecular mechanism รวมไปถึง cross-talk signaling อย่างไร นอกจากนั้นยังจะศึกษาว่า n-3 PUFAs ชนิด EPA และ DHA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร cytokines ดังกล่าวหรือไม่

วัตถุประสงค์

1. To investigate the effect of pathological concentration of leptin (100 ng/ml) and supraphysiological concentration of leptin (10000 ng/ml) on cartilage degradation and additional/synergistic effect of those concentrations of leptins and IL-1beta on cartilage degradation and to investigate involving molecular mechanism
2. To investigate effect of n-3 PUFAs, EPA and DHA, on leptin- and/or IL-1beta-induced OA in cartilage explant and chondrocyte culture models
3. To investigate cellular signaling induced by leptin and/or IL-1beta in chondrocyte and effect of n-3 PUFAs, EPA and DHA, on that signaling pathway

ระเบียบวิธีวิจัย

1. Tissue/Cell cultures and treatments

1.1 Procine cartilage explant

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนถูกเตรียมจากข้อส่วน metacarpophalangeal ของหมูที่มีอายุระหว่าง 20-24 ปี เมื่อแยกออกมาโดยเทคนิคปลอดเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงใน serum-free-DMEM ที่มี 200 units/ml penicillin และ 200 mg/ml streptomycin เป็นองค์ประกอบ และเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน หรือ explant จะถูกเลี้ยงใน serum-free-media เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บน้ำเพาะเลี้ยงเป็น day0 media แล้วทำการบ่มในน้ำเพาะเลี้ยงที่มีสารต่างๆที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ 10ng/ml IL-1beta และ/หรือ 0.1-10 µg/ml leptin เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และ 1-10 µM EPA/DHA เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เป็นเวลา 8 หรือ 28 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำเพาะเลี้ยงและเก็บในวันที่ 4, 7 (หรือ 8), 14, 21 เมื่อเก็บแล้วน้ำเพาะเลี้ยงทั้งหมดจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์โดยน้ำเพาะเลี้ยงที่ได้จะถูกทำไปวิเคราะห์หาปริมาณ sulfated-glycosaminoglycan (sGAG) และ hyaluronan (HA) ที่ถูกสลายออกมาจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมาอยู่ในน้ำเพาะเลี้ยง นอกจากนั้นในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะถูกเก็บและนำไปย่อย เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ uronic acid ที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

1.2 Human articular chondrocytes (HACs)

กระดูกอ่อนของคนปกติที่ไม่มีการอักเสบจะถูกเก็บจากผู้ป่วยโรคที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค flat pad syndrome ในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยผู้ป่วยทุกรายได้เซ็นใบยินยอมตามที่ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัย ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Ethical approval code: ORT-2557-02717) โดยเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) จะถูกแยกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เซลล์ที่หลุดออกมาและเกาะบนจานเพาะเลี้ยงจะถูกล้างด้วย PBS และเพาะเลี้ยงใน 10%FCS-DMEM เมื่อทำการขยายเซลล์ เซลล์ที่อยู่ใน passage ที่ 4 จะถูกนำมาใช้ในการทดลอง โดยจะถูกเพาะเลี้ยงจนถึง 80% confluence จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงใน serum-free-DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการบ่มในน้ำเพาะเลี้ยงที่มี 0.05 ng/ml IL-1beta และ/หรือ 0.1-10 µg/ml leptin ในสภาวะที่มีหรือไม่มี 1-10 µM EPA/DHA เป็นเวลา 30 นาทีหรือ 12 หรือ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บน้ำเพาะเลี้ยงหรือ cell lysate ใน lysis buffer เพื่อทำการวิเคราะห์หา signaling molecules (p38, ERK, JNK, IKK, p65 ทั้งในรูป phosphorylated-form และ total form โดยมี beta-actin เป็น loading control), ระดับ gene expression ของ COL2A1, COL1A1, ACAN, MMP3, MMP13, ADAMTS4 และระดับการแสดงออกของ MMP3, MMP13, และ ADAMTS4 proteins โดยวิธี western blotting

2. วิเคราะห์ (Analytical methods)

2.1 การวิเคราะห์ cytotoxicity

HAC viability จะถูกทำการทดสอบโดยวิธี MTT โดยเซลล์จำนวน 1×10^4 cells จะถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well-plate และทำการเพาะเลี้ยงข้ามคืน จากนั้นทำการบ่มในน้ำเพาะเลี้ยงที่มี 0.05 ng/ml IL-1 β และ/หรือ 0.1-10 μ g/ml leptin ในสภาวะที่มีหรือไม่มี 1-10 μ M EPA/DHA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อดูดน้ำเพาะเลี้ยงทิ้ง น้ำเพาะเลี้ยงใหม่ที่มี 10% ของ 5 mg/ml MTT (3-[4,4-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) จะถูกนำมาบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและดูดทิ้ง ผลึก formazan ที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่รอดชีวิตจะถูกละลายโดยเติม 200 μ l DMSO ลงบนเซลล์ จากนั้นสารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และ percentage of cell viability จะถูกนำมาคำนวณ โดยใช้สูตร $[\text{OD of sample} \times 100] / \text{OD of control}$

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ sGAG

ปริมาณ sGAG ที่ถูกสลายจากเนื้อเยื่อกระดูกออกมาในน้ำเพาะเลี้ยงจะถูกวัดด้วยวิธี dimethylmethylene blue (DMMB) assay โดยใช้ chondroitin sulfate C เป็น standard โดยสารละลาย DMMB จะถูกเตรียมและผสมกับตัวอย่าง DMMB จะเข้าจับกับ sGAG ทำให้เกิดการเปลี่ยนการดูดกลืนแสงที่สามารถวัดได้ที่ความยาวคลื่น 620 nm ความยาวคลื่นของตัวอย่างจะถูกนำไปคำนวณเป็นปริมาณ sGAG โดยเทียบกับ standard curve และ percentage of sGAG change จะถูกคำนวณเทียบกับ untreated control โดยใช้สูตร $\{(\text{Day3 medium} - \text{Day 0 medium}) / \text{Day 0 medium}\} \times 100$

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ HA

ปริมาณ HA ในน้ำเพาะเลี้ยงจะถูกวัดโดยวิธีการ competitive inhibition-based-ELISA กล่าวโดยย่อ 175 μ l ของตัวอย่างหรือ HA standard จะถูกใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม biotinylated-HA binding protein (B-HABP) ปริมาณ 175 μ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในขณะนี้ B-HABP จะเข้าจับกับ HA ในตัวอย่างหรือใน standard จากนั้นสารผสมจะถูกนำไปเติมใน 96-well-plate ที่ถูกเคลือบด้วย umbilical cord HA และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หาก HA ในตัวอย่างมีมาก จะเหลือ B-HABP มาจับกับ coated umbilical cord HA บน plate ปริมาณน้อย ในทางกลับกันหาก HA ในตัวอย่างมีน้อยจะเหลือ B-HABP มาจับกับ coated umbilical cord HA บน plate ปริมาณมาก เมื่อล้างสารส่วนเกินออกแล้ว anti-biotin antibody ที่ถูกเชื่อมกับเอนไซม์ peroxidase จะถูกเติมลงไป จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการล้างสารส่วนเกินออก และทำการเติม o-phenylenediamine (OPD) substrate สีเหลืองที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงข้ามกับปริมาณ HA ที่มีในตัวอย่าง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4 M H_2SO_4 และทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ OD 492/620 nm ปริมาณ HA ในตัวอย่างจะถูกคำนวณโดยเทียบกับ standard curve และ percentage of HA change จะถูกคำนวณเทียบกับ untreated control โดยใช้สูตร $\{(\text{Day3 medium} - \text{Day 0 medium}) / \text{Day 0 medium}\} \times 100$

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณ uronic acid remaining ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกเก็บหลังจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ papain จากนั้นปริมาณ uronic acid จะถูกวัดโดย colorimetric method โดยใช้ m-hydroxydiphenyl และใช้ glucuronic acid lactone เป็น standard กล่าวโดยย่อตัวอย่างและสาร standard จะถูกนำมาเติม 300 μ l sulfuric acid-birate reagent และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเติม carbazole solution (50 mg carbazole ใน 40 ml ethanol) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที complex ของ uronic acid และ m-hydroxydiphenyl จะให้สีชมพูแดง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 540 nm โดย percentage of uronic acid remaining เมื่อเทียบกับ untreated control จะถูกคำนวณโดยใช้สูตร $\{UA(\text{Day treated})-UA(\text{Day3 control})\} \times 100$

2.5 RNA extraction และ การวิเคราะห์ปริมาณ gene expression

Total RNA จะถูกสกัดจาก cell lysate ด้วย RNA extraction kit ของ Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit ตามวิธีการของชุด kit จากนั้น 500 ng total RNA จะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ Revert Aid™ H minus first strand cDNA synthesis kit จากนั้นทำการวัดการแสดงออกของ COL2A1, COL1A1, ACAN, MMP3, MMP13, ADAMTS4 gene expressions โดยวิธี Real-time PCR ด้วย Sensi FAST™ SYBR® Lo-ROX Kit และใช้เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific) และคำนวณระดับการแสดงออกของยีน โดยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$

2.6 Protein extraction และ western blot analysis

หลังจากบ่มในสภาวะต่างๆที่สนใจแล้ว เซลล์จะถูกล้างด้วย ice-cold PBS และ cell lysate จะถูกเก็บใน 300 μ l ของ 0.5 M Tris-HCl containing glycerol, 10% SDS and 0.1% (w/v) Bromophenol Blue ที่มี 0.1% mercaptoethanol เมื่อทำการเก็บเซลล์โดย scrapper และเก็บ cell lysate ใน buffer ดังกล่าว cell lysate จะถูกตั้งบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที และ vortex เป็นเวลา 2-3 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที และ supernate จะถูกเก็บที่ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ อีกส่วนหนึ่งในการ วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 ใน conditioned media นั้น media ที่ถูกเก็บ หลังจากการบ่มจะถูกนำมาทำให้เข้มข้นด้วย Amicon Ultra-40 (Ultracel-30kDa) ก่อนทำการวิเคราะห์ cell lysate หรือ concentrated media จะถูกนำมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และตัวอย่างขนาด 50 μ g จะถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สนใจด้วย western blot ต่อไป

ตัวอย่างจะถูกนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปแยกโปรตีนด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 10% SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนไปสู่ nitrocellulose membrane และทำการ block ด้วย 5% nonfat dried milk จากนั้นนำเมมเบรนไปบ่มกับ primary antibody ต่อโปรตีนที่สนใจที่ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อล้าง antibody ส่วนเกินออกแล้วนำไปบ่มกับ secondary antibody ที่เชื่อมกับ horse-radish peroxidase ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแถบโปรตีนที่สนใจจะถูกทำให้เห็น

ด้วย ECL detection system โดยทำการบันทึกรูปภาพโดยใช้เครื่อง Gel Doc System (BioRad) และ
คำนวณความหนาของแถบโปรตีนด้วย Scion image analysis software

ผลการทดลอง

1. ผลของ leptin และการเสริมฤทธิ์ของ leptin ต่อ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

ดังที่ได้กล่าวไปในส่วนของบทนำว่า มีรายงานว่าผู้ป่วยโรคอ้วนซึ่งมักมีความทรมานจากความเสื่อมของกระดูกอ่อนโดยเฉพาะข้อที่รับน้ำหนัก เช่น ข้อเท้า หรือข้อเข่า ซึ่งเกิดการอักเสบเนื่องจาก mechanical force จากการรับแรงที่มากเป็นเวลานานทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในข้อนั้นๆ ไม่เพียงเท่านั้นข้อที่ไม่ได้รับน้ำหนัก เช่น ข้อมือ หรือข้อนิ้วมือก็เกิดการเสื่อมเช่นกัน ซึ่งการอักเสบในข้อเหล่านี้ไม่น่าจะเกิดจาก mechanical force ดังนั้นจึงมีการเชื่อมโยงสาร cytokine ที่พบสูงขึ้นในน้ำเลือดและในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคอ้วน คือ leptin ว่าอาจมีการเกี่ยวข้องกับการอักเสบของข้อต่างๆ เหล่านี้ได้ โดยก่อนหน้านี้ได้มีการรายงานผลของ leptin ต่อการกระตุ้นการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน[12, 13] และการเสริมฤทธิ์ของ leptin ต่อ IL-1beta ซึ่งเป็น cytokine หลักที่เป็นสาเหตุของโรคข้อเสื่อม ในการกระตุ้นการอักเสบและการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน[16] อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมาส่วนมากจะใช้ความเข้มข้นที่มากกว่าที่พบจริงในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคอ้วน (supra-pathological concentration, มากกว่า 100 ng/ml) โดยมีการรายงานว่าความเข้มข้นของ leptin ที่พบในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมนั้นมีความเข้มข้นระหว่าง 4.4-28.5 ng/ml [23, 24] ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า pathological concentration ของ leptin (<100 ng/ml) นั้นมีผลต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta จริงหรือไม่ จึงทำการศึกษาฤทธิ์ของ leptin ต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและการเสริมฤทธิ์ต่อ IL-1beta ในโมเดล porcine cartilage explant และศึกษากลไกของฤทธิ์ดังกล่าวใน human articular chondrocytes (HACs) โดยใช้ leptin ที่ความเข้มข้น 100, 1000, และ 10000 ng/ml (0.1, 1.0, 10 μ g/ml) โดยให้ 100 ng/ml leptin เป็นตัวแทนของ pathological concentration ของ leptin และ 1000, 10000 ng/ml leptin เป็นตัวแทนของ supra-pathological concentration

1.1 ผลของ leptin และการเสริมฤทธิ์ของ leptin ต่อ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในโมเดล porcine cartilage explant

เพื่อศึกษาผลดังกล่าว cartilage explant ถูกแยกออกจากข้อส่วน metacarpophalangeal ของหมู โดยเทคนิคปลอดเชื้อและนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงที่มี 0.1, 1.0, 10 μ g/ml และ/หรือ 10 ng/ml IL-1beta เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นทำการวัด ECM molecules ที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้แก่ uronic acid (รูป 1A) และที่ถูกสลายออกมาในน้ำเพาะเลี้ยง ได้แก่ HA (รูป 1B) และ sGAG (รูป 1C) โดยสภาวะต่างๆ ที่ใช้ไม่มีผลต่อการเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ LDH ออกมาสู่น้ำเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าสภาวะต่างๆ นั้นไม่มีผลต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนในเนื้อเยื่อกระดูก (data not shown) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับ uronic acid remaining ระหว่างตัวอย่างทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนในน้ำเพาะเลี้ยงต่างๆ ดังกล่าวไม่ให้เกิดผลแตกต่างชัดเจนของการเหลืออยู่ของ uronic acid ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (รูป 1A) อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงการสลาย ECM molecules พบว่า IL-1beta สามารถ

เพิ่มการสลายของทั้ง HA และ sGAG ออกมาสู่น้ำเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ untreated control โดยเฉพาะในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (รูป 1B, 1C) เฉพาะ supra-pathological concentration ของ leptin (10 $\mu\text{g/ml}$) เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการสลายของ sGAG ได้ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (รูป 1C) แต่ pathological concentration ไม่สามารถกระตุ้นได้ นอกจากนั้นยังพบว่าเฉพาะ supra-pathological concentration ของ leptin เท่านั้นที่สามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการเพิ่มการสลายของ HA และ sGAG จากโมเดล cartilage explant ได้ อย่างไรก็ตาม การเสริมฤทธิ์ของ leptin และ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนี้ยังไม่สามารถเทียบเท่ากับฤทธิ์ของ OSM และ IL-1beta ซึ่งเป็น cytokines ที่ใช้กันมากในการจำลอง OA model

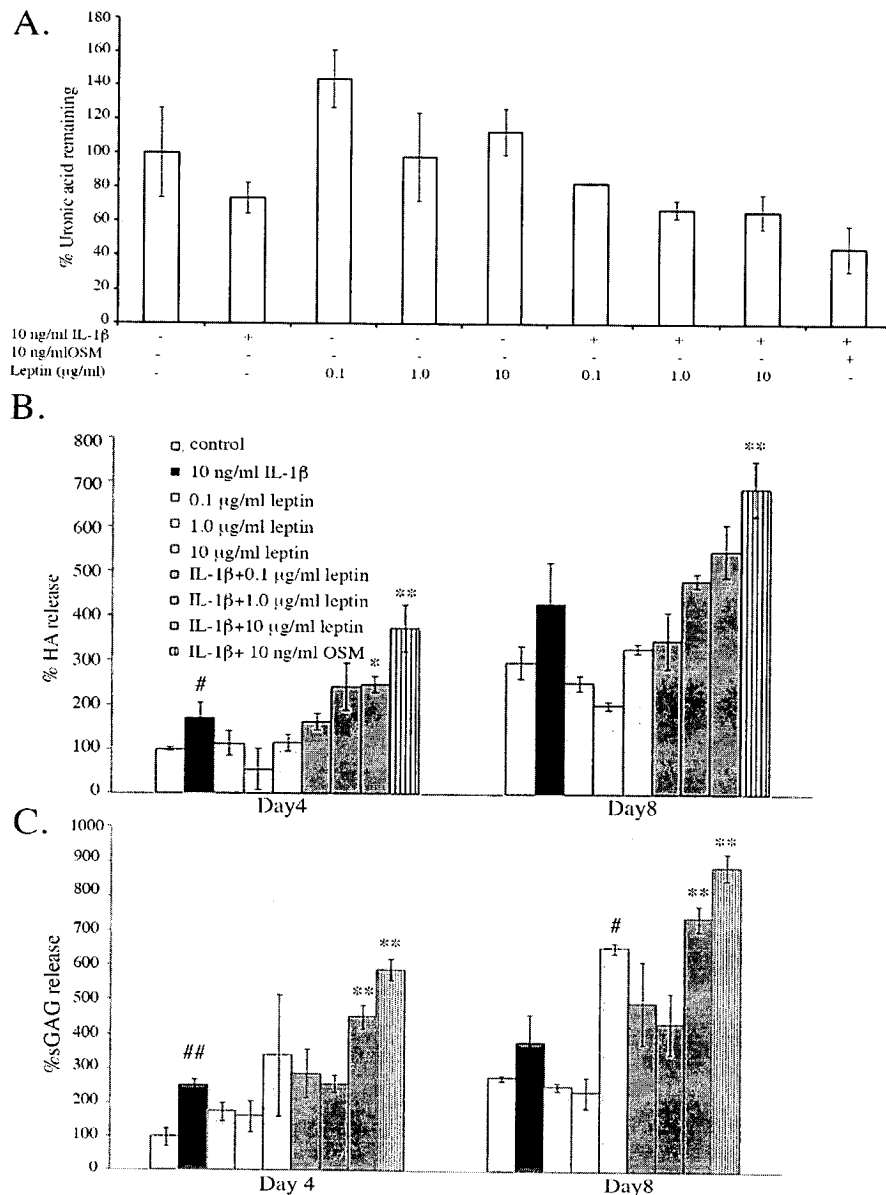
จึงสามารถกล่าวได้ว่า pathological concentration ของ leptin ไม่สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ และไม่สามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ต่อการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ ในขณะที่ supra-pathological concentration นั้นสามารถแสดงฤทธิ์ทั้งกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายของกระดูกอ่อนได้

1.2 กลไกของ leptin ในการกระตุ้นการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและการเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

เพื่อศึกษาว่า supra-pathological concentration ของ leptin สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ต่อการสลายดังกล่าวได้ด้วยกลไกใด HACs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมนุษย์ปกติจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงที่มี 0.1 (pathological concentration) และ 10 $\mu\text{g/ml}$ (supra-pathological concentration) leptin และ/หรือ 0.05 ng/ml IL-1beta เป็นเวลา 3, 6 และ 12 ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA expression ของ anabolic factors หรือ ECM molecules ได้แก่ *ACAN gene* ซึ่งจะ encode เป็น core protein ของ GAG ชนิด aggrecan ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในการกระดูกอ่อน และ *COL2A1/COL1A1 ratio* ซึ่ง *COL2A1* จะถูก encode ได้เป็น alpha-chain ของ type II collagen ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากในการกระดูกอ่อน ส่วน *COL1A1* จะถูก encode ได้เป็น polypeptide ที่เป็นองค์ประกอบของ type I collagen ซึ่ง *COL2A1/ COL1A1 ratio* ที่ลดลงจะบ่งชี้ถึงการเสื่อมของเซลล์กระดูกอ่อนที่สามารถสร้าง collagen หลักได้ลดลงแต่ สร้าง collagen ชนิดอื่นมาทดแทน นอกจากนั้นทำการวัดการแสดงออกของ catabolic factors ได้แก่ *MMP3*, *MMP13* และ *ADAMTS4* ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สลาย ECM molecules ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้แก่ collagen และ proteoglycans ตามลำดับด้วยวิธี real-time PCR (รูป 2, 3)

จากการทดลองพบว่า IL-1beta มีผลลด *COL2A1/COL1A1 ratio* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *ACAN gene* (รูป 2) เป็นที่น่าสนใจว่า pathological concentration leptin ไม่มีผลต่อการแสดงออกของทั้ง 2 ยีน แต่ supra-pathological concentration leptin สามารถเพิ่มการแสดงออกของ *ACAN* ได้ นอกจากนั้นพบว่าทั้ง supra-pathological และ pathological concentration ของ leptin นั้นสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการลดการแสดงออกของ *COL2A1/ COL1A1 ratio* ได้

จึงกล่าวได้ว่าทั้ง 2 ความเข้มข้นของ leptin มีผลต่อการสร้าง anabolic factor ของเซลล์กระดูกอ่อน โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงชนิดของ collagen



รูปที่ 1 แสดงผลของ leptin และ/หรือ IL-1beta ต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในโมเดล porcine cartilage explant โดย explant จะถูกเลี้ยงในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 8 วันโดยมีการเก็บและเปลี่ยนน้ำเพาะเลี้ยงในวันที่ 4 และ 8 ของการทดลอง ปริมาณ uronic acid ที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะถูกวัดจาก explant ที่เก็บในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (A) และ HA (B), sGAG (C) ที่ถูกสลายออกมาจาก เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะถูกวัดในน้ำเพาะเลี้ยงในวันที่ 4 และ 8

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (# : $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$)

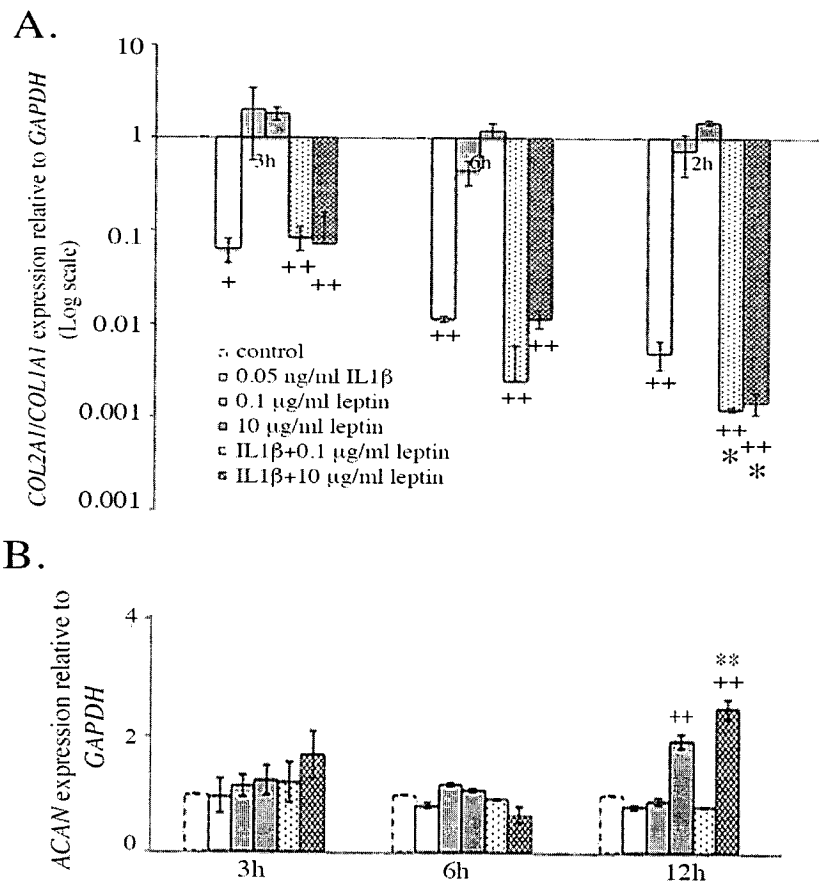
* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta treatment (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

ในส่วนของ catabolic factors นั้นพบว่า IL-1beta สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *MMP13* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (มากกว่า 10 เท่าเมื่อเทียบกับ control) แต่ไม่สามารถเพิ่มยีน *ADAMTS4* ได้ (รูป 3) โดยทั้ง supra-pathological และ pathological concentration ของ leptin สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MMP3* ได้ แต่เพิ่มได้น้อยกว่า IL-1beta (น้อยกว่า 10 เท่าเมื่อเทียบกับ control) โดยทั้งคู่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *ADAMTS4* และเฉพาะ supra-pathological concentration เท่านั้นที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MMP13* ได้แต่เพิ่มได้น้อยกว่า IL-1beta เช่นกัน (5 เท่าเมื่อเทียบกับ control) นอกจากนี้ยังพบว่าเฉพาะ supra-pathological concentration ของ leptin เท่านั้นที่สามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ได้ จะพบว่าผลของ leptin ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ทั้ง 3 ไม่สอดคล้องกับผลใน cartilage explant ที่เฉพาะ supra-pathological concentration เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกได้ ดังนั้นจึงทำยืนยันผลโดยการวัดระดับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ที่หลั่งออกมาสู่น้ำเพาะเลี้ยงด้วยวิธี western blot

โดยทำการเพาะเลี้ยง HACs ในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อวัดปริมาณเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี western blot (รูป 4) พบว่า IL-1beta สามารถเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ *MMP3*, *MMP13* และ *ADAMTS4* ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะ active-forms เมื่อเทียบกับ control (รูป 4A, 4C) เป็นที่น่าสนใจว่า pathological concentration leptin ไม่สามารถเพิ่มการหลั่งของทั้ง *MMP3* และ *MMP13* ได้ แต่เฉพาะ supra-pathological letin เท่านั้นที่สามารถเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ทั้งคู่ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ทั้ง 2 ความเข้มข้นของ leptin สามารถเพิ่มการหลั่ง ของ *ADAMTS4* ได้ (รูป 4B, 4C) ในส่วนของการเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta นั้นพบว่าเฉพาะ supra-pathological letin เท่านั้นที่สามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ต่อการกระตุ้นการหลั่งของทั้ง 3 เอนไซม์ได้

จึงสามารถสรุปได้ว่า (1)ยีน *MMP3* ถูกกระตุ้นได้โดยทั้ง pathological และ supra-pathological concentration ของ leptin ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ active-*MMP3* ได้ โดยการกระตุ้นนี้ไม่สามารถกระตุ้นได้เทียบเท่ากับ IL-1beta, (2)ยีน *MMP13* ถูกกระตุ้นได้ด้วยเฉพาะ supra-pathological concentration ของ leptin ทำให้เกิดการสังเคราะห์ active-*MMP13* ออกมาสู่น้ำเพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์นี้ของ leptin ไม่เทียบเท่ากับ IL-1beta เช่นกัน, (3)ยีน *ADAMTS4* ไม่ถูกกระตุ้นโดยทั้ง pathological และ supra-pathological concentration ของ leptin แต่กลับพบว่าในน้ำเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ความเข้มข้นของ leptin สามารถกระตุ้นการหลั่งของ active-*ADAMTS4* ได้เทียบเท่ากับ IL-1beta ดังนั้น leptin อาจมีผลเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสลายของเอนไซม์ active-*ADAMTS4* ทำให้ แม้ว่าไม่มีการควบคุมในระดับยีนแต่มีระดับโปรตีนที่สูงขึ้น และ (4)เป็นที่น่าสนใจมาก เฉพาะ supra-pathological concentration ของ leptin สามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนทั้ง 3 รวมไปถึงระดับโปรตีนของ pro-*MMP3*, active-*MMP13* และ active-*ADAMTS4* ได้

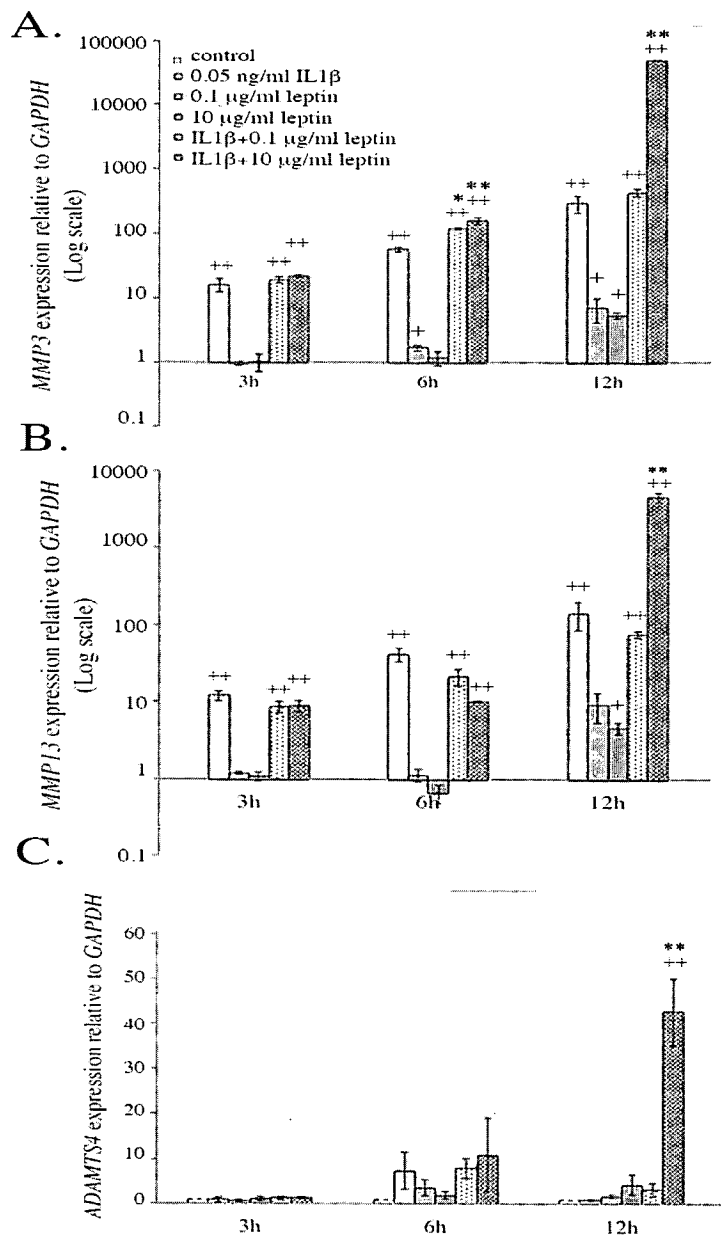
ดังนั้น IL-1beta สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ *MMP3*, *MMP13* และ *ADAMTS4* (25, 6 และ 4 เท่าเมื่อเทียบกับ control, ตามลำดับ) โดยพบว่า pathological concentration ของ leptin สามารถกระตุ้นเฉพาะเอนไซม์ *ADAMTS4* (4 เท่าเมื่อเทียบกับ control)



รูปที่ 2 แสดงผลของ leptin และ/หรือ IL-1 β ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ anabolic factors ในการสร้าง ECM molecules ใน HACs ได้แก่ การแสดงออกของยีน COL2A1/COL1A1 ratio (A), และ ACAN (B)

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

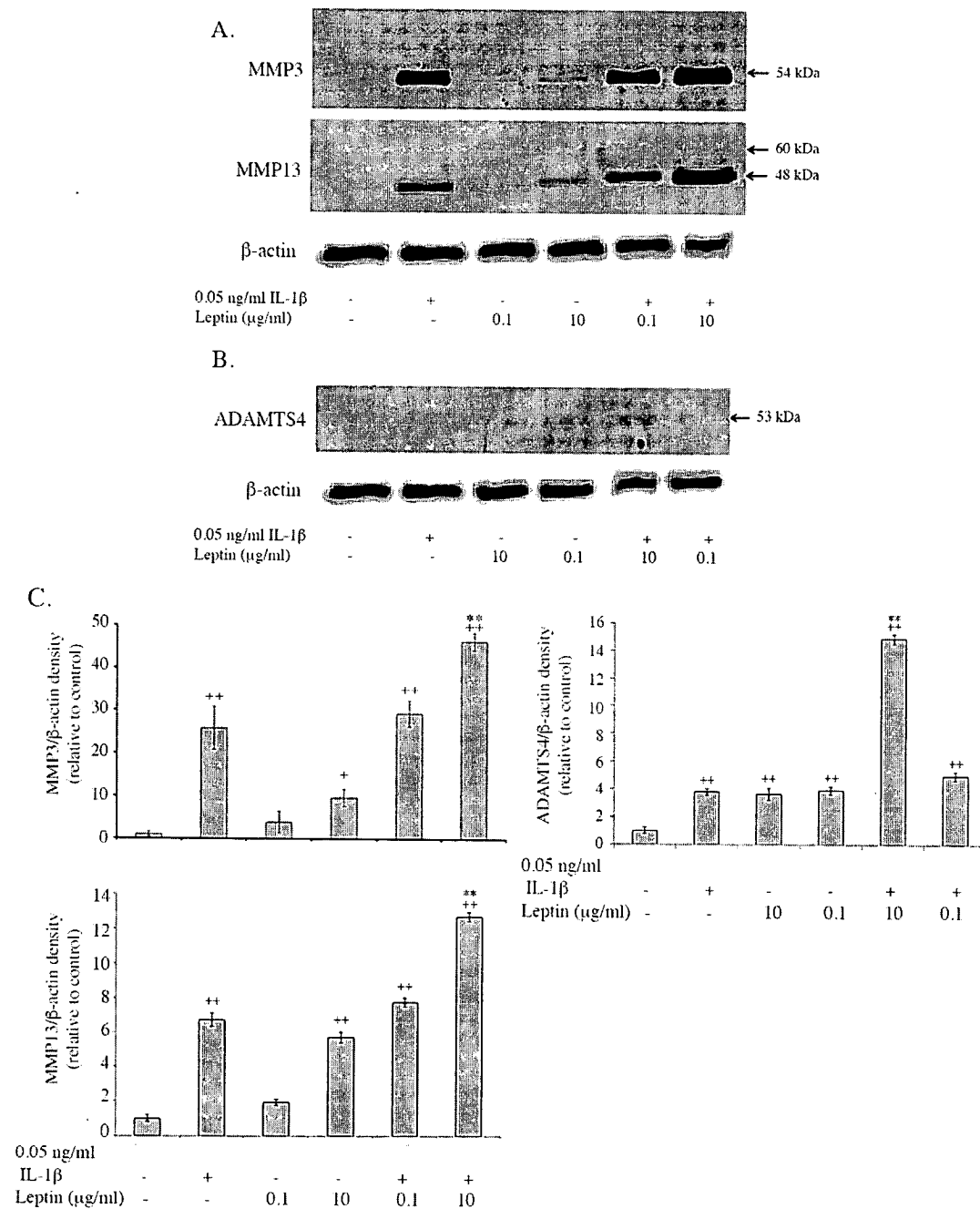
* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1 β treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)



รูปที่ 3 แสดงผลของ leptin และ/หรือ IL-1 β ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ catabolic factors ที่สลาย ECM molecules ใน HACs ได้แก่ การแสดงออกของยีน MMP3(A), MMP13 (B) และ ADAMTS4 (C)

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1 β treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)



รูปที่ 4 แสดงผลของ leptin และ/หรือ IL-1beta ต่อการหลั่งของเอนไซม์ MMP3, MMP13 (A) และ ADAMTS4 (B) จาก HACs ออกมาสู่ น้ำเพาะเลี้ยง โดย band density ของเอนไซม์ทั้ง 3 ถูกแสดงใน bar graph (C)

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

ทำให้ไม่เพียงพต่อการกระตุ้นการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ในขณะที่ supra-pathological concentration ของ leptin สามารถกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ทั้ง MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 ได้ (10, 5 และ 4 เท่า เมื่อเทียบกับ control, ตามลำดับ) จึงสามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้แต่ได้น้อยกว่า IL-1beta ตามความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ได้น้อยกว่า และ ในสภาวะที่มี supra-pathological concentration ของ leptin ร่วมกับ IL-1beta พบว่าสามารถกระตุ้นการหลั่งของ MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 ได้ถึง 45, 12 และ 14 เท่า เมื่อเทียบกับ control, ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า leptin สามารถเสริมฤทธิ์แบบ synergistic กับ IL-1beta ในการกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ ทำให้เมื่อมีการเพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนในสภาวะที่มีทั้ง leptin และ IL-1beta ทำให้มีการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสารใดสารหนึ่งเพียงอย่างเดียว

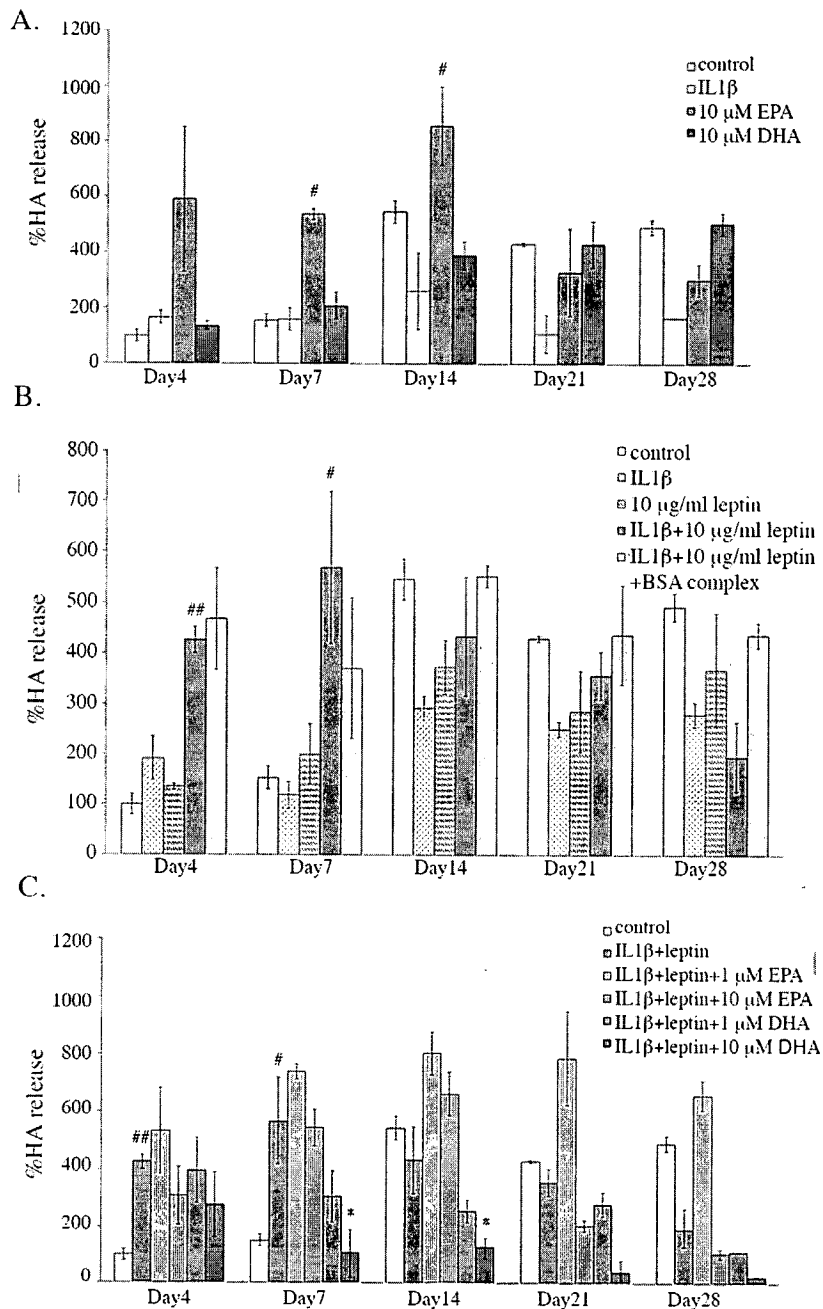
2. ผลของ n-3 PUFAs ชนิด EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นโดย IL-1beta และ leptin

2.1 ผลของ n-3 PUFAs ชนิด EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นโดย IL-1beta และ leptin ในโมเดล porcine cartilage explant

จากที่ได้กล่าวข้างต้นว่ามีการศึกษากันอย่างแพร่หลายว่า n-3 PUFAs ทั้ง EPA และ DHA สามารถยับยั้งการอักเสบในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนทำให้ลดการสลายของเนื้อเยื่อดังกล่าวได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า n-3 PUFAs ทั้งคู่มีผลต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin ได้หรือไม่ ในการทดลองนี้จึงทำการวัดความสามารถของ n-3 PUFAs ทั้งคู่โดยใช้ cartilage explant model

explant ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี 10 ng/ml IL-1beta และ 10 µg/ml leptin ในสภาวะที่มีหรือไม่มี 1, 10 µM EPA และ DHA เป็นเวลา 28 วันโดยทำการเปลี่ยนและเก็บน้ำเพาะเลี้ยงในวันที่ 4, 7, 14, 21 และ 28 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ HA และ sGAG ที่ถูกสลายออกมา โดยสภาวะ ต่างๆที่ใช้ไม่มีผลต่อการเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ LDH ออกมาสู่น้ำเพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นว่าสภาวะต่างๆ นั้นไม่มีผลต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนในเนื้อเยื่อกระดูก (data not shown) พบว่า IL-1beta และ leptin สามารถกระตุ้นการสลายของ HA (รูป 5B) และ sGAG (รูป 6B) ออกมาจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า 10 µM DHA สามารถลดการสลายของ HA ได้ (Day7, 14 [รูป 5C]) ในขณะที่ EPA ไม่สามารถลดได้ โดยอาจเป็นผลเนื่องจากว่า 10 µM EPA อย่างเดียวสามารถกระตุ้นการสลายของ HA ได้ ในขณะที่ DHA ไม่มีผล (รูป 5A) นอกจากนี้ในส่วนของ sGAG พบว่าทั้ง EPA และ DHA สามารถยับยั้งการสลายของ sGAG ได้แบบ dose dependent manner โดยหากพิจารณาในช่วงแรก ของการเพาะเลี้ยง (Day4) พบว่า DHA ให้ผลยับยั้งดีกว่า EPA (รูป 6C) โดย BSA complex ที่ใช้เตรียม PUFAs ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการสลายของกระดูกอ่อน (รูป 5B, 6B)

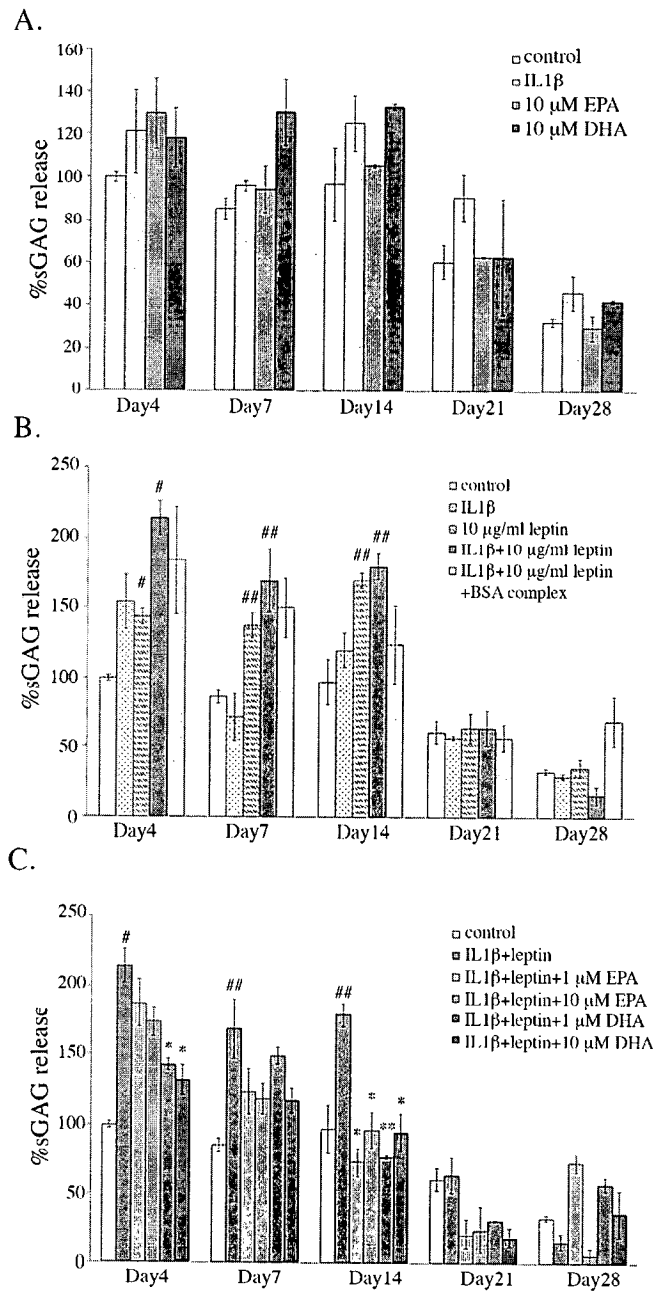
จึงสามารถสรุปได้ว่า ทั้ง EPA และ DHA มีความสามารถในการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin โดย DHA สามารถยับยั้งได้มากกว่า EPA ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก EPA เองสามารถกระตุ้นการสลายของ HA ได้ โดยต่อไปจะทำการศึกษากลไกการยับยั้งของ n-3 PUFAs ทั้งคู่ในโมเดล HACs



รูปที่ 5 แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการสลาย HA จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β และ leptin ในโมเดล cartilage explant โดย (A) แสดงผลของ 10 μ M EPA และ DHA ต่อการสลาย HA, (B) แสดงผลของ BSA complex ต่อการสลาย HA, และ (C) แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการสลาย HA

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (# : $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1 β +leptin treatment (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)



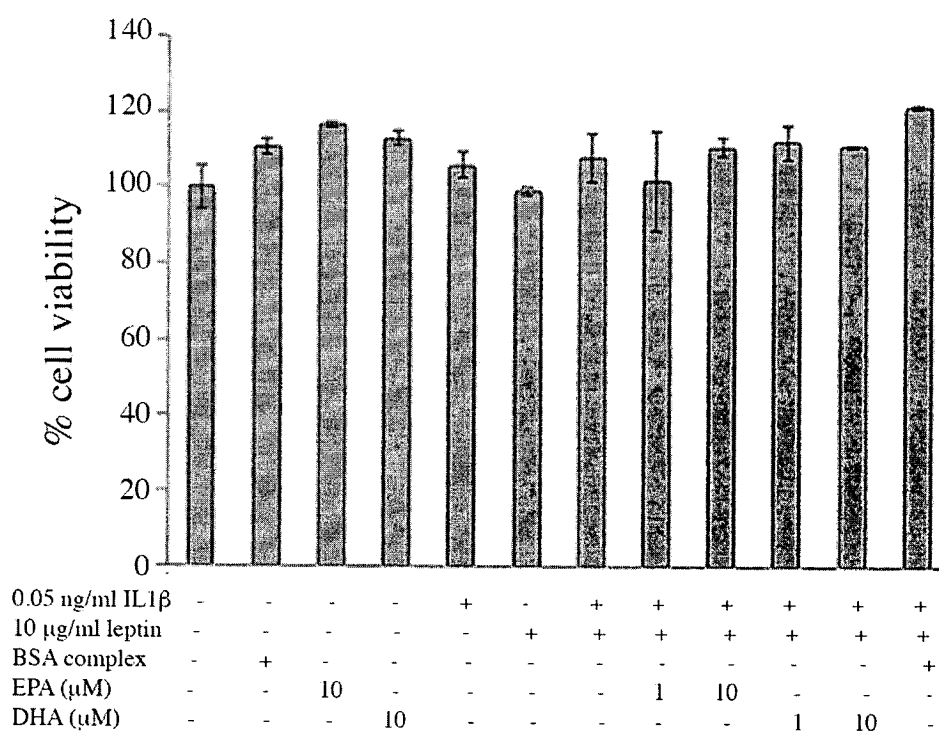
รูปที่ 6 แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการสลาย sGAG จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin ในโมเดล cartilage explant โดย (A) แสดงผลของ 10 μM EPA และ DHA ต่อการสลาย sGAG, (B) แสดงผลของ BSA complex ต่อการสลาย sGAG, และ (C) แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการยับยั้งการสลาย sGAG

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta+leptin treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

2.2 กลไกในการยับยั้งการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin ของ EPA และ DHA

ก่อนทำการทดสอบกลไกทั้งหมดใน HACs ความเป็นพิษของสภาวะต่างๆที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาทดสอบว่าเป็นพิษต่อ HACs หรือไม่ ด้วยวิธี MTT โดย HACs จะถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี 0.05 ng/ml IL-1beta และ 10 μ M leptin ในสภาวะที่มีและไม่มี EPA และ DHA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบ พบว่า ทุกสภาวะที่ใช้ไม่ทำให้ความอยู่รอดของเซลล์น้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกับ control (รูป 7) แสดงว่าทุกสภาวะไม่เป็นพิษต่อ HACs



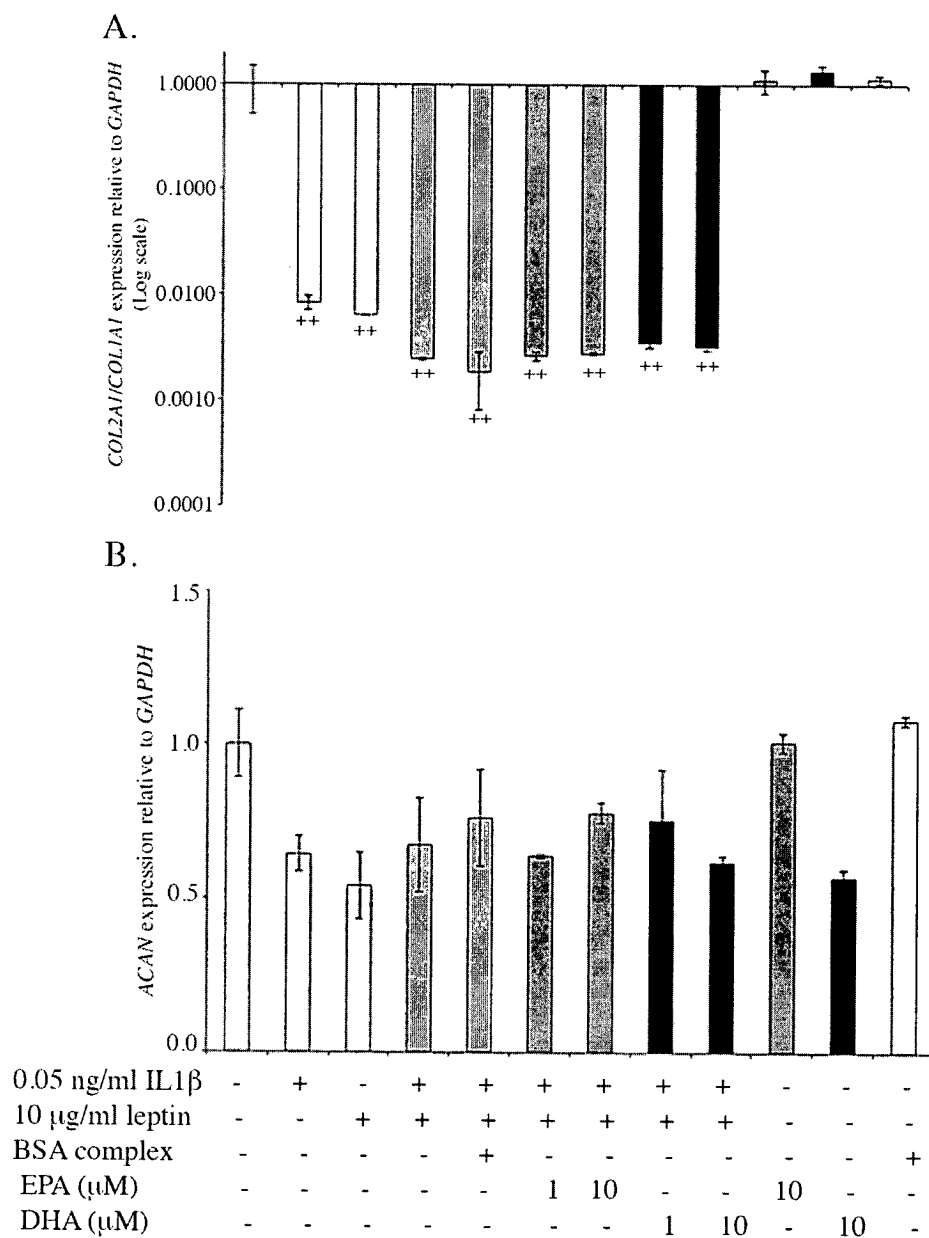
รูปที่ 7 แสดงผลของ IL-1beta และ/หรือ leptin และ EPA หรือ DHA ต่อความอยู่รอดของ HACs ซึ่งวัดด้วยวิธี MTT โดย HACs จะถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการวัดความอยู่รอดของเซลล์

จากนั้นทำการวัดผลของ 1, 10 μ M EPA และ DHA ต่อการแสดงออกของยีนทั้ง anabolic factors ได้แก่ COL2A1/COL1A1 ratio และ ACAN และ catabolic factors ได้แก่ ยีน MMP3, MMP13, และ ADAMTS4 ด้วยวิธี real-time PCR นอกจากนั้นวัดผลต่อการหลั่งของเอนไซม์ทั้งสามชนิดออกมาสู่น้ำเพาะเลี้ยงด้วยวิธี western blot โดย HACs จะถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ โดยผลการทดลองพบว่าในส่วน of anabolic factors นั้น IL-1beta และ leptin สามารถลด COL2A1/COL1A1 ratio ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลชัดเจนกับการแสดงออกของ ACAN และทั้ง

EPA และ DHA ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *COL2A1/COL1A1* ratio และ *ACAN* เมื่อเทียบกับสภาวะที่เพาะเลี้ยงใน IL-1beta และ leptin (รูป 8) ในส่วนของ catabolic factors พบว่า 10 μ M EPA อย่างเดียวมีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *MMP3*, *MMP13* และ *ADAMTS4* ได้เมื่อเทียบกับ control อย่างมีนัยสำคัญ (2, 6, และ 1.8 เท่าเมื่อเทียบกับ control, ตามลำดับ) (รูป 9) แต่เมื่อพิจารณาที่ระดับเอนไซม์ที่หลั่งออกมาพบว่า 10 μ M EPA นั้นสามารถกระตุ้นการหลั่งของของเพียง *MMP13* และ *ADAMTS4* แต่ไม่มีผลชัดเจนต่อ *MMP3* (รูป 10, 11) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นนี้ของ EPA ก็ไม่เทียบเท่ากับฤทธิ์ของ IL-1beta และ leptin ที่สามารถกระตุ้นการหลั่งของ *MMP3*, *MMP13*, และ *ADAMTS4* ได้ถึง 50, 8, และ 4 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า EPA เองสามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ดังกล่าว แต่ DHA นั้นมีผลกระตุ้นการหลั่งของ *MMP13* ได้ 3.5 เท่าเมื่อเทียบกับ control แต่พบการกระตุ้นนี้ไม่ทำให้เกิดการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญในโมเดล cartilage explant

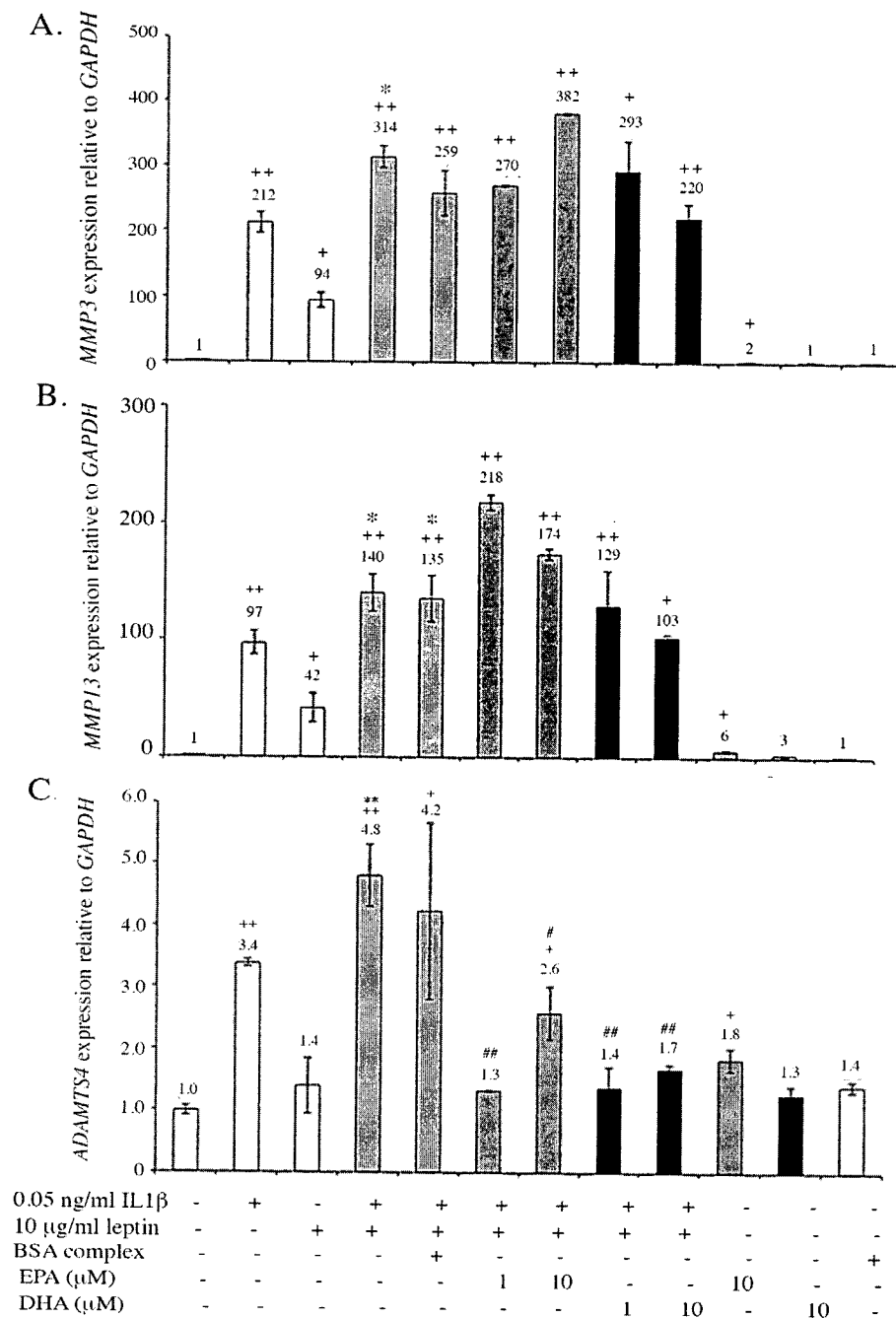
เมื่อทำการกระตุ้นการแสดงออกของ catabolic factors ทั้ง 3 ชนิดด้วย IL-1beta และ leptin พบว่าทั้ง EPA และ DHA ไม่มีผลลดการกระตุ้นการแสดงออกของทั้งยีน *MMP3* และ *MMP13* ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin (รูป 9) ซึ่งผลสอดคล้องกับการหลั่งของเอนไซม์ *MMP3* และ *MMP13* (รูป 10, 11) เป็นที่น่าสนใจว่าทั้ง EPA และ DHA สามารถลดการแสดงออกของยีน *ADAMTS4* ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-1beta และ leptin ได้ (รูป 9) ซึ่งผลสอดคล้องกับระดับการหลั่งของเอนไซม์ *ADAMTS4* ออกมาสู่ น้ำเพาะเลี้ยง (รูป 10, 11)

จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ในสภาวะปกติที่ HACs ไม่ถูกกระตุ้นด้วย cytokine นั้น EPA สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้โดยการกระตุ้นการสร้างของเอนไซม์ *MMP13* และ *ADAMTS4* (3.5 และ 1.8 เท่าเมื่อเทียบกับ control ตามลำดับ) แต่ระดับการกระตุ้นนั้นต่ำกว่าที่ IL-1beta และ leptin กระตุ้นได้ (8 และ 4 เท่าเมื่อเทียบกับ control ตามลำดับ) ในขณะที่ DHA ไม่มีผล นอกจากนั้นในสภาวะที่ HACs ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin พบว่าทั้ง EPA และ DHA สามารถยับยั้งผลของ cytokines ทั้งคู่ต่อการกระตุ้นการสร้าง *ADAMTS4* ทั้งในระดับยีนและโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ แต่ n-3 PUFAs ทั้งสองชนิดไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ *MMP3* และ *MMP13* ได้ ดังนั้นความสามารถของ EPA และ DHA ในการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอาจเกิดเนื่องจากความสามารถในการยับยั้งการสร้าง *ADAMTS4* ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin นี้เอง โดย intracellular signaling ที่เกี่ยวข้องกับทั้งผลการเสริมฤทธิ์ของ leptin กับ IL-1beta ต่อการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และ intracellular signaling ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งฤทธิ์ของ IL-1beta และ leptin ของ EPA/DHA จะถูกศึกษาต่อไปในโมเดล HACs



รูปที่ 8 แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ anabolic factors ในการสร้าง ECM molecules ใน HACs ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin ได้แก่ การแสดงออกของยีน COL2A1/COL1A1 ratio (A), และ ACAN (B)

+ : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

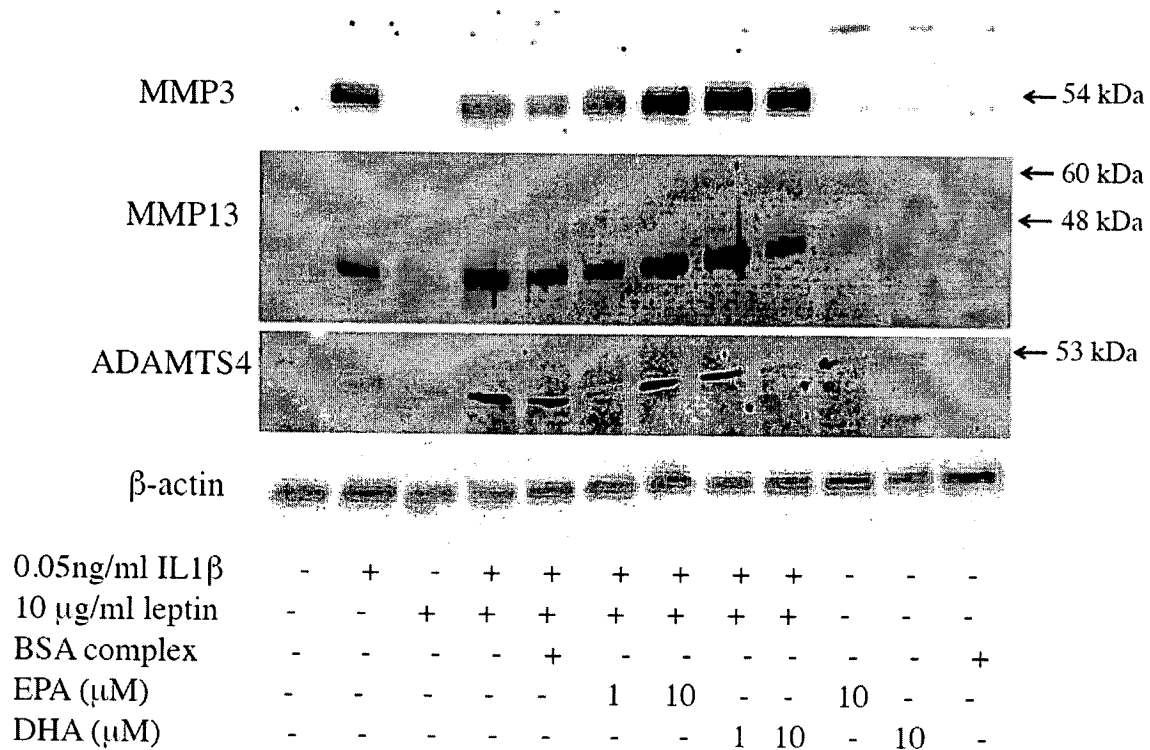


รูปที่ 9 แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ anabolic factors ในการสร้าง ECM molecules ใน HACs ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1beta และ leptin ได้แก่ การแสดงออกของยีน MMP3(A), MMP13 (B) และ ADAMTS4 (B)

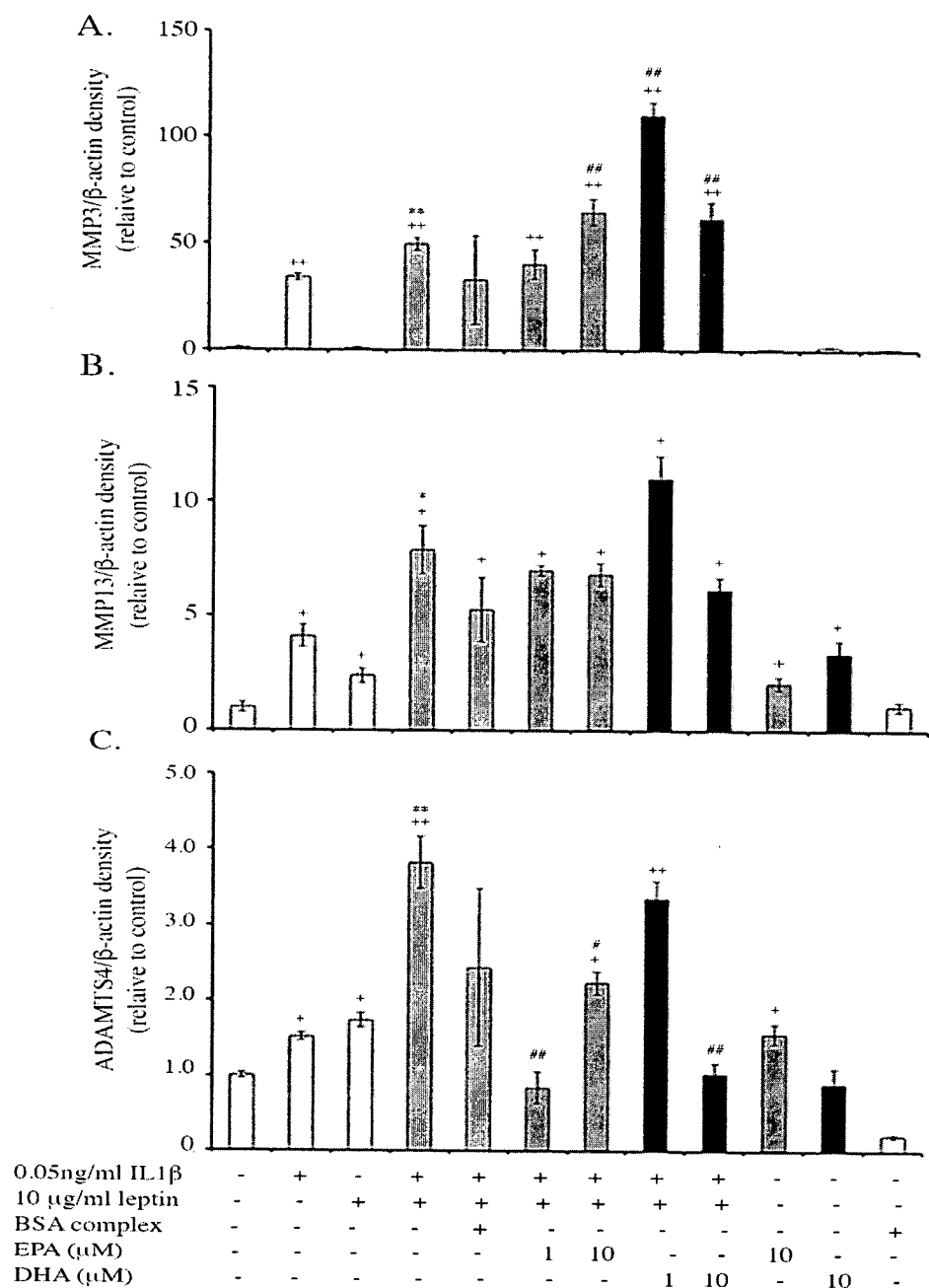
+ : แสดงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

* : แสดงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

: แสดงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta+leptin treatment (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)



รูปที่ 10 แสดงผลของ EPA และ DHA ต่อการหลั่งของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย ECM molecules ใน HACs ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β และ leptin อันได้แก่ เอนไซม์ MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 ซึ่งวัดโดยวิธี western blot



รูปที่ 11 แสดงผล band density ของเอนไซม์ MMP3 (A), MMP13 (B) และ ADAMTS4 (C) ในน้ำเพาะเลี้ยง HACs ที่ถูกกระตุ้นด้วย EPA และ DHA ในสถานะที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β และ leptin

+ : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1β treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1β+leptin treatment (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

3. Intracellular signaling ใน HACs ที่เกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์แบบ synergistic ของ leptin ต่อ IL-1beta และผลของ EPA และ DHA ต่อการยับยั้ง intracellular signaling นั้น

3.1 กลไกการเสริมฤทธิ์ของ leptin ต่อ IL-1beta ผ่านการกระตุ้น intracellular signaling ใน HACs

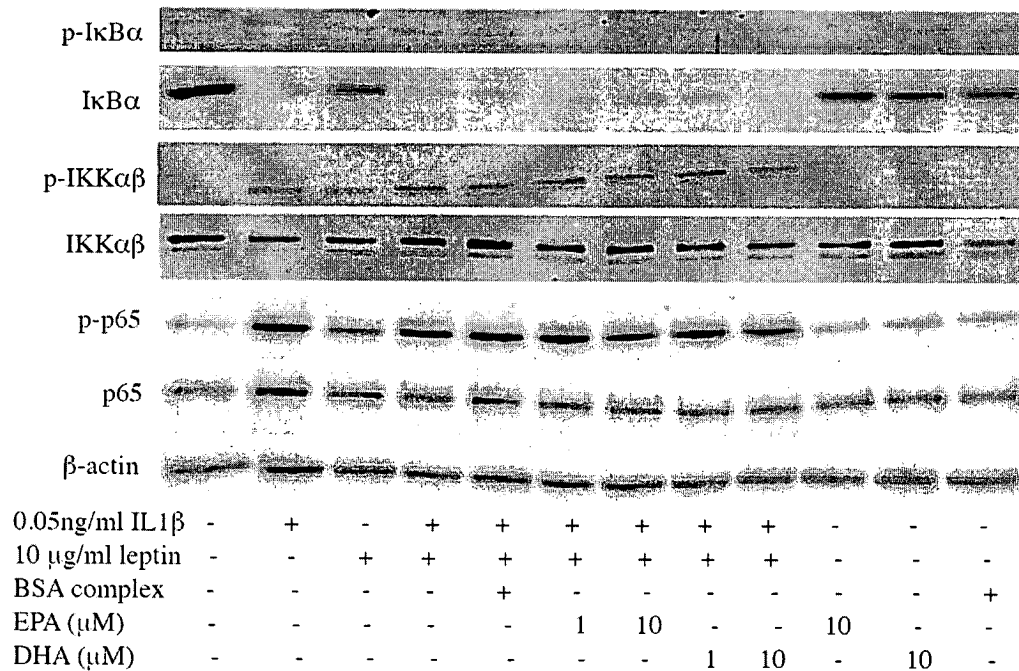
ในการศึกษานี้ HACs ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการเก็บ cell lysate และตรวจหาระดับการแสดงออกของ intracellular signaling molecules ได้แก่ IKK α , IKK β , p65 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น NF κ B pathway และ ERK, JNK, p38 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น MAPK pathway โดยทำการตรวจวัดทั้ง active form หรือ phosphorylated form และ total form ซึ่งทั้ง 2 signaling pathways เป็นที่ทราบกันดีว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น catabolic factors ต่างๆใน HACs โดยพบว่า IL-1beta นั้นสามารถกระตุ้น NF κ B pathway ดังจะพบการแสดงออกที่สูงขึ้นของทั้ง p-IKK α , p-p65 (13 เท่าและ 6.8 เท่าเมื่อเทียบกับ control ตามลำดับ) และ 10 μ g/ml leptin ก็สามารถกระตุ้น pathway ดังกล่าวได้เช่นเดียวกันแต่ได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ IL-1beta (4 เท่าและ 4.2 เท่าเมื่อเทียบกับ control ตามลำดับ) (รูป 12) โดยพบว่าเมื่อทำการทรีทร่วมกันระหว่าง IL-1beta และ leptin พบว่า leptin สามารถเสริมฤทธิ์ต่อ IL-1beta ในการกระตุ้น NF κ B pathway ได้ ดังจะเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ p-IKK α และ p-p65 ถึง 20 และ 7.8 เท่าเมื่อเทียบกับ control

ในส่วนของ MAPK pathway ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ IL-1beta สามารถกระตุ้นทั้ง p-ERK, p-JNK และ p-p38 ได้ (1.5, 24 และ 5 เท่าเมื่อเทียบกับ control) (รูป 13) และ leptin ก็สามารถกระตุ้น signaling molecules ทั้ง 3 ตัวได้เช่นกัน แต่ในอัตราที่น้อยกว่า IL-1beta (1.4, 4.3 และ 2.5 เท่าเมื่อเทียบกับ control ตามลำดับ) และพบว่า leptin นั้นสามารถเสริมฤทธิ์ต่อ IL-1beta ในการกระตุ้นเฉพาะ p-JNK เท่านั้น (42 เท่าเมื่อเทียบกับ control) แต่ไม่พบใน p-ERK และ p-p38 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า supra-pathological leptin สามารถกระตุ้นทั้ง NF κ B และ MAPK pathways ได้เช่นเดียวกับ IL-1beta แต่ในระดับที่ต่ำกว่า และ leptin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL-1beta ในการกระตุ้น NF κ B pathway และ MAPK pathway ผ่าน p-JNK การเสริมฤทธิ์นี้จึงส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้าง catabolic factors ที่เพิ่มขึ้นใน HACs ได้

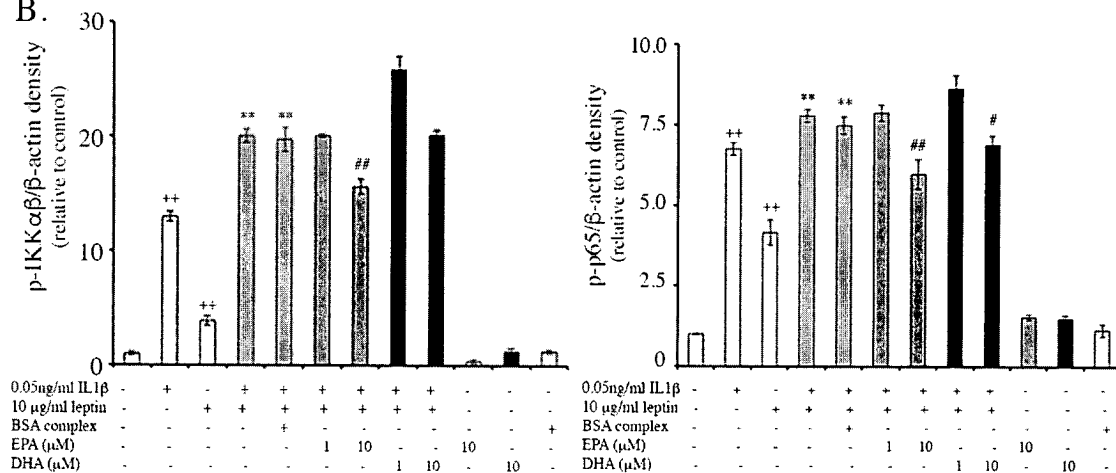
3.2 กลไกการยับยั้ง intracellular signaling ของ EPA และ DHA ใน HACs ที่ถูกกระตุ้นด้วย leptin และ IL-1beta

จากผลการทดลองพบว่า leptin สามารถเสริมฤทธิ์ต่อ IL-1beta ในการกระตุ้น NF κ B pathway ผ่าน p-IKK α และ p-p65 (20 และ 7.8 เท่าเมื่อเทียบกับ control) และยังสามารถเสริมฤทธิ์การกระตุ้น MAPK pathway ผ่าน p-JNK (42 เท่าเมื่อเทียบกับ control) เป็นที่น่าสนใจว่า EPA นั้นสามารถยับยั้งการกระตุ้นของ IL-1beta และ leptin ผ่าน p-p65 และ p-JNK ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 μ M (6 และ 30 เท่าเมื่อเทียบกับ control) เช่นเดียวกับ DHA ที่ความเข้มข้น 10 μ M โดยพบว่าสามารถลดการกระตุ้น p-p65 และ p-JNK เหลือ 6.8 และ 36 เท่าเมื่อเทียบกับ control (รูป 12, 13)

A.



B.

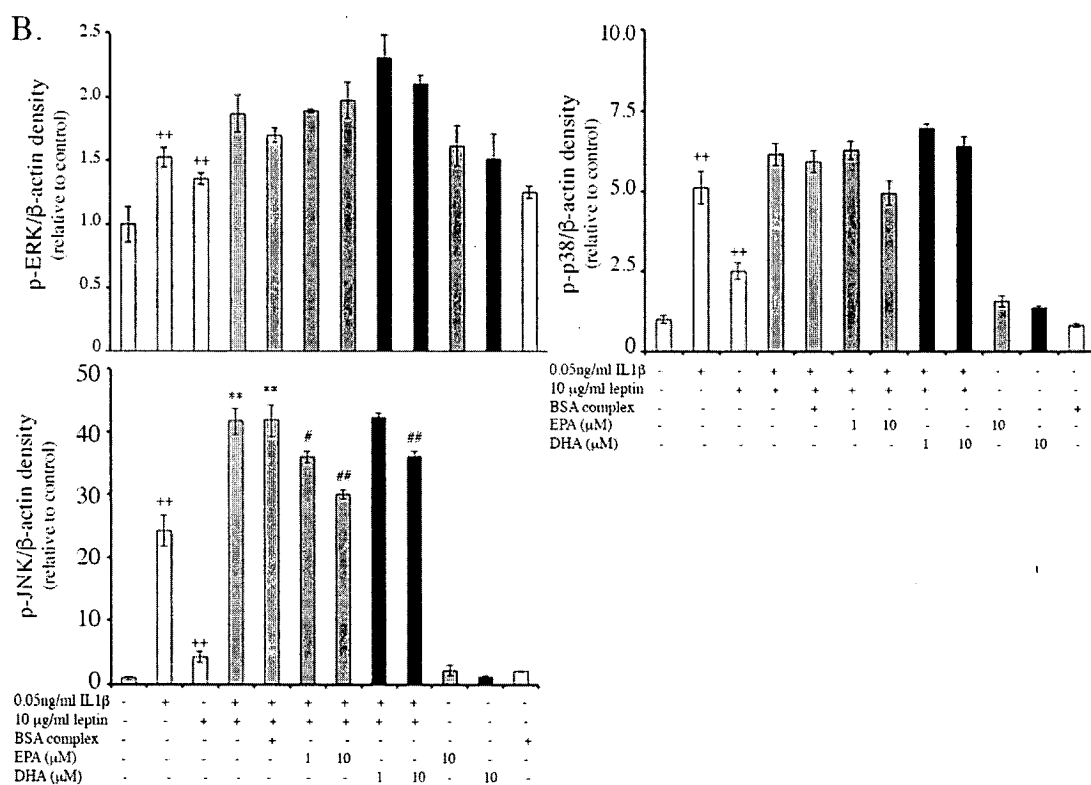
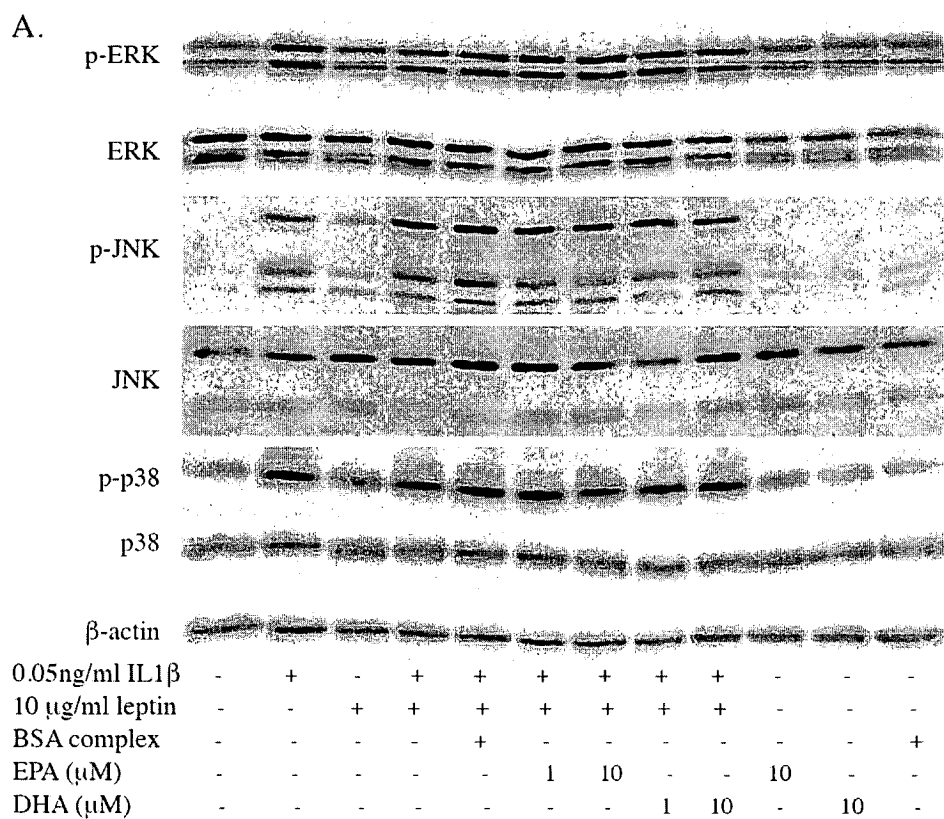


รูปที่ 12 แสดงผลของการกระตุ้น NFKB pathway โดย IL-1beta และ/หรือ leptin และการยับยั้งของ EPA และ DHA ต่อการกระตุ้นดังกล่าว โดยการเพาะเลี้ยง HACs ในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการตรวจวัดโดยวิธี western blot: (A) การกระตุ้น NFKB pathway ผ่าน IKBα, IKKαβ, p65 และ (B) band density ของ signaling molecules ดังกล่าว

+ : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta+leptin treatment (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)



รูปที่ 13 แสดงผลของการกระตุ้น MAPK pathway โดย IL-1beta และ/หรือ leptin และการยับยั้งของ EPA และ DHA ต่อการกระตุ้นดังกล่าว โดยการเพาะเลี้ยง HACs ในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการตรวจวัดโดยวิธี western blot: (A) การกระตุ้น MAPK pathway ผ่าน EPK, JNK, P38 และ (B) band density ของ signaling molecules ดังกล่าว

+ : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta treatment (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IL-1beta+leptin treatment (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) คือโรคข้อที่พบมากที่สุดและสามารถถูกบ่งชี้ได้จากความไม่สมดุลกันของการสร้างและการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน[25, 26] ในสภาวะโรคข้อเสื่อมนั้น ทั้งเยื่อหุ้มข้อ และเซลล์กระดูกอ่อนสามารถสร้าง inflammatory cytokines ได้แก่ IL1 β และ TNF α รวมไปถึง chemokines และ inflammatory mediators ต่างๆได้ โดยสามารถตรวจพบปริมาณที่เพิ่มขึ้นของสารเหล่านี้ในน้ำไขข้อของผู้ป่วย[26] โดยสารเหล่านี้สามารถกระตุ้น activate stress-induced และ inflammation-induced signaling, transcriptional, and posttranscriptional events ที่จะเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงไปของ phenotype ของกระดูกอ่อน ทำให้เกิด apoptosis และการเปลี่ยนแปลงการแสดงของยีนต่างๆรวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น catabolic genes ได้แก่ MMPs และ ADAMTS4, 5[27]

โรคอ้วนถูกเชื่อว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักของการเป็นโรคข้อเสื่อมและการดำเนินไปของโรคทั้งในข้อที่รับน้ำหนักและไม่ได้รับน้ำหนัก นอกจากแรงกระทำที่มีต่อข้อมากขึ้น สาร adipokine ที่เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคอ้วน และเกี่ยวข้องกับการอักเสบทั่วร่างกาย ยังอาจจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกได้โดยตรง[28] leptin ซึ่งเป็น adipokine ชนิดหนึ่ง ได้รับความสนใจอย่างยิ่งว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเสื่อมของกระดูกอ่อน โดยพบว่ามันมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในทั้งน้ำไขข้อของผู้ป่วย OA (4.4-28.5 ng/ml)[23, 24] และเพิ่ม ระดับสูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วย Rheumatoid arthritis (RA) (24.86 \pm 26.41 ng/dl) [29] นอกจากนั้น หลายนเนื้อเยื่อในบริเวณข้อ ได้แก่ synovium, osteophytes, meniscus และกระดูกยังสามารถเพิ่มการสังเคราะห์ leptin และ receptor ของมัน (OB-Rb) ได้อีกด้วย[30-33]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับผลของ leptin พบว่า ในปี 2007 Simopoulou และคณะ รายงานว่า 100ng/ml leptin สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ MMP9 และ MMP13 ได้ทั้งในเซลล์กระดูกอ่อนที่แยกจากกระดูกอ่อนปกติและจากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม[30] ในทางตรงกันข้าม ในปี 2011 Amy L. และคณะพบว่า 1-100ng/ml leptin อย่างเดียวและทั้งร่วมกับ IL1 β ไม่มีผลต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยศึกษาในกระดูกอ่อนหนู[34] และในปี 2009 Katriina V และคณะก็ยังพบอีกว่า leptin อย่างเดียวและทั้งร่วมกับ IL1 β สามารถกระตุ้นการสร้าง NO, PGE2, IL-6, และ IL-8 จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมนุษย์ที่เป็นโรคข้อเสื่อมได้[35] นอกจากนั้นในปี 2011 Wang Hui และคณะยังรายงานว่า leptin ทั้งอย่างเดียวและทั้งร่วมกับ IL1 β สามารถกระตุ้นการสลายของคอลลาเจนออกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนวัวได้ โดยการเพิ่ม collagenolytic และ gelatinolytic activity แต่พบว่า leptin ที่ใช้มีความเข้มข้นถึง 25 μ g/ml ซึ่งถือว่าเป็น supra-pathological concentration[36] ดังนั้น leptin ที่ supra-pathological concentration อย่างเดียวและทั้งร่วมกับ IL1 β น่าจะมีผลกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อย่างไรก็ตาม ผลของ pathological concentration leptin (4.4-28.5 ng/ml) หรือผลร่วมกับ IL1 β ต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้นไม่ค่อยได้รับการศึกษา และผลที่ถูกรายงานที่ไม่สอดคล้องกันอาจเกิดได้จากการตอบสนองต่อ leptin ที่แตกต่างกันของเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้จากการแยกออกมาด้วย enzyme treatment และเซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกห้อมล้อมไปด้วยเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน นอกจากนั้น ระยะของโรคข้อเสื่อมของตัวอย่างที่นำมาศึกษาก็อาจจะมีผล และการเพาะเลี้ยงตัวอย่างไม่ว่าจะเป็นสภาพที่มีหรือไม่มี serum ก็อาจส่งผลเช่นกัน รวมถึง species ของตัวอย่างที่แตกต่างกันก็อาจส่งผลให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันเช่นกัน

เซลล์กระดูกอ่อนหมูถูกรายงานว่ามีการแสดงออกของ receptor ของ leptin (OB-Rb)[37] ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงทำการศึกษาในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหมู โดยศึกษาผลของ leptin ที่ pathological concentration (100ng/ml) และที่ supra-pathological concentration (1-10 μ g/ml) ต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในสภาวะที่เพาะเลี้ยงที่ไม่มี serum นอกจากนั้นกลไกและการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องจะถูกศึกษาในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ที่แยกได้จากกระดูกอ่อนปกติ ผลการทดสอบพบว่า 10 μ g/ml ของ leptin อย่างเดียวและในสภาวะร่วมกับ IL1 β สามารถกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ แต่ว่า leptin ที่ความเข้มข้นน้อยกว่านี้ไม่มีผล โดยผลที่ได้นั้นพบว่าน้อยกว่าที่ IL1 β อย่างเดียวหรือในสภาวะร่วมกับ OSM สามารถกระตุ้นได้ ในส่วนของกลไกพบว่า leptin ที่ 100 ng/ml สามารถกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ ADAMTS4 ได้แต่ความสามารถนี้ไม่เพียงพอต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ในขณะที่ supra-pathological concentration (10 μ g/ml) นั้นสามารถกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ทั้ง MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 ได้ส่งผลให้สามารถสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ อย่างไรก็ตาม leptin ที่ความเข้มข้นนี้ยังกระตุ้นการสลายของกระดูกอ่อนได้น้อยกว่า IL1 β นอกจากนี้ leptin ที่ 10 μ g/ml ยังสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL1 β ในการกระตุ้นการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้โดยการเพิ่มการหลั่งของ MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 จากการศึกษาที่ใช้ทั้งกระดูกอ่อนหมูและเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนคน พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลล์ต่าง species ก็ยแต่หากอยู่ในสภาวะเดียวกัน (ในที่นี้คือ non-OA) จะให้ผลต่อ leptin ในทิศทางเดียวกัน ดังมีการรายงานว่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมักมีการเพิ่มขึ้นของ OB-Rb[38] ดังนั้นตัวอย่างกระดูกอ่อนที่มีระดับโรคข้อเสื่อมที่แตกต่างกันอาจตอบสนองต่อ leptin ได้ในระดับต่างกัน โดยเซลล์กระดูกปกติจะตอบสนองได้น้อยกว่าที่เป็นโรคข้อเสื่อม แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติสามารถตอบสนองต่อ leptin ได้ในระดับที่มากกว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม[31] นอกจากนี้ในอีกทางหนึ่ง ยังพบว่าผลของ leptin ต่อการหลั่งของเอนไซม์ MMP13 จากเซลล์กระดูกอ่อนยังแปรผันกับ BMI ของผู้บริจาคเซลล์อีกด้วย[39] ดังนั้นในภาพรวมหลายปัจจัยมากที่ส่งผลต่อระดับการตอบสนองต่อ leptin ของเซลล์กระดูกอ่อน

ในส่วนของการส่งสัญญาณภายในเซลล์นั้น พบว่า 10 μ g/ml leptin สามารถกระตุ้นทั้ง NF κ B และ MAPKs ได้แก่ ERK, JNK และ p38 ได้เช่นเดียวกับ IL1 β โดย leptin สามารถกระตุ้นได้ในระดับที่ต่ำกว่า IL1 β นอกจากนั้นยังพบว่าการเสริมฤทธิ์ของ leptin ต่อ IL1 β เกิดผ่านการเสริมการส่งสัญญาณผ่าน NF κ B และ JNK ของ IL1 β ซึ่งก่อนหน้านี้มีการรายงานว่ leptin สามารถกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ MMPs ผ่านการกระตุ้น STAT1, STAT3, STAT5, MAPK (JNK, ERK, p38), Akt และ NF- κ B[36] นอกจากนั้นกลุ่มนี้ยังรายงานว่ JNK inhibitor นั้นไม่สามารถยับยั้งผลของ leptin ในการกระตุ้นการหลั่งของ MMP13 ได้ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ของเรา

เนื่องจากก่อนหน้านี้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายถึงผลทางดีของ ทั้ง EPA และ DHA โดยพบว่า EPA และ DHA สามารถลดการแสดงแวกในระดับยีนของ ADAMTS4, ADAMTS5, MMP3, MMP13, COX-2, IL-1 α , IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์กระดูกอ่อนวัวที่ถูกกระตุ้นด้วย IL1 α ได้[40] นอกจากนั้น n-3 PUFAs ทั้ง 2 ชนิดยังถูกรายงานว่สามารถยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนวัวที่ถูกกระตุ้นด้วย IL1 β ได้[41] อย่างไรก็ตามผลของ n-3 PUFAs ชนิด EPA และ DHA ต่อการต้านการสลายของเนื้อเยื่อกระดูก

อ่อนที่กระตุ้นด้วย leptin+IL1 β ยังไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบและพบว่า ทั้ง 10 μ M EPA และ DHA สามารถยับยั้งการกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน NF-KB และ JNK ของ leptin+IL1 β ได้ส่งผลให้การหลั่งของเอนไซม์ ADAMTS4 แต่ไม่สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์ MMP3 และ MMP13 ได้ อย่างไรก็ตามผลนี้ของทั้ง EPA และ DHA ทำให้สามารถตรวจสอบผลการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในโมเดลเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหมูได้ อย่างไรก็ตาม ในส่วนของผลของ 10 μ M EPA ต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้นจะต้องระวัง เนื่องจากมันสามารถกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ MMP3 และ ADAMTS4 ได้ ทำให้เกิดการสลายของ GAG จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ ซึ่งก่อนหน้านี้มีการรายงานว่า 10 μ M EPA นั้นให้ผลน้อยกว่าความเข้มข้นที่น้อยกว่า (0.1, 1 μ M) ในการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ดังนั้นแม้ว่าทั้ง EPA และ DHA จะมีผลในการยับยั้งการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ แต่ปริมาณที่เหมาะสมในการใช้จะต้องได้รับการศึกษาอย่างถี่ถ้วนต่อไป

สรุป

ผลของ pathological และ supra-pathological concentrations ของ leptin อย่างเดียวหรือร่วมกับ IL1 β ต่อการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาโดยใช้ porcine cartilage explant และเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่แยกได้จากกระดูกอ่อนปกติ พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันในทุก 2 โมเดล กล่าวคือ 10 μ g/ml leptin สามารถกระตุ้นการสลายของกระดูกอ่อนได้ผ่านการกระตุ้นสัญญาณ NFKB และ MAPKs cascades ได้แก่ ERK, JNK และ p38 ได้ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์สลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้แก่ MMP3, MMP13 และ ADAMTS4 นอกจากนั้น supra-pathological concentrations ของ leptin ยังสามารถเสริมฤทธิ์กับ IL1 β ในการสลายกระดูกอ่อนได้ผ่านการเสริมฤทธิ์การกระตุ้นสัญญาณ NFKB และ JNK ทำให้มีการหลั่งของเอนไซม์ทั้ง 3 เพิ่มขึ้น เป็นที่น่าสนใจว่า n-3 PUFAs ชนิด EPA และ DHA นั้น สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ leptin ร่วมกับ IL1 β ในการกระตุ้นการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ โดยยับยั้งผ่านการหลั่งของเอนไซม์ ADAMTS4

เอกสารอ้างอิง

- [1] Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT), *Ann Rheum Dis* 2003;62:1145–55.
- [2] Dennison E, Cooper C. Osteoarthritis: epidemiology and classification. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (eds), *Rheumatology*. Mosby, Toronto, 2003;1781–91.
- [3] Jiang L, Rong J, Wang Y, Hu F, Bao C, Li X et al. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis, *Joint Bone Spine* 2011;78:150–5.
- [4] Jiang L, Tian W, Wang Y, Rong J, Bao C, Liu Y et al. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis, *Joint Bone Spine* 2012;79:291–7.
- [5] Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review, *Ann Rheum Dis* 2010;69:761–5.
- [6] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–32.
- [7] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 1994;372:425–32.
- [8] Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 2007;4:1–13.
- [9] Coppari R, Bjorbaek C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:692–708.
- [10] Gualillo O. Further evidence for leptin involvement in cartilage homeostases. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:857–60.
- [11] Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3118–29.
- [12] Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism, *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:872–83.

- [13] Yaykasli KO, Hatipoglu OF, Yaykasli E, Yildirim K, Kaya E, Ozsahin M, Uslu M, Gunduz E. Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF-KB signaling pathways in human chondrocytes, *Cell Biol Int*. 2014 Jul 15.
- [14] Vuolteenaho K, Koskinen A, Moilanen T, Moilanen E. Leptin levels are increased and its negative regulators, SOCS-3 and sOb-R are decreased in obese patients with osteoarthritis: a link between obesity and osteoarthritis, *Ann Rheum Dis* 2012;71:1912–3.
- [15] Gandhi R, Takahashi M, Syed K, Davey JR, Mahomed NN. Relationship between body habitus and joint leptin levels in a knee osteoarthritis population, *J Orthop Res* 2010;28:329–33.
- [16] Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Päiväranta U, Moilanen T, Moilanen E. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production, *Mediators Inflamm*. 2009;2009:345838. doi: 10.1155/2009/345838.
- [17] Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA, *Proc Nutr Soc*. 2010;13:232–243.
- [18] Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *Am J Clin Nutr*. 2006;13(Suppl 6):1505–1519.
- [19] Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution, *Chem Rev*. 2011;13:5922–5943.
- [20] Z. Zainala, A.J. Longman, S. Hurst, K. Duggan, B. Caterson, C.E. Hughes, J.L. Harwood, Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage* 2009, 17 : 896–905.
- [21] Angus KT Wann, Jiten Mistry, Emma J Blain, Adina T Michael-Titus, and Martin M Knight. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce interleukin-1 β -mediated cartilage degradation, *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(6): R207.
- [22] Buckley JD, Howe PR. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids, *Obes Rev*. 2009;10:648–659.
- [23] Dumond H1, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottier P. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 3118–29.
- [24] Simopoulou T1, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, Tsezou A. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between

advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15: 872–83

[25] Kraus VB. Pathogenesis and Treatment of Osteoarthritis. *Medical Clinics of North America*. 1997; 81(1):85–112.

[26] Poole, AR.; Guilak, F.; Abramson, SB. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. In: Moskowitz, RW.; Altman, R.; Hochberg, M.; Buckwalter, J.; Goldberg, VM., editors. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*. 4th Ed.. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007; 27-49.

[27] Goldring MB, Otero M, Plumb DA, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. 2011; 21:202–220.

[28] Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50:838–851.

[29] Mayada Abdalla, Dina Effat, Marwa Sheta, Wessam Eissa Hame. Serum Leptin levels in Rheumatoid arthritis and relationship with disease activity. *The Egyptian Rheumatologist*. 2014; 1–5.

[30] Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3118–29.

[31] Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:872–83.

[32] Yaykasli KO, Hatipoglu OF, Yaykasli E, Yildirim K, Kaya E, Ozsahin M, Uslu M, Gunduz E. Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF- κ B signaling pathways in human chondrocytes. *Cell Biol Int*. 2014 Jul 15.

[33] Vuolteenaho K, Koskinen A, Moilanen T, Moilanen E. Leptin levels are increased and its negative regulators, SOCS-3 and sOb-R are decreased in obese patients with osteoarthritis: a link between obesity and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1912–3.

[34] Amy L. McNulty, Michael R. Miller, Shannon K., and Farshid Guilak. The Effects of Adipokines on Cartilage and Meniscus Catabolism. *Connect Tissue Res*. 2011 ; 52(6): 523–533. doi:10.3109/03008207.2011.597902

[35] Katriina Vuolteenaho, Anna Koskinen, Meiju Kukkonen, Riina Nieminen, Unto Pääväranta, Teemu Moilanen, Eeva Moilanen. Leptin Enhances Synthesis of Proinflammatory Mediators in Human Osteoarthritic Cartilage—Mediator Role of NO in Leptin-Induced PGE₂, IL-6, and IL-8 Production. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation. 2009; doi:10.1155/2009/345838

[36] Wang Hui, Gary J Litherland, Martina S Elias, Gareth I Kitson, Tim E Cawston, Andrew D Rowan, David A Young. Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis*. 2011;71(3):455-62. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200372.

[37] Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept*. 2000 Aug 25; 92(1–3):73–78.

[38] Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, Tsezou A. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Aug; 15(8):872–883.

[39] Stéphane Pallu, Pierre-Jean Francin, Cécile Guillaume, Pascale Gegout-Pottie, Patrick Netter, Didier Mainard, Bernard Terlain, Nathalie Presle. Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010, 12:R112

[40] Z. Zainala, A. J. Longman, S. Hurst, K. Duggan, B. Caterson, C. E. Hughes, J. L. Harwood. Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis, Osteoarthritis and Cartilage. 2009; 17: 896-905.

[41] Angus KT Wann, Jiten Mistry, Emma J Blain, Adina T Michael-Titus, Martin M Knight. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce interleukin-1 β -mediated cartilage degradation. *Arthritis Research & Therapy* 2010; 12:R207

Inhibitory effect of EPA and DHA on cartilage degradation induced by leptin and interleukin-1-beta

Thanyaluck Phitak (thanyaluck.phitak@cmu.ac.th)¹,
Kanchanit Boonmaleerat (kanchanit_B@cmu.ac.th)¹,
Peraphan Pothacharoen (peraphan.pothacharoen@gmail.com)¹,
Dumnoensun Pruksakorn (dumnoensun@hotmail.com)²,
Prachya Kongtawelert (prachya.kongtawelert@gmail.com)^{1*}

* **Correspondence:** prachya.kongtawelert@gmail.com

¹Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and Stem Cells, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, 110 Intravarorot Road, Sripoom, Chiang Mai 50200, Thailand Tel: +6653 945 325, Fax: +6653 894 188

²Department of Orthopedics, Musculoskeletal Research Laboratory, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, 110 Intravarorot Road, Sripoom, Chiang Mai 50200, Thailand.

Acknowledgements

This study was supported by Thailand Research Fund grant TRG5880040 (to TP) for all experimental costs. All experiments were performed in Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and Stem Cells, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

The authors declare that they have no conflict of interests.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and is characterized by an imbalance in the degradation and synthesis of articular cartilage. IL1 β and TNF α , were found to be major cytokines involved in OA progression. Obesity has been believed as an important risk factor for OA development and progression not only load-bearing joints but also others non-load-bearing joints. The increased adipokine, leptin, was focused as a link of obesity and OA.

The effect of pathological (100ng/ml) or supra-pathological (10 μ g/ml) concentrations of leptin alone or in combination with IL1 β was investigated in porcine cartilage explant. All involved mechanism and intracellular signaling were examined in human articular chondrocytes (HACs). Moreover the inhibitory effect of EPA or DHA on cartilage damage was also investigated.

Leptin (10 μ g/ml) alone or in combination with IL1 β could induce cartilage destruction but lower concentrations used in the study had no effect. Leptin activated NF κ B and MAPK cascades ERK, JNK and p38 in HACs led to the induction of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 secretions. The combination effect could further induce those enzymes through the additive effect on activation of NF κ B and JNK. Interestingly, both EPA and DHA could inhibit cartilage damage induced by leptin+ IL1 β by reduce the activation of NF κ B and JNK led to the decrease of ADAMTS4 secretion.

Altogether this study found that only supra-pathological concentration of leptin could induce normal cartilage destruction whereas pathological one could not. Moreover, only this level of leptin showed additive effect with IL1 β on the cartilage damage. This combination effect was inhibited by n-3 PUFAs, EPA and DHA. To understand more about the link of leptin and OA, the effect of different level of leptin on metabolism in many states of OA cartilage should be further investigated.

Key words: Osteoarthritis, Chondrocyte, IL1 β , leptin

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a most common disability of the musculoskeletal system found in elderly people worldwide. The cost of OA treatment worldwide is very high. Nowadays average age of global population increases and many countries are entering aging society. Thus incidence of OA is higher according to the increase of elderly population. Moreover, not only elderly population, but increasing obese population is also a cause of high incidence of OA. Nowadays OA can be treated in many ways for example using anti-inflammatory drugs, behavior modification, or joint replacement surgery (1). However, the new and more efficient treatment is still needed.

The characteristic of OA pathogenesis is an imbalance of synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM) molecules in cartilage tissue including type II collagen, hyaluronan (HA) and aggrecan. An increase of catabolic factors including protease enzymes especially matrix-metalloproteinases (MMPs) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs) is a major cause of cartilage destruction. It is well documented that all catabolic factors are induced by pro-inflammatory cytokines, mainly IL1 β , TNF α and IL6. There are many risk factors for OA including overweight condition. The load bearing joints of obese patients such as knee are commonly found to have OA condition. It is believed that the overweight induces mechanical force in the local joints especially weight-bearing joints (2-4). However, it had been reported that obesity was also a risk of OA in others non-load bearing joints such as in fingers and hands (5), which cannot be explained by the increase of mechanical force. Thus it is possible that obesity is not only a risk factor for local OA but also systemic OA. Cytokines, which are systematically increased in obese condition might be involves.

Leptin is a 16-kDa hormone that synthesized from adipocytes. It is responsible for food intake and energy expenditure (6). It binds to its receptor (OB-Rb) and induces cellular responses through JAK-STAT, PI3K, NF- κ B, PKC and MAPK (7). The circulating level of leptin was found increase in obesity and the increase level correlated with body mass index (BMI) (8). The increased leptin level in obesity failed to control food intake and energy expenditure due to the leptin resistant condition in hypothalamic regulatory area (9). Not only circulating leptin, but leptin level in synovial fluid also correlated with BMI. Interestingly, not only adipocytes, chondrocytes and others tissue in joint including synovium, osteophytes, meniscus and bone could also synthesize both leptin and it's receptor (OB-Rb) (10-13). Moreover, many studies had strongly suggested that the sensitivity to leptin in peripheral tissues was differently regulated than in the hypothalamus (13-15). In chondrocytes, leptin seemed to induce inflammation and pushed balance toward destruction. Leptin had been found to induce the production of pro-inflammatory factors and catabolic mediators acknowledged in the pathogenesis of OA, such as IL1 β , IL6, IL8, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), NO and prostaglandin E2 (PGE2) by articular chondrocytes (11, 16, 17). Moreover, in 2011, it had been reported that leptin with supra-pathological concentration (10 μ g/ml) alone and in combination with IL1 β enhanced production of MMP-1, MMP-3, and MMP-13 in human OA cartilage (18). However, in the same year, another group reported that leptin at concentrations 1-100 ng/ml had no effect on the breakdown of cartilage tissues (19). Therefore, concentration of leptin in synovial fluid might be important to indicate the effect of leptin on chondrocytes. Moreover, the studies that measured the level of leptin in synovial fluid of OA-affected joints found that the mean/median concentration was lower than 100 ng/ml (4.4-28.5 ng/ml) (10, 20-22). Thus the effect of pathological concentration leptin on cartilage metabolism or on IL-1 β induced cartilage destruction is still imprecise. The recent study compared the effect of pathological concentration

(100 ng/ml) and supra-pathological concentration (10 µg/ml) of leptin on cartilage metabolism. Moreover, the effects of those leptin concentrations on IL-1 β induces cartilage degradation were also elucidated.

In recent years long chain polyunsaturated fatty acids n-3 (n-3 PUFAs), such as eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5; n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6; n-3) has been interested for many researchers because of their beneficial properties on human and animal health. EPA and DHA had been reported to have protective effects in many types of chronic inflammatory conditions, such as: rheumatoid arthritis, asthma, Crohn's disease and psoriasis (23). The anti-inflammatory actions of n-3 PUFAs are connected with their ability to decrease production of pro-inflammatory eicosanoids and cytokines, in detail, n-3 PUFAs compete with arachidonic acid for prostaglandin and leukotriene synthesis at the cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) level (24). Moreover, they are substrates for synthesis of other lipid mediators, such as anti-inflammatory protectins and resolvins (25). Interestingly, the anti-OA effect of EPA and DHA had been shown in both IL1 β -induced chondrocyte (26) and cartilage explant (27) models in the mechanism which the IKK- β /NF- κ B pathway induced by IL1 β may be inhibited. Moreover, they were also found to have a role in prevention of obesity. In animal and human studies had shown that EPA and DHA supplementation may be protective against obesity, and might reduce weight gain in already obese animals and humans (28). It was moreover observed that treatment of obese subjects with n-3 PUFA led to reduced circulating levels of pro-inflammatory cytokines and acute phase proteins (29). Thus because of their beneficial effects on both OA and obesity progression, in this study the effect of EPA and DHA on cartilage degradation induced by IL-1 β and leptin was also investigated.

Materials and methods

1. Reagents

Tissue culture medium and related reagents were purchased from Gibco (Grand Island, NY, United States). Recombinant human IL1 β and leptin were purchased from Peprotech (NJ, US). EPA, DHA and fatty acid free BSA were purchased from SigmaAldrich® (Missouri, US). An RNA extraction kit was purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). A Tetro cDNA™ synthesis kit and 2x Sensifast™ SYBR Lo-Rox mix was purchased from Bioline (London, UK). The antibody against MMP3 (ab53015) antibody was purchased from Abcam (Cambridge, UK). The antibody against MMP13 (MAB3321) was purchased from MERCK (US). Antibodies recognizing the MAPK pathway and NF- κ B signaling were purchased from Cell Signaling (MA, US). Cocktail proteinase inhibitor and phosphatase inhibitor were purchased from Roche (Mannheim, Germany). SuperSignal ECL Chemiluminescent Kit was purchased from Thermo Scientific (IL, US). Other reagents were purchased from Sigma-Aldrich and Invitrogen.

2. Porcine cartilage explants culture and treatment

The metacarpo- and metatarso-phalangeal joints from 20-24 week-old pigs were dissected for the articular cartilage explants model (30). After dissection, the explants were incubated with 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin for 30 minutes. Then they were cultured in serum-free-DMEM at 37 °C and 5% CO₂ overnight. Ten mg/each of three explant pieces were randomly selected and cultured in a 24-well culture plate for 24 h and the media were collected as Day0 media. The explants were then cultured in media containing 0.1-10 µg/ml leptin and/or 10 ng/ml

IL1 β for 8 day. The conditioned media were collected and changed on Day4 and Day8. All conditioned media were stored at -20°C for HA and sGAG analyses. The explants were collected and digested for measurement of uronic acid remaining.

For investigation of EPA and DHA abilities to protect cartilage degradation, the explants were cultured in media containing 10 ng/ml IL1 β +10 μ g/ml leptin in the presence and absence of 1-10 μ M EPA or DHA for 28. Fatty acids were prepared as fatty acid-BSA complex using defatted BSA. The 200 mM fatty acid stocks were prepared in ethanol and mixed with 1.4% defatted BSA in DMEM to get the 5:1 fatty acid:BSA ratio. All solutions were warmed at 37°C before they were mixed together and the mixers were further incubated at 37°C for 3 h a brief pulse of vortex every 10 min. After incubation and the solutions became clear, they were filtered through Millex-GS Syringe Filter Unit (0.2 μ m pore size) and used freshly (27). The conditional media were collected and changed on Day 4, 7, 14, 21 and 28. The explants of untreated control condition were cultured in serum-free-DMEM. BSA complex was prepared as same as the fatty acid-BSA complex except ethanol was used instead of fatty acid solution. It was used as a vehicle control. All experiments were performed in triplicate using tissue from one animal donor and also experimentation was repeated three times independently.

3. Human articular chondrocytes (HACs) culture and treatment

Normal human articular cartilage was obtained with full informed patient consent from the arthroscopic diagnosis of a flat pad syndrome patient at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, (Department of Orthopedic, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand). The ethical approval was approved by the first ethic committee of Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand (the approval code was ORT-2557-02717). HACs were isolated by overnight trypsin digestion at 4 °C and a subsequent 3 h digestion with collagenase at 37 °C. The cells were washed with PBS and then cultured in DMEM containing 10% FCS as high-density primary monolayer cultures until confluence. The HACs at Passage 4 were maintained in serum free DMEM for 24 h prior to incubated with conditional media for 3, 6, 12 and 24 h to collect the cell lysates for measurements of mRNA expressions, for 24 h for the levels of MMP3, MMP13, ADAMTS4 releases into cultured media and for 30 min for the expression level of intracellular signaling molecules.

4. Measurement of Hyaluronic acid (HA) level

To quantify concentration of hyaluronic acid (HA), competitive HA ELISA was used as previously described (31). The maxisorb plate was coated with 100 μ l/well umbilical cord HA at 4 °C overnight. After unbound solution was washed out, 1% BSA was used to block the plate at room temperature for 1 h. After washing, mixture between standard (Healon 0-10,000 ng/ml) or sample with Biotinylated-HA-Binding Protein (1:500 in B-HABP buffer) was added into the well for the binding step at room temperature for 1 h. After incubation step, the plate was washed and incubated with 100 μ l of mouse anti-biotin-conjugated with peroxidase solution (1:2000) at room temperature for 1 h. Then, 100 μ l of peroxidase substrate was added and incubated for 5-10

minutes to develop yellow color. The reaction was stop by 50 µl/well of 4 M H₂SO₄ and the absorbance was measured at 492/620 dual wavelength by microtitre plate reader.

Percentage of HA release was calculated using the following formula: %HA release = [(HA DayX-HA D0)/HA D0]x100.

5. Measurement of sulfated-glycosaminoglycan (sGAG) level

The level of sGAG revel was determined using the dimethylmethylenblue (DMMB) assay as described previously (32) where shark cartilage chondroitin sulfate C (SigmaAldrich®, US) was used as the standard. The DMMB solution was added to the diluted sample, standards and appropriate blank solutions prior to absorbances being read at 525 nm by micro-plate reader spectrophotometer. The percentage of sGAG release was calculated using the same formula as used for HA level.

6. Measurement of the level of uronic acid remaining in explants

The uronic acid content in the cartilage explants were analyzed according to the release of the monosaccharide from glycosaminoglycan in ECM by acid hydrolysis, and the reaction with the carbazole reagent was detected at the maximal adsorption at 540 nm in a microplate reader spectrophotometer (33). The papain-digested samples or glucuronic acid standards were hydrolyzed with the sulfuric acid-borate reagent at 100°C for 15 minutes and cooled down in an ice bath. The carbazole reagent was added, and the reaction took place at 100°C for 15 minutes and then was cooled down in an ice bath. The absorbance was measured at 540 nm by a microplate reader spectrophotometer.

7. Cytotoxicity test

The viability of chondrocytes in explants was investigated by measurement of LDH level in cultured media [5a]. Briefly 100 µl samples were mixed with 625 µl of 1.6 mg/ml β-DPNH in phosphate buffer (PB) and 375 µl 2 mM pyruvate in PB and incubated at 37°C for 30 min. Pyruvate substrate was catalyzed by LDH in sample to lactate. Remaining pyruvate was reacted with 1 ml of 20 mg/dl 2,4-dinitophenyl-hydrazine in 1N HCl at room temperature for 20 min. The reaction was stopped by adding 10 ml of 0.4 N NaOH. The absorbance was measured at 450 nm. LDH level in media that more than 500 U/ml indicated cell death.

HAC viability was tested using the MTT assay. Cells (1x10⁴ cells/well) were plated in a 96-well plate (triplicate) and incubated overnight. Then cells were treated with 0.05 ng/ml IL1β and/or 10 µg/ml leptin in the presence and absence of 1 and 10 µM EPA or DHA for 24 h. After incubation, culture media were discarded, and new culture media containing 10% of 5 mg/ml MTT were added and incubated for 4 h. At the end, 200 µl of DMSO was added into each well to solubilize the formed formazane crystals. The absorbance was measured at 540 nm using a micro-plate reader spectrophotometer. Percent of cell survival was calculated as follows: %survival= [OD of sample/OD of control] x100

8. Measurement of mRNA expression by RT-real time PCR

After treatment, cell lysates were collected using 1% β -mercaptoethanol in lysis buffer. mRNA was extracted using Illustra™ RNASpin Mini RNA Isolation Kits (GE Healthcare). Five hundred ng of mRNA was converted to cDNA using a Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline). Interested genes were amplified using primers shown in Table.1 and 2x Sensifast™ SYBR Lo-Rox Mix (Bioline) with a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reactions were performed for 40 cycles with 95°C for denaturation, 60°C for annealing and 72°C for extension. The data were collected and the fold changes in gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (34).

Table 2.1 The primer sequences used in HAC

Gene	Primer sequences
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTCGT-3'
	R: 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'
<i>ACAN</i>	F: 5'-ACTTCCGCTGGTCAGATGGA-3'
	R: 5'-TCTCGTGCCAGATCATCACC-3'
<i>COL2A1</i>	F: 5'-GGTGGCTTCCATTTTCAGCTATG-3'
	R: 5'-TTGCAGTGGTAGGTGATGTTCTG-3'
<i>COL1A1</i>	F: 5'-CAGCCGCTTCACCTACAGC-3'
	R: 5'-TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC-3'
<i>MMP3</i>	F: 5'-TTTTGGCCATCTCTTCCTC-3'
	R: 5'-TGTGGATGCCTCTTGGGTAT-3'
<i>MMP13</i>	F: 5'-TCCCAGGAATTGGTGATAAAGTAGA-3'
	R: 5'-CTGGCATGACGCGAACAATA-3'
<i>ADAMTS4</i>	F: 5'-GCAACGTCAAGGCTCCTCTT-3'
	R: 5'-CTCCACAAATCTACTCAGTGAAGCA-3'

9. Protein extraction and western blot analysis

After HACs were treated with different conditions, the cells were washed with ice-cold PBS, then cells were collected with 250 μ l of RIPA buffer (1M HEPES, 10% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 4M NaCl, 0.5 M NaF, 100 mM sodium orthovanadate, cocktail proteinase inhibitor and/or phosphatase inhibitor) followed by standing on ice and put into the vortex every 15 minutes for 4 times. The cell lysates were centrifuged at 14,000 x g, 4 °C for 10 minutes. The supernatants were collected and protein level was estimated using the Bio-Rad

protein assay based on the Bradford method. For determination of MMPs production in conditioned media, the conditioned media were concentrated using Amicon™ 10 kDa cut-off membrane centrifugation (MERCK) by centrifugation at 3,500 x g, 15 °C for 20 minutes. Concentrated media or cell lysate supernatant (10 µg protein) was subjected into 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, samples were transferred to a nitrocellulose membrane (MERCK) with a glycine buffer (20 mM Tris base, 0.2 M glycine, 20% (v/v) methanol) by semi-dry blotting. The membranes of conditioned media were blocked with 3% BSA in PBS while the membranes of cell lysate were blocked with 5% skim milk in PBS. Then the proteins of interest were probed overnight at 4 °C with specific antibodies against MMP3 (1:500), MMP13 (1:500), ADAMTS4 (1:500) and β-actin (1:1000) in PBS-containing 0.05% tween-20 or MAPK signaling molecules [ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38] (1:1000) or NFκB signaling molecules [IκBα, p-IκBα, IKKαβ, p- IKKαβ, p65, p-p65] (1:1000) in 1% skim milk in PBS. After incubation with each primary antibody, the membranes were washed with PBS containing 0.05% tween-20 and incubated with secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000) or horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000)) for 1 hour at room temperature. The specific bands were detected by using a SuperSignal ECL Chemiluminescent Kit (Thermo Scientific) and exposed in a Gel Doc Universal Hood II (BioRad). Band density was calculated using TottalLab TL20 analysis software.

10. Data and statistic analyses

The results of all experiments were expressed as mean±SEM of triplicate independent experiments. The statistic types used in this study were t-test and One way ANOVA for multiple comparisons; Turkey's multiple comparison test or LSD. The differences were considered to be significant at P values less than 0.05.

Results

1. Effect of pathological and supra-pathological concentrations of leptin on cartilage metabolism and on IL1β-induced cartilage degradation

To investigate the effect of pathological and supra-pathological concentrations of leptin on cartilage metabolism and on IL1β induced cartilage degradation, the porcine cartilage explants were used as a model. The porcine explants were treated with 0.1 µg/ml (pathological concentration) or 1.0-10 µg/ml (supra-pathological concentrations) in the presence or absence of 10 ng/ml IL1β for 8 day. The conditioned media were collected and changed on Day4 and Day8 of experiment and the level of HA and sGAG releases in the media were measured to indicate the level of degraded ECM molecules. Moreover, at the end of experiment the explants were collected and the uronic acid remaining in the explants were also measured to indicate the level of GAG remaining in cartilage.

It was found that all conditions used in this experiment had no toxic to the cartilage tissue as shown by very low level of LDH release in conditioned media (data not shown). For uronic acid remaining, there was no significant difference between all conditions (Fig.1A). As expected, IL1β could significantly induce HA and sGAG releases from the cartilage tissues when compared to the untreated control (Fig.1B, 1C). Interestingly, only 10 µg/ml leptin (supra-pathological concentrations) could induce the release of sGAG on Day 8 of experiment, but

others concentration could not (Fig.1C). Moreover, only 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin showed additive effect with $\text{IL1}\beta$ induction of HA and sGAG degradations. Although the combination effect of 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin and $\text{IL1}\beta$ was lower than the effect of the combination of $\text{IL1}\beta$ and oncostatin M (OSM) which has been observed in inflammatory diseases such as arthritis and multiple sclerosis and its role in arthritis is its capacity to synergize the action of other inflammatory cytokines: e.g. IL-1 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-17 and LPS (35).

Therefore from this experiment, it was found that pathological leptin concentration could not induce cartilage degradation and could not show additive effect with $\text{IL1}\beta$ on the induction of cartilage degradation whereas supra-pathological leptin concentration could.

2. The mechanism of leptin on induction of cartilage destruction and on synergy with $\text{IL1}\beta$ on stimulation of cartilage degradation

For this aspect, human articular chondrocytes (HACs) were used as a model. HACs were treated with 0.1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin in the presence and absence of 0.05 ng/ml $\text{IL1}\beta$ for 3, 6, 12 h to investigate the level of mRNA expressions of interested genes. The expressions of anabolic factors including *COL2A1*, *COL1A1* and *ACAN* which encoded for core protein of the most found proteoglycan in cartilage, aggrecan. *COL2A1* encodes alpha-chain of type II collagen which is the main type found in cartilage and *COL1A1* encodes type I collagen. Specific phenotype of chondrocyte can be indicated using the ratio of *COL2A1* and *COL1A1* expression in which decrease of the ratio means loss of specific phenotype of chondrocyte. Moreover, catabolic factors including *MMP3*, *MMP13* and *ADAMTS4* gene expressions were also investigated by real time RT-PCR.

As shown in Fig. 2, $\text{IL1}\beta$ could significantly reduce *COL2A1/COL1A1* expression ratio when compared to the untreated control but it had no effect on the expression level of *ACAN*. Interestingly, 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin could induce the expression of *ACAN* while 0.1 $\mu\text{g/ml}$ leptin had no effect on both *ACAN* and *COL* expressions. Both concentrations of leptin showed additive effect with $\text{IL1}\beta$ on the reduction of *COL2A1/COL1A1* expression ratio but not on *ACAN*. Thus both pathological and supra-pathological leptin concentrations could affect anabolic factor of chondrocyte metabolism especially on change of collagen type.

For catabolic factors, as expected $\text{IL1}\beta$ could significantly increase the expressions of *MMP3* and *MMP13* genes when compared to the control (more than 10 times to the control), but it could not significantly increase *ADAMTS4* expression (Fig.3). Both 0.1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin could induce the expression of *MMP3* gene, however, its ability was less than $\text{IL1}\beta$ (less than 10 times to the control). Moreover, they had no effect on *ADAMTS4* expression. For *MMP13* expression, it could be significantly induced by 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin and the induction level was also lower than that induced by $\text{IL1}\beta$. Only 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin showed additive effect with $\text{IL1}\beta$ on induction of all 3 gene expressions. The ability of leptin on increase cartilage destruction and on synergy with $\text{IL1}\beta$ on induction of cartilage degradation might involve with its role to induce those enzyme expressions. The levels of those enzymes released in condition media were then investigated.

HACs were treated in previous described conditions for 24 h prior to conditioned media were collected for western blot analyses. As shown in Fig.4, $\text{IL1}\beta$ significantly increased the releases of *MMP3*, *MMP13* and *ADAMTS4* especially active form (25, 7 and 4 folds compared to the control respectively). Though 0.1 $\mu\text{g/ml}$ leptin could increase the expression of *MMP3* gene but in protein level it could not induce both *MMP3* and *MMP13* release into the media.

Only 10 µg/ml leptin could significantly induce the releases of both enzymes (10 and 5 folds for MMP3 and MMP13 when compared to the control). Moreover, both 0.1 and 10 µg/ml leptin could increase the release of ADAMTS4 into media (Fig.4B, 4C). For the additive effect with IL1 β , only 10 µg/ml leptin showed this effect on the releases of all 3 enzymes.

Altogether, IL1 β could induce cartilage destruction by increase the releases of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 into cultures media (25, 6 and 4 folds when compared to the control respectively) through induction of all 3 gene-expressions. Pathological leptin concentration could induce only the release of ADAMTS4 (4 folds when compared to the control) and this ability seemed to not enough to induce ECM degradation in cartilage. Whereas supra-pathological leptin concentration could induce the releases of all 3 enzymes although in the lower level when compare to the ability of IL1 β . This ability was enough to degrade the cartilage molecule as shown in Fig.1. Interestingly, in the combination of supra-pathological concentration of leptin and IL1 β , they showed additive effect on induction of the releases of all 3 enzymes (45, 12 and 14 folds when compared to the control respectively) leading to substantially degradation of cartilage tissue.

3. The inhibitory effect of EPA and DHA on IL1 β and leptin-induced cartilage degradation

To investigate the effect of n-3 PUFAs, EPA and DHA, on cartilage degradation induced by IL1 β and leptin, the porcine cartilage explant model was used. The explants were cultured in conditional media containing 10 ng/ml IL1 β and 10 µg/ml leptin in the presence or absence of 1 and 10 µM EPA or DHA for 28 day. The media were collected and changed on Day4, 7, 14, 21, 28 of the experiment. All conditions showed no toxic effect to the cultured tissue as indicated by low LDH release into the media (data not shown). The levels of HA and sGAG that released from the cartilage tissue were measured in the conditional media. As shown in Fig.5, the combination of IL1 β and leptin could induce the releases of HA and sGAG from the cartilage into the media (Fig.5B, 6B). 10 µM DHA was found to be able to inhibit the effect of IL1 β and leptin on induction of HA release on Day7 and 14 of the experiment (Fig.5C) whereas EPA was not able. Moreover, 10 µM EPA alone could induce HA release from the explant (Fig.5A). For sGAG release, it was found that both EPA and DHA could inhibit IL1 β and leptin-induced sGAG degradation in the dose dependent manner (Fig.6C). BSA complex that used as vehicle control for fatty acid-BSA complex preparation had no effect on cartilage degradation (Fig.5B, 6B).

Therefore both EPA and DHA had ability to inhibit cartilage degradation induced by IL1 β and leptin. However, EPA alone was found to be able to induce HA release from the cartilage tissue. Next the inhibitory mechanism of both fatty acids was investigated in HACs.

4. The inhibitory mechanism of EPA or DHA on IL1 β and leptin-stimulated cartilage destruction

HACs were treated with 10 ng/ml IL1 β and 10 µg/ml leptin in the presence or absence of 1 and 10 µM EPA or DHA for 24 h. The toxicity of all treatments were investigated by MTT assay. As shown in Fig.7, all treatments had no toxic effect on HACs.

The mRNA expression level of both anabolic and catabolic factors were measured by real-time RT PCR. Moreover, the released level of catabolic enzymes including MMP3, MMP13 and ADAMTS5 into conditioned media were also examined by western blot. It was found that for anabolic factors, IL1 β and leptin significantly decreased the expression of *COL2A1*/*COL1A1*

ratio (Fig.8A). EPA or DHA alone showed no effect on *COL2A1/COL1A1* expression ratio and on IL1 β and leptin reduced *COL2A1/COL1A1* expression ratio. However, 10 μ M EPA alone could significantly induce the expressions of *MMP3*, *MMP13* and *ADAMTS4* genes (2, 6 and 1.8 folds when compared to the control) (Fig.9). When considered the released levels of those enzymes, only MMP13 and ADAMTS4 released were induced by 10 μ M EPA but MMP3 was not (Fig.10, 11). 10 μ M DHA was also able to include the release of MMP13 into media (3.5 folds). Nevertheless, these inductions by EPA and DHA were much lower than that of the combination of IL1 β leptin which could induce MMP3, MMP13 and ADAMTS4 releases 50, 8 and 4 times when compared to the control, respectively. The ability of EPA to induce MMP13 and ADAMTS4 releases might lead to its ability to induce cartilage destruction in the cartilage explant model.

EPA and DHA were unable to inhibit the combination effect of IL1 β and leptin on inductions of *MMP3* and *MMP13* gene expressions (Fig.9) or the releases of both enzymes into media (Fig.10, 11). Interestingly, EPA and DHA significantly inhibited the release of ADAMTS4 from HACs induced by IL1 β and leptin (Fig.10, 11). Altogether, EPA alone could induce cartilage degradation through its ability to induce MMP3 and ADAMTS4 releases. Even though DHA could also slightly induce MMP13 release but it did not show induction effect on cartilage degradation. Combination of IL1 β and leptin could significantly induce those enzymes releases much higher than that of those n-3 PUFAs. EPA and DHA significantly inhibited the expression of ADAMTS, but not MMP3 and MMP13, induced by combination of those cytokines both in mRNA and protein levels. This ability might involve with its role on protection of cartilage destruction. Next the intracellular signaling in HACs involved with the additive effect of leptin and IL1 β as well as involved with inhibitory effect of EPA or DHA on cartilage degradation were studied.

5. Intracellular signaling in HACs involved in the additive effect of IL1 β and leptin and the effect of EPA and DHA on inhibition of those signaling

IL1 β activates the expression of a number of genes in HACs including *MMPs* and *COX-2* through the activation of four signaling cascades upon binding to its receptor, IL1RI (36-39). The best-characterized signaling cascade involves NF κ B, the 3 other cascades activate the terminal MAPKs, ERK, JNK and p38 (40, 41). Thus the activation of those signaling cascades were investigated.

HACs were treated in several conditions as described previously for 30 min. The cell lysates were collected and the expression levels of intracellular signaling molecules including I κ B α , IKK α β , p65, ERK, JNK, p38 and their phosphorylated forms were examined by western blot analysis. It was found that IL1 β could induce the activation of NF κ B pathway as shown in the increases of p-IKK α β and p-p65 (13 and 8 folds to the control, Fig. 12). 10 μ g/ml leptin could also activate NF κ B cascade however in the lower level compared to that of IL1 β (4 and 4.2 folds for p-IKK α β and p-p65 compare to the control). In the combination of those cytokines, they showed additive effect on the activation of NF κ B cascade as shown in the induction of p-IKK α β and p-p65 for 20 and 7.8 folds compared to control.

For MAPKs, as expected IL1 β activated ERK, JNK and p38 (1.5, 24 and 5 folds to the control, Fig. 13). Interestingly, 10 μ g/ml leptin could also activate those signaling cascades. The activation of leptin was lower when compared to that of IL1 β (1.4, 4.3 and 2.5 folds to the control). IL1 β and leptin showed additive effect to activate only JNK (42 folds to control) but

not ERK and p38. Thus supra-pathological leptin concentration could induce the activation of both NF κ B and MAPKs cascades as same as IL1 β . However the activation level of leptin was much lower than that of IL1 β . Interestingly, IL1 β and leptin had additive effect on the activation of NF κ B and JNK cascades. This additive effect might involve with their abilities to extremely induce MMPs and ADAMTS4 expression.

For the effect of EPA or DHA, it was found that 10 μ M EPA could inhibit the activation of p-p65 and p-JNK induced by combination of IL1 β and leptin ($p < 0.01$) (Fig. 12, 13) as well as 10 μ M DHA ($p < 0.05$ for p-p65 and $p < 0.01$ for p-JNK). Altogether the combination of IL1 β and leptin showed additive effect on the activation of p-p65 and p-JNK in which those activations could be inhibited by 10 μ M EPA or DHA.

Discussion

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and is characterized by an imbalance in the degradation and synthesis of articular cartilage, as well as remodeling of the subchondral bone. In OA condition, synovium and chondrocytes produce the inflammatory cytokines especially IL1 β and TNF α , chemokines, and other inflammatory mediators which can be measured in the synovial fluids of OA patients (42, 43). Those mediators can activate stress-induced and inflammation-induced signaling, transcriptional, and posttranscriptional events that may cause phenotypic shift, apoptosis, and aberrant expression of inflammation-related genes, including catabolic genes such as several MMPs and ADAMTS-4 and 5 (44).

Obesity has been believed as an important risk factor for OA development and progression not only load-bearing joints but also others non-load-bearing joints. Thus besides mechanical force, adipokines that their systemic levels correlate with BMI and contribute to the low-grade inflammation in obese patients may directly affect cartilage metabolism (45). Leptin has become an interesting adipokine involved with OA progression. It was found that leptin level was increased in both synovial fluid of OA (4.4-28.5 ng/ml) (10, 20-22) and in serum of RA patients (24.86 ± 26.41 ng/dl) (46). Moreover many tissues in joint including synovium, osteophytes, meniscus and bone could increase the synthesis of both levels of leptin and its receptor (OB-Rb) (10-13).

Many reports have been focusing on the effect of leptin or its combination effect with IL1 β on the cartilage metabolism. In 2007, Simopoulou and colleagues reported that 100 ng/ml leptin could induce the expression of MMP9 and MMP13 expression in both chondrocytes isolated from normal and OA human cartilage (10). Controversy in 2011, Amy L. and colleagues reported that 1-100 ng/ml leptin alone or in combination with IL1 β had no effect on porcine cartilage destruction (19). In 2009, Katriina V and colleagues found that leptin alone or in combination with IL1 could induce productions of NO, PGE2, IL-6, and IL-8 from human OA cartilage. However, the concentration of used leptin was very high (10 μ g/ml) (16). Moreover in 2011, Wang Hui and colleagues found that Leptin, either alone or in synergy with IL-1, significantly induced collagen release from bovine cartilage by upregulating collagenolytic and gelatinolytic activity. Again the leptin concentration used in their study was supra-pathological concentration (25 μ g/ml) (47). Altogether it seemed that the supra-pathological leptin concentration alone and in combination with IL1 had an induction effect on cartilage destruction. Though the effect of pathological concentration leptin (4.4-28.5 ng/ml) on cartilage metabolism or on IL-1 β induced cartilage destruction was still imprecise. The differences between the

various studies including this study might be attributable to the response of enzymatically isolated chondrocytes versus chondrocytes that are intact in cartilage tissue with extracellular matrix, moreover, the arthritic state of the used tissue might also involve. Besides the culture condition with and without serum and the differences between species of tissue sources might also involve with the conflict results.

Porcine chondrocytes was reported to express the Ob-Rb leptin receptor (48). Therefore it should be activated by leptin. In the current study the porcine cartilage explant was used as a model to study the effect of leptin both pathological concentration (100ng/ml) and supra-pathological concentration (1-10 μ g/ml) on cartilage metabolism in the condition of free serum. The involved mechanism and intracellular signaling were investigated in normal human articular chondrocytes (HACs). 10 μ g/ml leptin alone or in combination with IL1 β could induce cartilage destruction but lower concentrations used in the study had no effect. Those effect were lower than the effect of IL1 β alone or in combination with OSM. Mechanism investigation in normal HACs found that pathological concentration of leptin (100 ng/ml) could slightly induce ADAMTS4 expression but this ability seemed to not enough to induce ECM degradation in cartilage. Whereas the supra-pathological concentration (10 μ g/ml) could induce the expressions of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 led to the observable degradation of cartilage. However its induction degree was lower than that of IL1 β . 10 μ g/ml leptin showed additive effect with IL1 β on cartilage destruction by further induction of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 expression. Our results studied in normal porcine cartilage tissue and in normal HACs were consistency. Thus using the same state of tissues or cell sources might provide the consistent result. As reported that human OA cartilage shows elevated expression of the leptin receptor Ob-Rb (11), thus different OA state of tissue or cell sources might response to leptin in the different degree in which cells with advance OA state might be able to response to low level of leptin whereas normal cell might not. Nevertheless normal chondrocytes was found to response to leptin (100ng/ml) in a higher degree than OA chondrocytes (11). Moreover, in another aspect, the effect of leptin on MMP13 production from chondrocytes was reported to be dependent with the BMI of donor (14). Altogether there are many factors that might involve with the degree of response to leptin in chondrocytes.

For the involving intracellular signaling, 10 μ g/ml leptin could activate both NF κ B and MAPKs, ERK, JNK and p38, cascades as same as IL1 β , however the activation level was much lower than that of IL1 β . Moreover, the additive effect of IL1 β and leptin found to occur through the activation of NF κ B and JNK cascades. It had been reported that leptin induced MMPs in bovine cartilage through the activation of STAT1, STAT3, STAT5, MAPK (JNK, ERK, p38), Akt and NF- κ B signaling pathways (47). As our result the combination of leptin and IL1 β was found to further activate NF- κ B and JNK pathway when compared to either leptin or IL1b alone. Although it had been reported that JNK inhibition had no effect on leptin induced MMP13 expression or leptin plus IL-1-induced cartilage degradation (47).

In addition recently the protective effect of n-3 PUFAs especially EPA and DHA on cartilage has been widely reported. n-3 PUFAs including EPA and DHA was found to reduce to mRNA expression of ADAMTS4, ADAMTS5, MMP3, MMP13, COX-2, IL-1 α , IL-1 β and TNF- α induced by IL1 α in bovine chondrocytes (26). Moreover, EPA and DHA were reported to inhibit the bovine cartilage degradation induced by IL1 β (27). Nevertheless their inhibitory effect in cartilage or chondrocyte induce by the combination of leptin and IL1 β had not been

investigated. We thus had examined in this study. Both 10 μ M EPA and DHA could inhibit the activation of NF- κ B and JNK pathway induced by the combination of both cytokines. However they could only significantly inhibit the expression of ADAMTS4 but not MMP3 and MMP13. Although their inhibitory effect on cartilage degradation in porcine cartilage explant induced by leptin+IL1 β was still detectable. Nevertheless it needed to be concerned that 10 μ M EPA alone could significantly induce the expression of MMP13 and ADAMTS4 led to the degradation of GAG in the cartilage tissue. It had been reported that the high dose of 10 μ M EPA and DHA were less effective than the lower doses (0.1, 1 μ M) on inhibition of cartilage degradation (27). Therefore even though EPA and DHA seemed to be able to protect cartilage degradation, the approximate dose needed to be concerned.

Conclusion

The effect of pathological and supra-pathological concentrations of leptin alone or in combination with IL1 β on cartilage metabolism was contradictory. This finding used porcine cartilage explant and normal human chondrocytes as models. The results from both models were consistency in which only 10 μ g/ml leptin could be able to induce cartilage destruction through the activation of NF κ B and MAPKs cascades including ERK, JNK and p38 led to the induction of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 releases. Moreover, only this supra-pathological concentration could show additive effect with IL1 β on induction of cartilage damage through the additive ability to activate NF κ B and JNK. Interestingly, n-3 PUFAs including EPA and DHA were able to inhibit the combination of leptin and IL1 β induced cartilage degradation by inhibition of ADAMTS4 secretion.

References

1. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2003;62(12):1145-55.
2. Jiang L, Rong J, Wang Y, Hu F, Bao C, Li X, et al. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2011;78(2):150-5.
3. Jiang L, Tian W, Wang Y, Rong J, Bao C, Liu Y, et al. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2012;79(3):291-7.
4. Dennison E CC. Osteoarthritis: epidemiology and classification. M. C. Hochberg AJS, J. S. Smolen, M. E. Weinblatt and M. H. Weisman, editor. Toronto: Mosby; 2003. 1781-91 p.
5. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69:761-5.
6. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
7. Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(1):1-13.

8. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292-5.
9. Coppari R, Bjorbaek C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(9):692-708.
10. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3118-29.
11. Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007;15(8):872-83.
12. Yaykasli KO, Hatipoglu OF, Yaykasli E, Yildirim K, Kaya E, Ozsahin M, et al. Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF- κ B signaling pathways in human chondrocytes. *Cell Biology International*. 2015;39(1):104-12.
13. Vuolteenaho K, Koskinen A, Moilanen T, Moilanen E. Leptin levels are increased and its negative regulators, SOCS-3 and sOb-R are decreased in obese patients with osteoarthritis: a link between obesity and osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2012;71(11):1912.
14. Pallu S, Francin PJ, Guillaume C, Gegout-Pottie P, Netter P, Mainard D, et al. Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R112.
15. Katriina Vuolteenaho RK, Teemu Moilanen and Eeva Moilanen, editor *Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is Reduced in Obese Patients with Osteoarthritis and Regulates Leptin Responses in Chondrocytes*. American College of Rheumatology Annual Meeting; 2012; Washington, DC
16. Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Päivärinta U, Moilanen T, et al. Leptin Enhances Synthesis of Proinflammatory Mediators in Human Osteoarthritic Cartilage—Mediator Role of NO in Leptin-Induced PGE(2), IL-6, and IL-8 Production. *Mediators of Inflammation*. 2009;2009:345838.
17. Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Paivarinta U, Moilanen T, et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:345838.
18. Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(1):57-64.
19. McNulty AL, Miller MR, O'Connor SK, Guilak F. The effects of adipokines on cartilage and meniscus catabolism. *Connect Tissue Res*. 2011;52(6):523-33.
20. Presle N, Pottie P, Dumond H, Guillaume C, Lapique F, Pallu S, et al. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(7):690-5.
21. Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, et al. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2009;28(12):1431-5.

22. Gandhi R, Takahashi M, Syed K, Davey JR, Mahomed NN. Relationship between body habitus and joint leptin levels in a knee osteoarthritis population. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010;28(3):329-33.
23. Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(2):232-43.
24. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6 Suppl):1505S-19S.
25. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev*. 2011;111(10):5922-43.
26. Zainal Z, Longman AJ, Hurst S, Duggan K, Caterson B, Hughes CE, et al. Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(7):896-905.
27. Wann AKT, Mistry J, Blain EJ, Michael-Titus AT, Knight MM. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce interleukin-1 β -mediated cartilage degradation. *Arthritis Research & Therapy*. 2010;12(6):R207-R.
28. Buckley JD, Howe PR. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obes Rev*. 2009;10(6):648-59.
29. White PJ, Marette A. Is omega-3 key to unlocking inflammation in obesity? *Diabetologia*. 2006;49(9):1999-2001.
30. Phitak T, Pothacharoen P, Settakorn J, Poompimol W, Caterson B, Kongtawelert P. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry*. 2012;80:77-88.
31. Phitak T, Choocheep K, Pothacharoen P, Poompimon W, Premanode B, Kongtawelert P. The effects of p-hydroxycinnamaldehyde from *Alpinia galanga* extracts on human chondrocytes. *Phytochemistry*. 2009;70(2):237-43.
32. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 1986;883(2):173-7.
33. Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem*. 1947;167(1):189-98.
34. 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.
35. Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A, et al. The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):961-7.
36. Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P, et al. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1 β . *J Rheumatol*. 2002;29(6):1262-72.
37. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2002;21(3):251-62.

38. Paik J, Lee JY, Hwang D. Signaling pathways for TNF α -induced COX-2 expression: mediation through MAP kinases and NF κ B, and inhibition by certain nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Exp Med Biol*. 2002;507:503-8.
39. Ramsay RG, Ciznadija D, Vanevski M, Mantamadiotis T. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2003;16(2 Suppl):59-67.
40. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, et al. MAP kinases. *Chem Rev*. 2001;101(8):2449-76.
41. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*. 2002;298(5600):1911.
42. Poole AR GF, Abramson SB. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, editors. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management* 2007. p. 24-97.
43. Kraus VB. Pathogenesis and treatment of osteoarthritis. *Med Clin North Am*. 1997;81(1):85-112.
44. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. 2011;21:202-20.
45. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(5):838-51.
46. Gunaydin R, Kaya T, Atay A, Olmez N, Hur A, Koseoglu M. Serum leptin levels in rheumatoid arthritis and relationship with disease activity. *South Med J*. 2006;99(10):1078-83.
47. Hui W, Litherland GJ, Elias MS, Kitson GI, Cawston TE, Rowan AD, et al. Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(3):455-62.
48. Stepanan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory Peptides*. 2000;92(1-3):73-8.

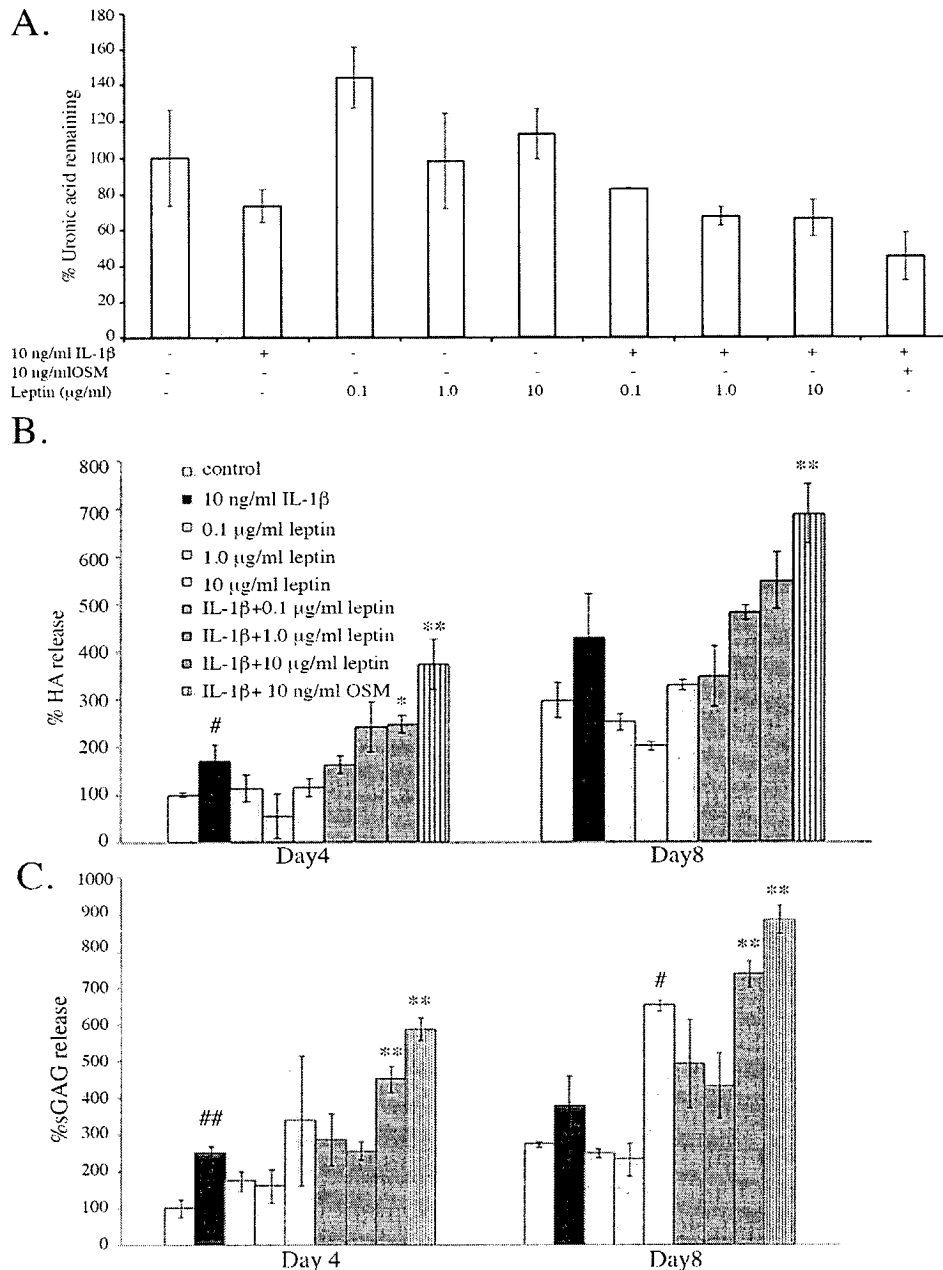


Figure.1 The effect of IL1 β and/or pathological and supra-pathological concentrations of leptin on cartilage degradation in porcine cartilage explant model. The explants were cultured in several conditions for 8 days. The media were collected and changes on day4 and 8. The releases of HA (A) and sGAG (B) from the cartilage tissue into media were measured. The remaining of uronic acid in the cartilage explant was also measured (B). The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

#: significant difference compared with the control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

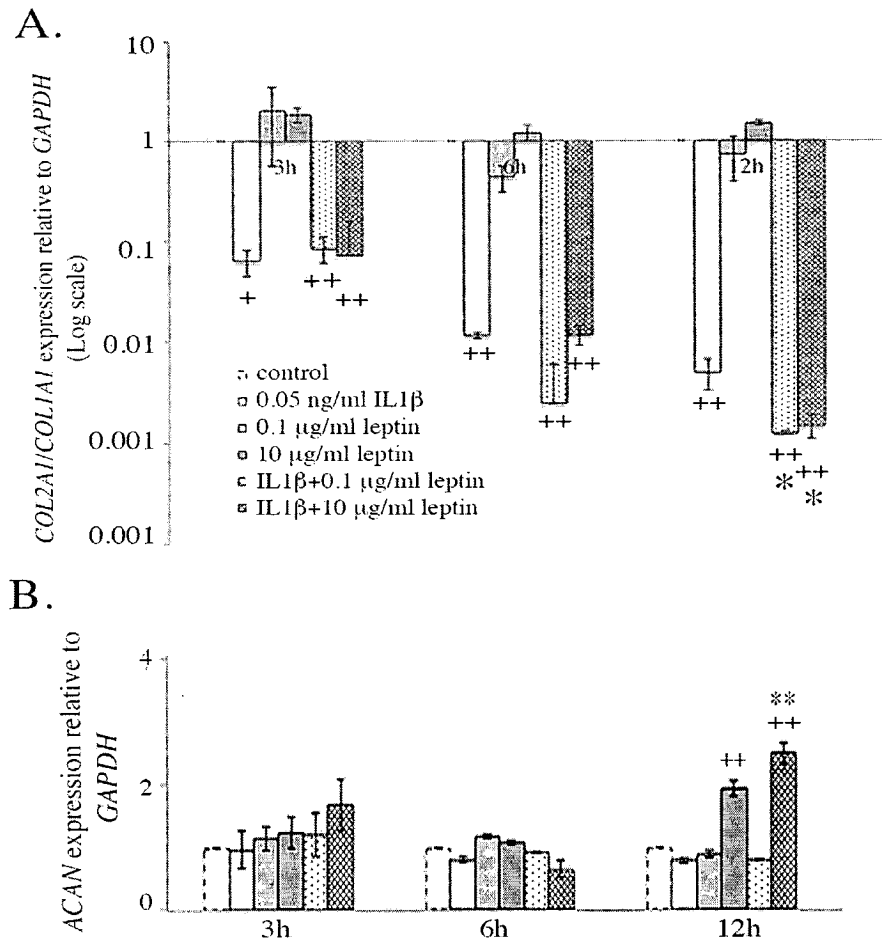


Figure.2 The effect of IL1 β and/or pathological and supra-pathological concentrations of leptin on the mRNA expressions of anabolic factors in HACs including (A) COL2A1/COL1A1 ratio and (B) ACAN. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

#: significant difference compared with the control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

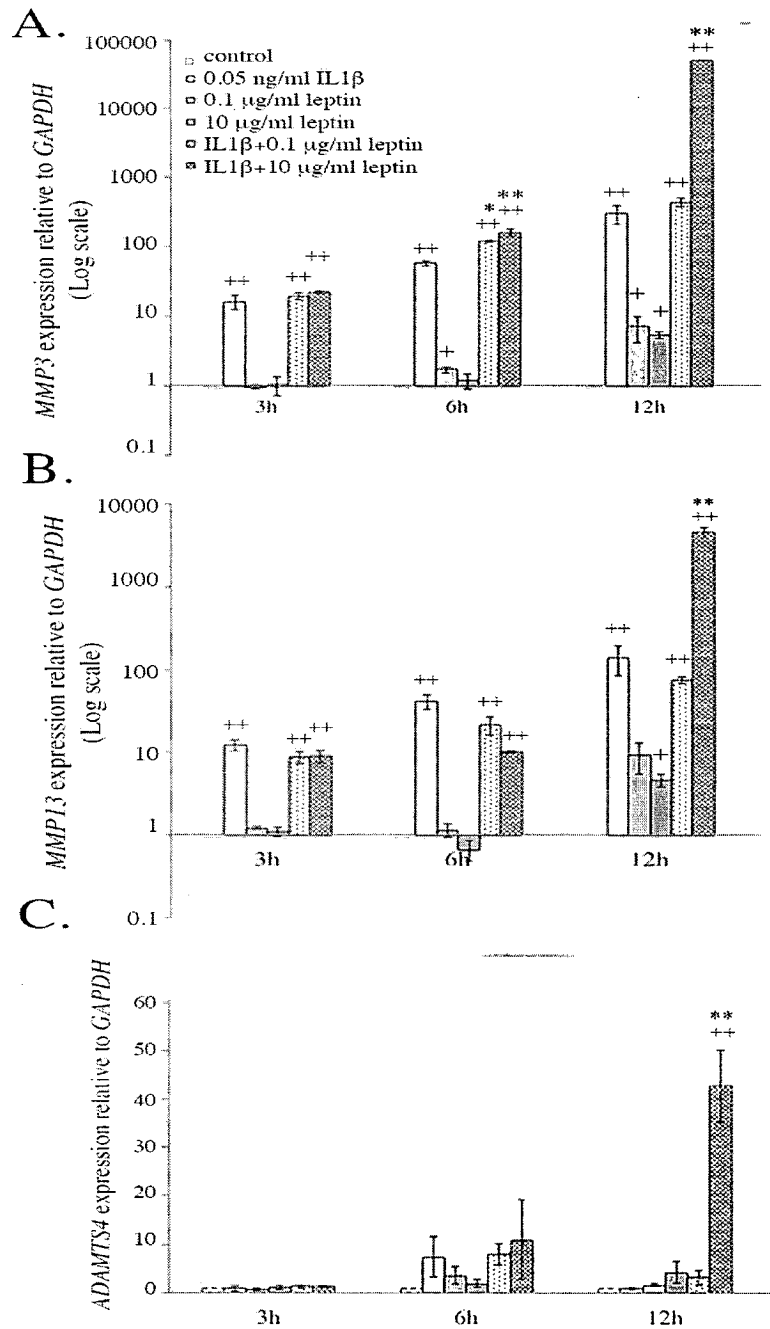


Figure.3 The effect of IL1 β and/or pathological and supra-pathological concentrations of leptin on the mRNA expressions of catabolic factors in HACs including (A) *MMP3*, (B) *MMP13* and (C) *ADAMTS4*. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

#: significant difference compared with the control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

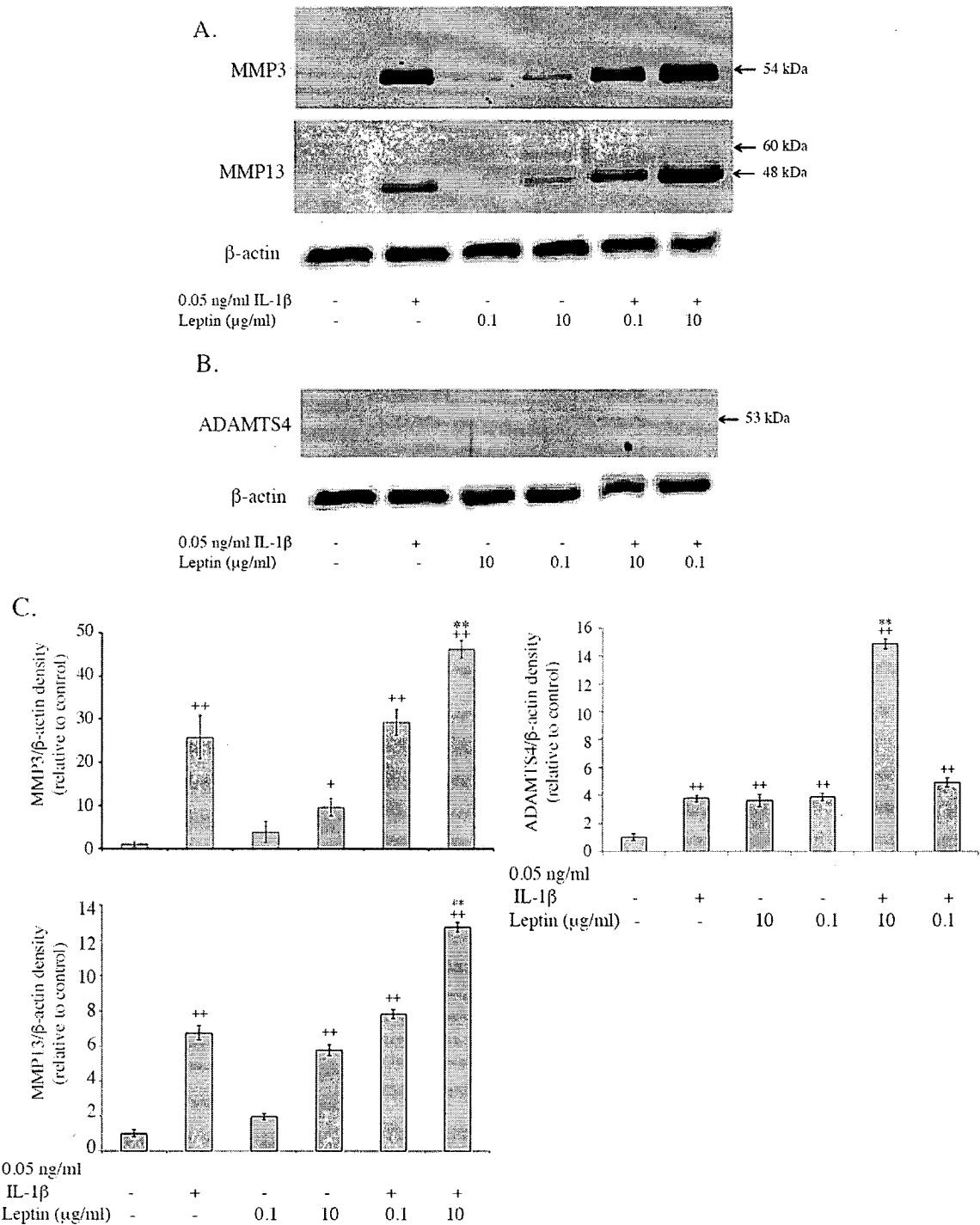


Figure.4 The effect of IL1β and/or leptin on the releases of protease enzymes from HACs treated with indicated conditions into culture media. (A) MMP3, MMP13 and (B) ADAMTS4, The densities of protein bands were shown in bar graph (C) which indicate mean±SEM of three independent experiments.

#: significant difference compared with the control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

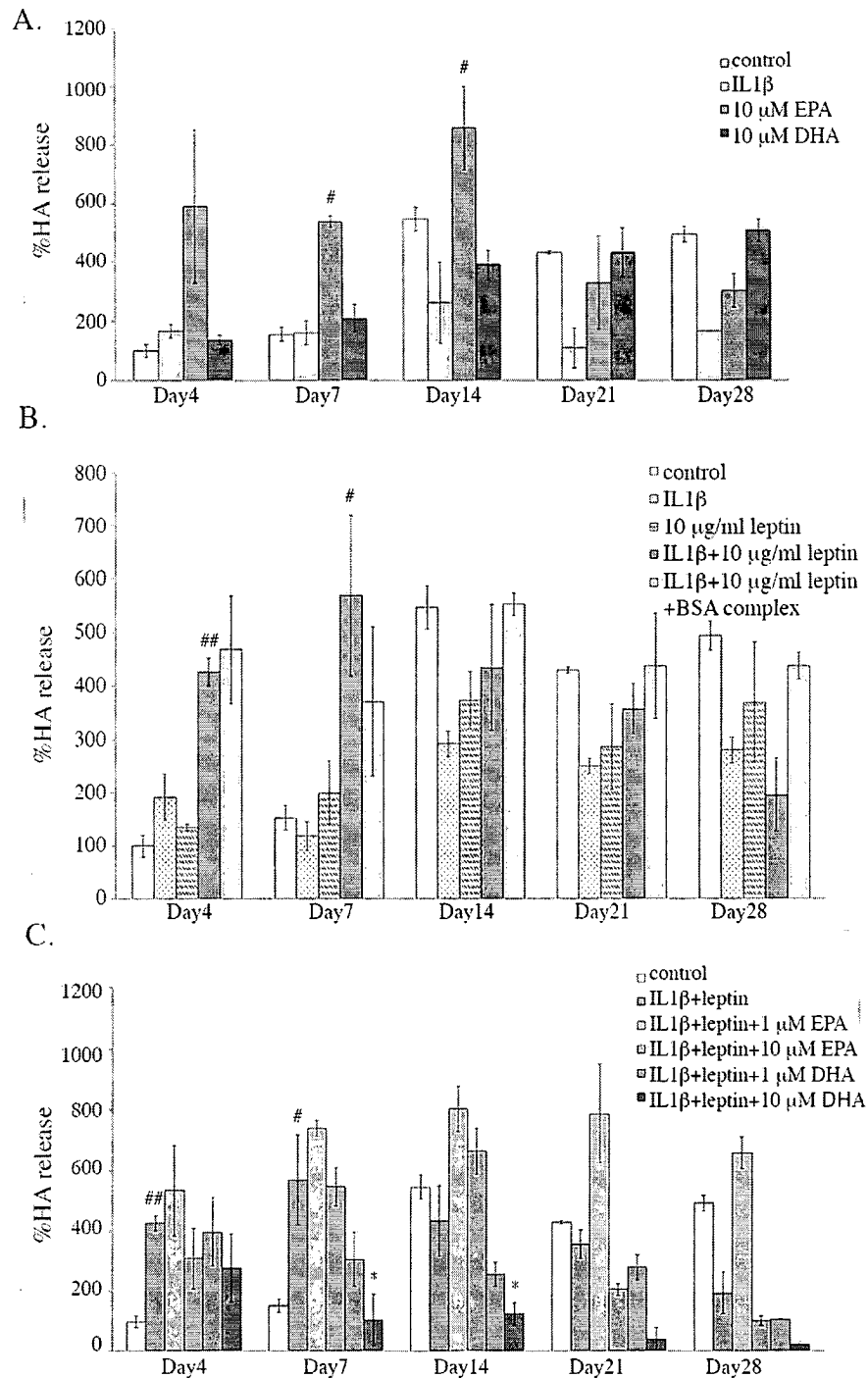


Figure.5 The effect of EPA or DHA in inhibition of IL1 β and leptin induced cartilage degradation in porcine cartilage explant model. The explants were cultured in indicated conditions for 28 days. The media were collected and changes on day4, 7, 14, 21 and 28 . The releases of HA from the cartilage into media was examined. (A) the effect of EPA or DHA alone, (B) the effect of a vehicle control, BSA complex and (C) the inhibitory effect of EPA or DHA. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

#: significant difference compared with the control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β +leptin treatment (: $p < 0.05$,

**: $p < 0.01$)

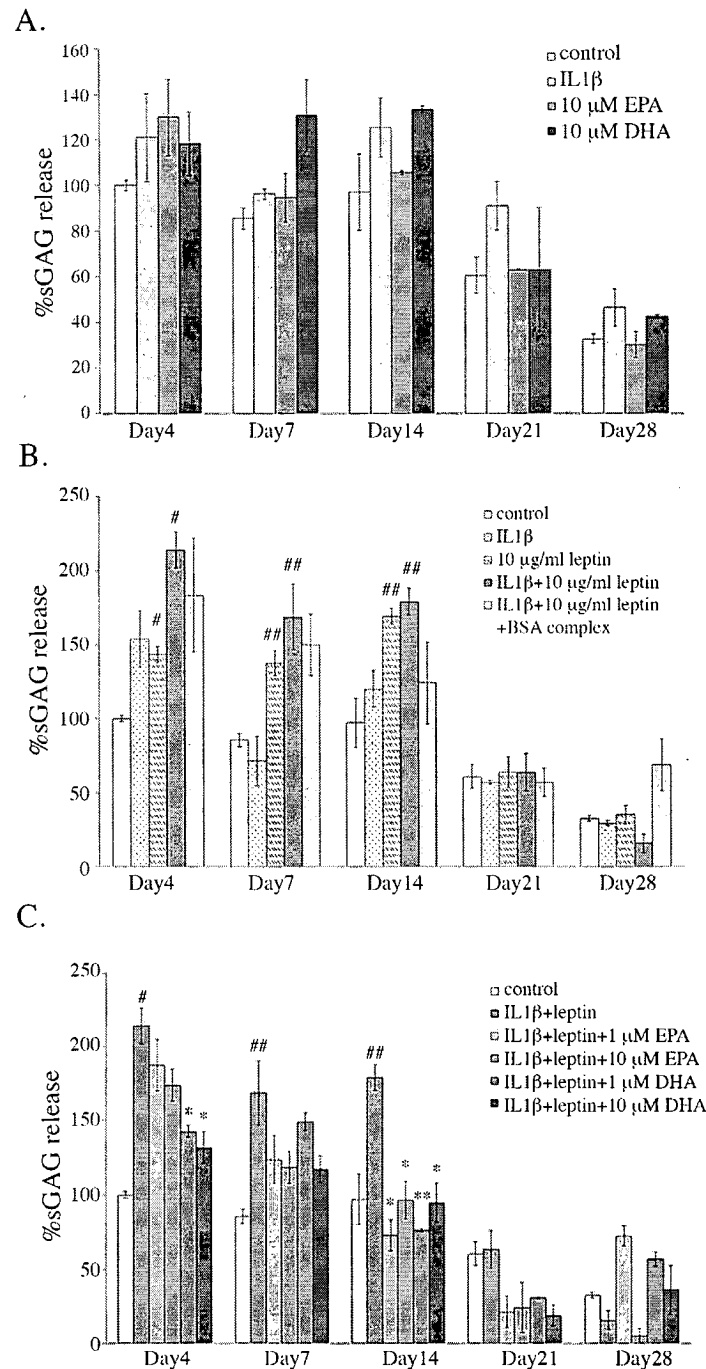


Figure.6 The effect of EPA or DHA in inhibition of IL1 β and leptin induced cartilage degradation in porcine cartilage explant model. The explants were cultured in indicated conditions for 28 days. The media were collected and changes on day4, 7, 14, 21 and 28 . The releases of sGAG from the cartilage into media was examined. (A) the effect of EPA or DHA alone, (B) the effect of a vehicle control, BSA complex and (C) the inhibitory effect of EPA or DHA. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

#: significant difference compared with the control (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β +leptin treatment (: $p < 0.05$,

**: $p < 0.01$)

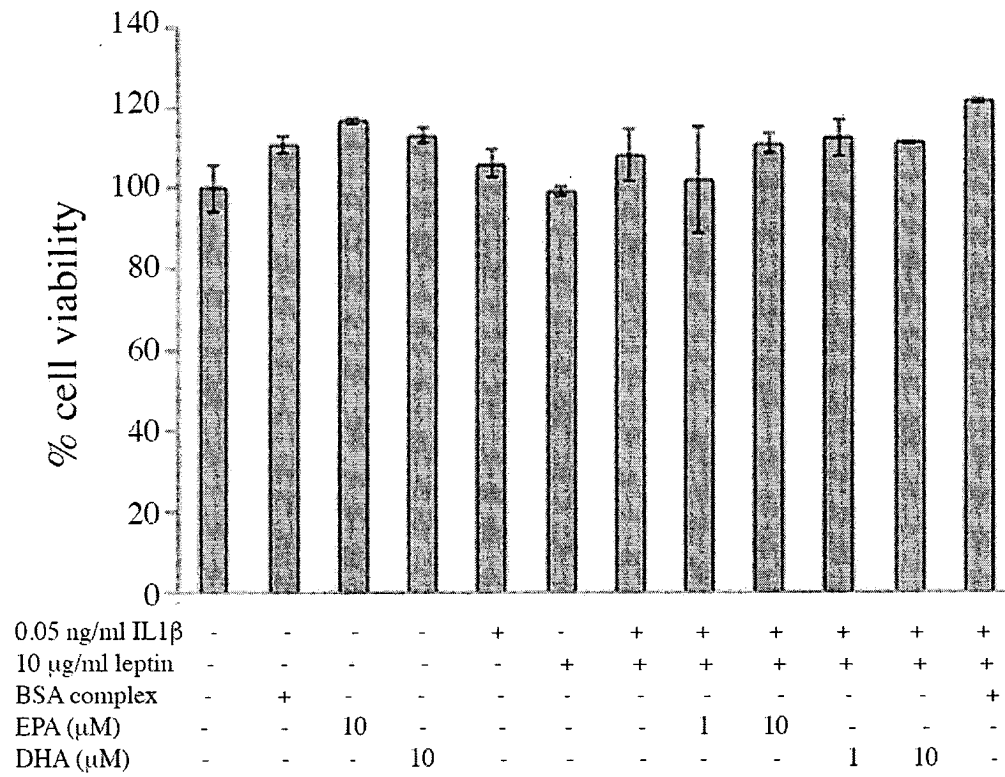


Figure.7 The effect of IL1 β and/or leptin in the presence and absence of EPA or DHA on HACs viabilities. HACs viabilities were examined by MTT assay after treated in those conditions for 24 h. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

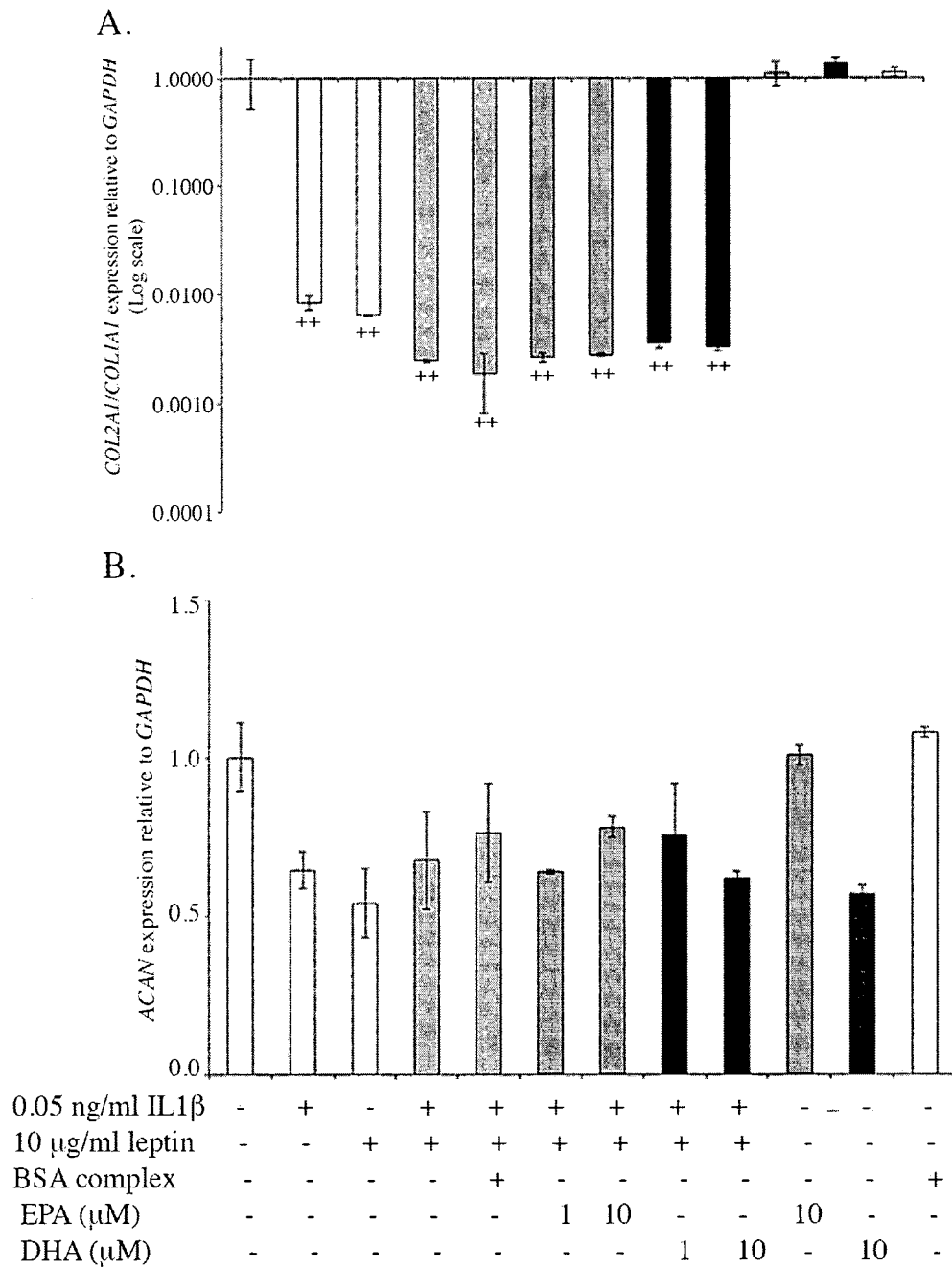


Figure.8 The effect of EPA or DHA on the mRNA expressions of anabolic factors in HACs induced by IL1 β and leptin. (A) *COL2A1/COL1A1* ratio and (B) *ACAN*. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

+: significant difference compared with the control (#: $p<0.05$, ##: $p<0.01$)

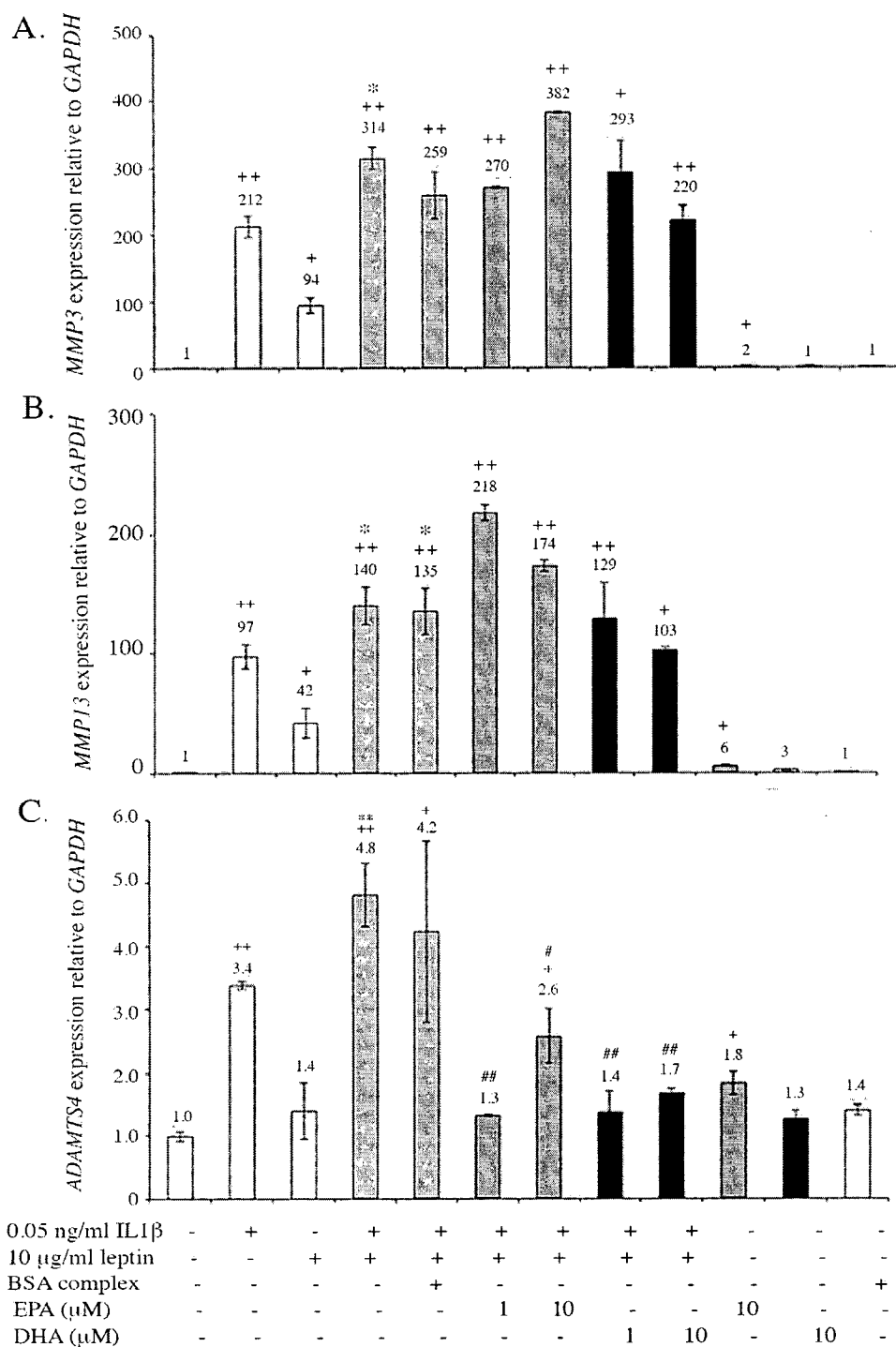


Figure.9 The inhibitory effect of EPA or DHA on the mRNA expressions of catabolic factors in HACs induced by IL1 β and leptin. (A) *MMP3*, (B) *MMP13* and (C) *ADAMTS4*. The bar graphs show mean \pm SEM of three independent experiments.

+: significant difference compared with the control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

#: significant difference compared with the IL1 β + leptin (: $p < 0.05$, #: $p < 0.01$)

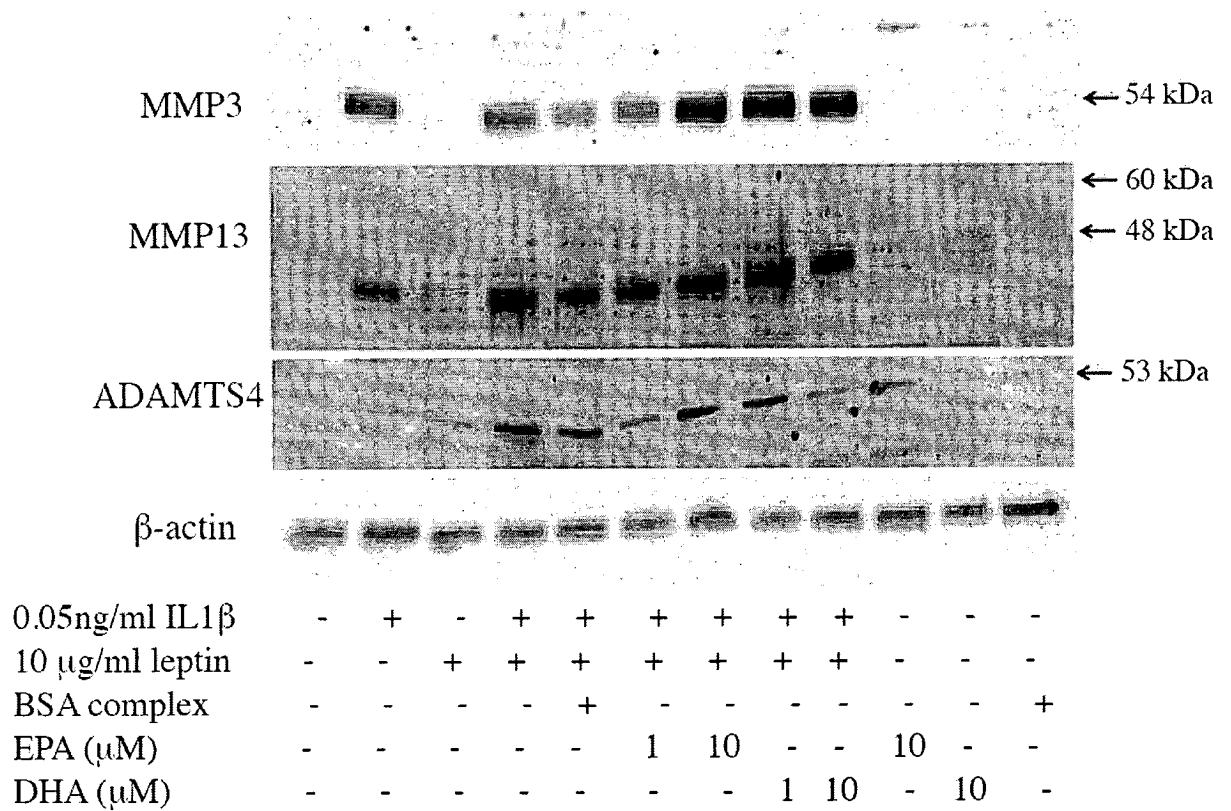


Figure.10 The effect of EPA or DHA on the releases of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 from HACs treated with combination of IL1β and leptin into cultured media. The figure was a representative of results from three independent experiments.

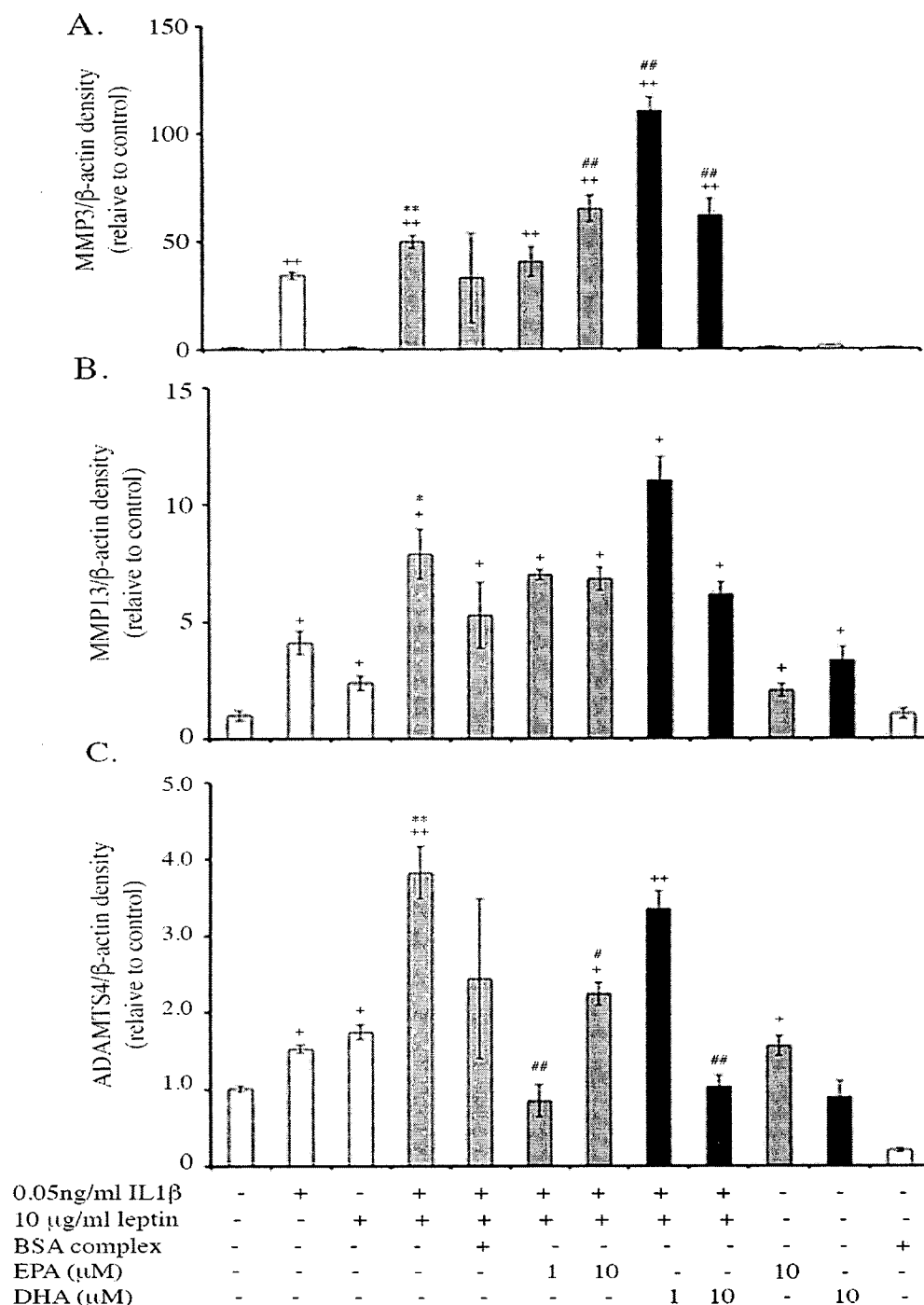


Figure.11 The effect of EPA or DHA on the releases of MMP3, MMP13 and ADAMTS4 from HACs treated with combination of IL1β and leptin into cultured media. The densities of protein bands were shown in bar graph: (A) MMP3, (B) MMP13 and (C) ADAMTS4. Bar graphs indicate mean±SEM of three independent experiments.

+: significant difference compared with the control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

#: significant difference compared with the IL1β + leptin (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

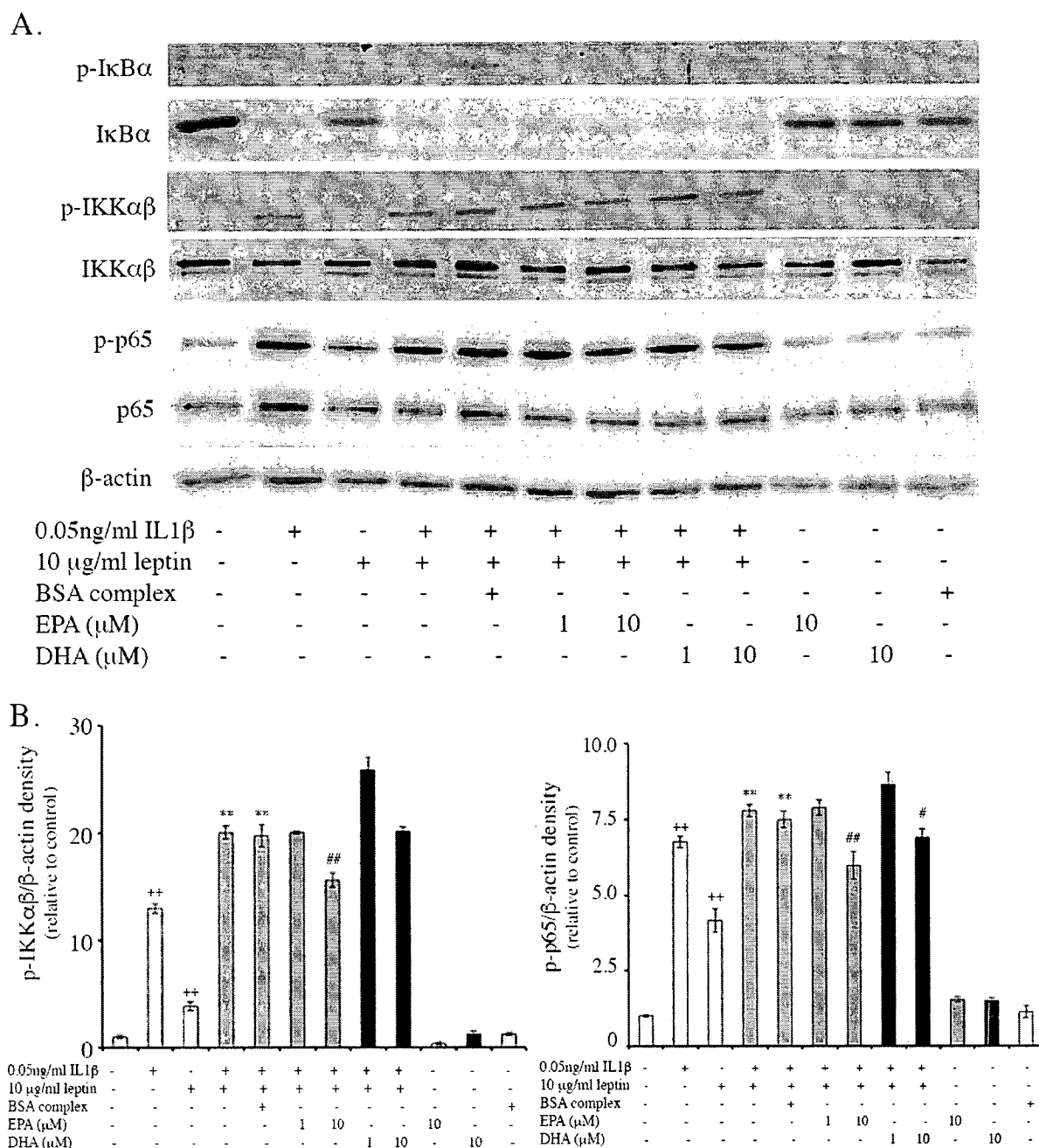


Figure.12 The activation of NFκB cascade induced by IL1β and/or leptin and the effect of EPA or DHA on that activation induced by IL1β and/or leptin. (A) the expressions of IκBα, IKKαβ, p65 and their phosphorylated forms examined by western blot using β-actin as a loading control, (B) bar graphs of protein bands densities. The figure was a representative of results from three independent experiments and bar graphs indicate mean±SEM of three independent experiments.

+: significant difference compared with the control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

#: significant difference compared with the IL1β + leptin (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

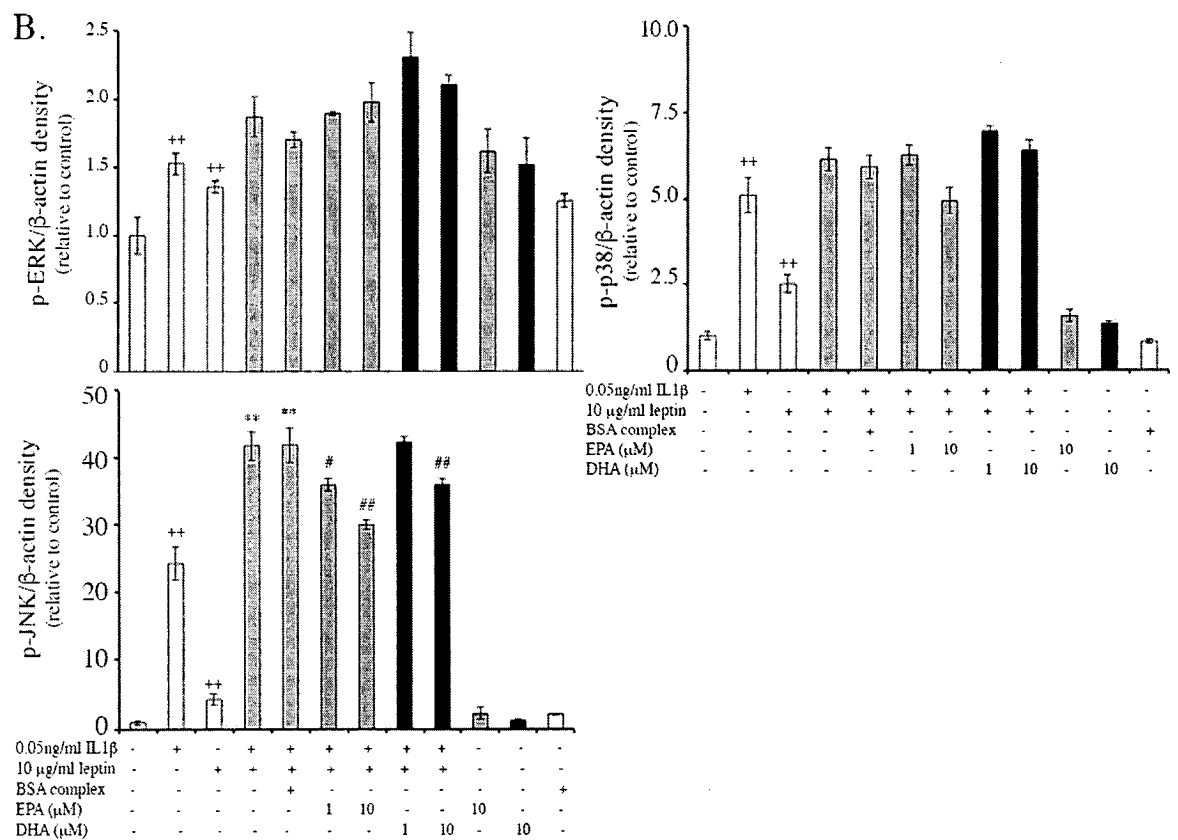
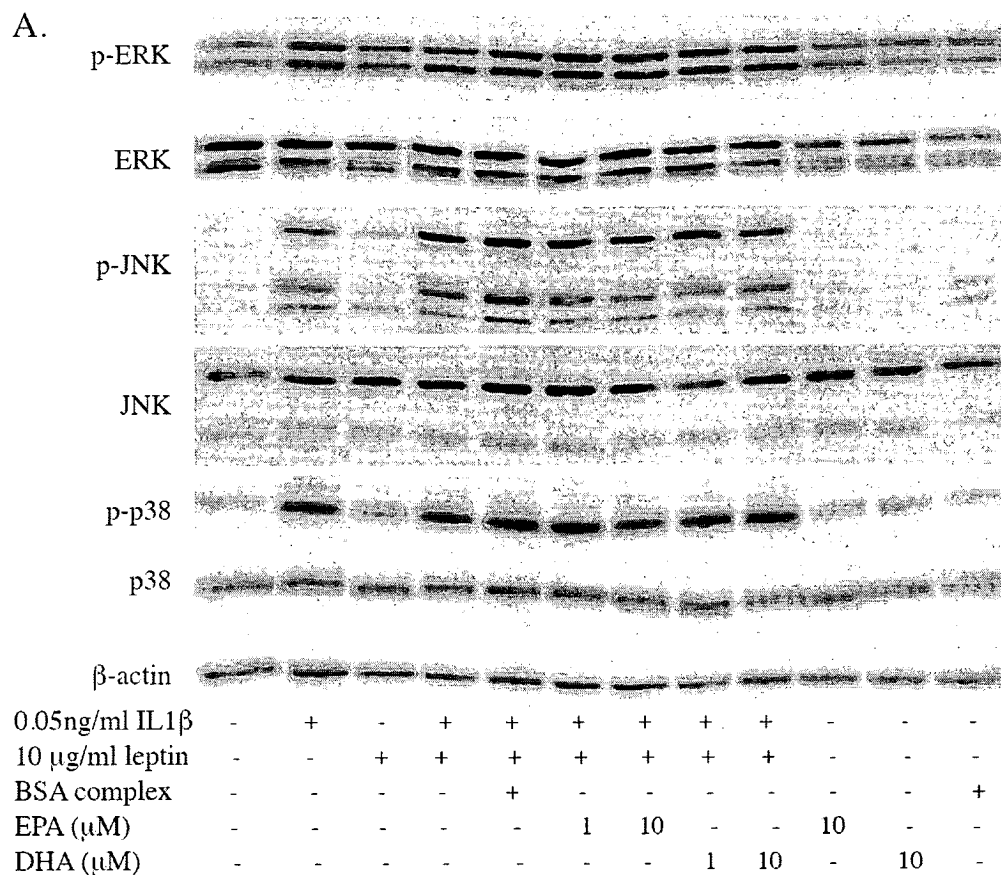


Figure.13 The activation of MAPK cascades induced by IL1 β and/or leptin and the effect of EPA or DHA on that activation induced by IL1 β and/or leptin. (A) the expressions of ERK, JNK and p38 and their phosphorylated forms examined by western blot using β -actin as a loading control, (B) bar graphs of protein bands densities. The figure was a representative of results from three independent experiments and bar graphs indicate mean \pm SEM of three independent experiments.

+: significant difference compared with the control (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$)

: significant difference compared with the IL1 β treatment (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

#: significant difference compared with the IL1 β + leptin (#: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยได้นำไปเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุม
ชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 14”
วันที่ 6 มกราคม 2560

ในหัวข้อ

Effect of leptin and/or interleukin-1-beta on cartilage
degradation

โดย

ดร. ธัญญลักษณ์ พิทักษ์ และ ศ.ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ



Effect of leptin- and/or interleukin-1-beta on cartilage degradation



Thanyaluck Phitak (thanyaluck.phitak@cmu.ac.th), Prachya Kongtawelert (prachya.kongtawelert@gmail.com)
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Introduction

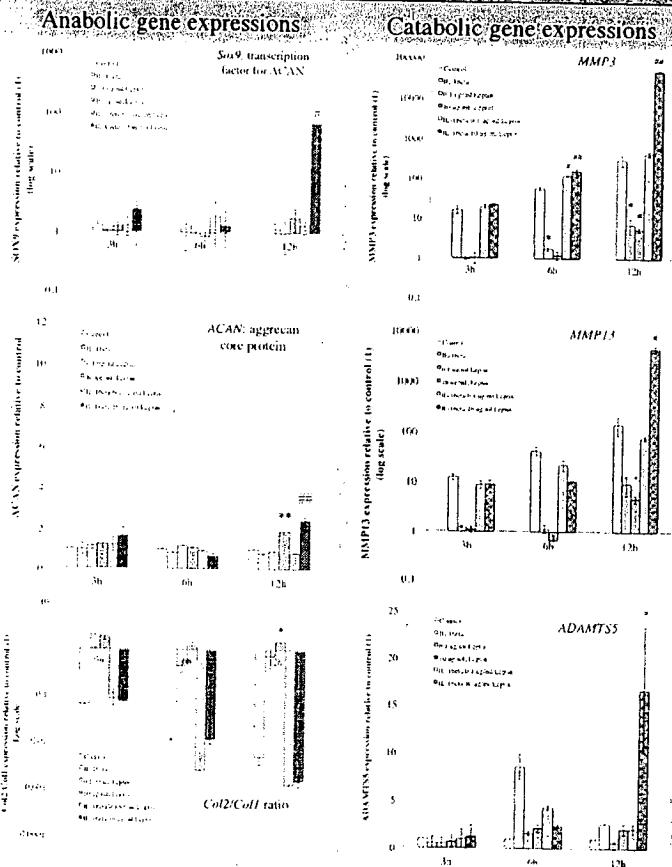
Osteoarthritis (OA) is a major disability of elderly people. There are many causes of pathogenesis of OA including infection, aging, overuse and overweight. In obese people not only load-bearing joints are found having OA condition, but others non-load-bearing joints are also found having the pathological conditions. Thus the inflammatory cytokines which increased in this condition might involve with the pathogenesis of OA in non-load-bearing joint. Leptin is one of adipokines upregulated in obese condition. The concentration of leptin in synovial fluid from OA-affected joints vary from 4.4 to 28.5 ng/ml (1). There are few studies reported the combination effect of leptin and IL-1beta (2). However, the used leptin concentration was supraphysiological level. Thus investigation of the effects of physiological, pathological and supraphysiological levels of leptin together with IL-1beta on cartilage degradation will allow us to understand more the role of leptin in OA. Moreover, n-3 PUFAs (eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6)) are well documented that can prevent cartilage degradation due to its anti-inflammatory effect. Their effects on leptin-induced OA are still unknown. Thus investigation of n-3 PUFAs (EPA, DHA) effects on leptin and/or IL-1beta-induced was interesting.

Objective

- To investigate the effects of physiological, pathological and supra-pathological levels of leptin together with or without IL-1beta on cartilage degradation.
- To investigate the effects of EPA and DHA on leptin- and/or IL-1beta-induced cartilage degradation.

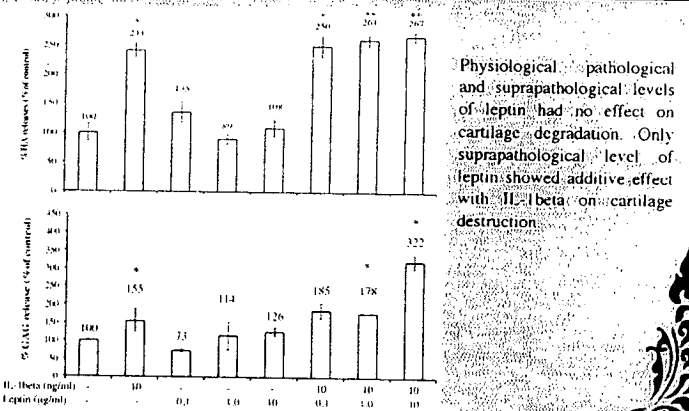
Result

Mechanism of combination effect of leptin and IL-1beta on cartilage degradation investigated in human articular chondrocytes

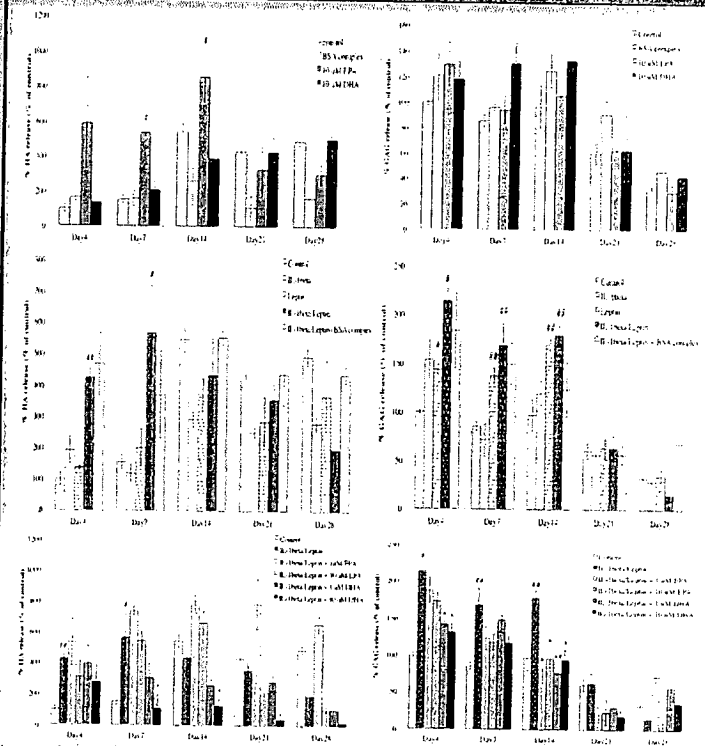


Result

Effects of physiological, pathological and supraphysiological levels of leptin together with or without IL-1beta on cartilage degradation in porcine cartilage explant model



Effects of EPA and DHA on cartilage degradation induced by supraphysiological concentration of leptin and IL-1beta in porcine cartilage explant model



Summary and further study

Altogether, leptin alone was able to slightly induce catabolic enzymes including *MMP-3* and *MMP-13* which can degrade cartilage matrix. Moreover, leptin showed additive effect with IL-1beta in induction of both catabolic enzymes. Next the protein expression of both catabolic enzymes and the involving signal transductions will be investigated. Nevertheless, the effect of omega-3 PUFAs will also be examined.

References

- Katrina Vuolteenaho, et al. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2014; 114: 103-108
- Katrina Vuolteenaho, et al. Mediators of Inflammation, Volume 2009, Article ID 345838.