



APPENDICES

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

## APPENDIX A

### List of chemicals and materials used in the study

All chemicals and reagents used in this study are analytical grades and are listed as follows:

| <b>Chemicals</b>                             | <b>Source</b>                      |
|--|------------------------------------|
| 96-well ELISA-plate (Nunc®, Maxisorb)        | Nunc, Denmark                      |
| Absolute ethanol                             | Merck, Darmstadt, Germany          |
| Agarose gel                                  | Vivantis, UK.                      |
| Alcian blue                                  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US   |
| Anti-mouse mAnti-type II collagen antibody   | Abcam, USA.                        |
| Boric acid                                   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. |
| Bovine serum albumin                         | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. |
| Carbazole reagent                            | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. |
| Chondroitinase ABC                           | Sigma-Aldrich, USA.                |
| Collagenase                                  | Calbiochem, USA.                   |
| DAB substrate                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. |
| Dexamethasone                                | Sigma, Poole, UK.                  |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO)                    | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. |
| Dulbecco's Modified Eagle's medium<br>(DMEM) | Gibco, UK.                         |
| Ethidium bromide                             | Bio-Rad Laboratories, USA.         |

|   |   |
|---|---|
| Gentamycin  | T.P. drug laboratories (1996) co.ltd,<br>Thailand |
| Glacial acetic acid   | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Glutaraldehyde, 30% (w/v)                                     | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Glycerol  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.                |
| HEPES   | Promega, Corp., Madison, WI, USA.                 |
| Hydrochloric acid   | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Hydrogen peroxide   | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Millipore filter membrane (0.22 um)                           | Pall corporation, MI, USA.                        |
| Millipore filter membrane (0.45 um)                           | Pall corporation, MI, USA.                        |
| synthesis kit   | Fermentas, Canada, USA.                           |
| Sodium bicarbonate  | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Sodium chloride   | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Sodium hydrogen phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Sodium tetraborate (borax)                                    | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Sulfuric acid   | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Tissue culture flask  | Greiner bio-one, Germany                          |
| Tris(hydroxymethyl) amino-methane                             | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.                |
| Trypsin   | Gibco, UK.  |
| Tween-20  | Amersham Bioscience                               |
| Whatman filter paper  | Whatman, USA.                                     |
| β-mercaptoethanol   | Bio-Rad Laboratories, USA.                        |

## APPENDIX B

### List of instrument used in the study

| <b>Instrument</b>  | <b>Source</b>                    |
|--|----------------------------------|
| Analytical balance (HK160)                               | Mettler Instrument , Switzerland |
| Autoclave S4-240   | Tomy Seiko Co.Ltd., Japan        |
| CO <sub>2</sub> incubator                                | Nu-Air, USA                      |
| Gel Doc  | Bio-Rad Laboratory, USA.         |
| ELISA plate reader                                       | Thermo scientific, USA.          |
| High speed refrigerated micro centrifuge<br>Milano,Italy | ALC 4239R centrifuge, ALC srl,   |
| Hot air oven   | Heraeus, Germany                 |
| Laminar flow   | Faster, Italy                    |
| Light microscope (CHK-H)                                 | Olympus, Japan                   |
| Microcentrifuge (Microcen13)                             | Herolab, Germany                 |
| pH meter (SevenEasy)                                     | Mettler Toledo, USA.             |
| Ultracentrifuge  | Beckman Coulter, USA.            |
| Vortex mixer (Vortex-Genie)                              | Scientific industry, USA.        |
| Thermal cycler   | Bio-Rad Laboratory, USA.         |

## APPENDIX C

### Reagent and buffers preparation

#### 1. Reagent for cell culture

##### 1.1 DMEM medium

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| DMEM power                            | 13.5 g |
| HEPES                                 | 3.57 g |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 3,7 g  |
| Antibiotics (Penicillin-streptomycin) | 10 ml  |

Add distilled water to 1 liter and adjust pH to 7.4 and sterile by Millipore filter membrane (0.22 µm).

#### 2. Reagent for ELISA

##### 2.1 Phosphate buffer saline (PBS)

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 8.00 g |
| KCl                              | 0.20 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.44 g |
| Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.24 g |

All reagents were dissolved in distilled water and made up volume to 1 L.

##### 2.2 Tris Incubation buffer

|          |        |
|----------|--------|
| BSA      | 1.0 g  |
| Tween-20 | 1.0 ml |
| NaCl     | 8.77 g |

Tris-HCl 1.21 g

All reagents were dissolved in 900 ml of distilled water, adjust pH to 7.4 and made up volume to 1 L. Stored at 4°C.

### 2.3 Citrate phosphate buffer

Citric acid monohydrate 10.30 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 18.16 g

All reagents were dissolved in 900 ml of distilled water, adjusted pH to 5.0 and made up volume to 1 L. Stored reagent at 4°C.

### 2.4 Substrate solution

OPD 8 mg

Citrate phosphate buffer 12 ml

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 μL

Prepare reagent fresh for 1 plate; keep in dark before use.

## 3. Reagent for enzyme digestion

### 3.1 Chondroitinase ABC buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 8.0 and 0.06 M CH<sub>3</sub>COONa

## 5. Carbazole Assay

Stock solution of glucuronic acid ( 40 μg/ml)

**Reagent A:** 0.025 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> in Conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Reagent B:** Carbazole 50 mg in 40 ml Absolute ethanol

Working solution for standard curve

| Glucuronic acid ( $\mu\text{g}$ ) | DDI water ( $\mu\text{L}$ ) | Glucuronic acid ( $\mu\text{L}$ ) |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0                                 | 60                          | 0                                 |
| 0.48                              | 48                          | 12                                |
| 1.0                               | 35                          | 25                                |
| 1.5                               | 22.5                        | 37.5                              |
| 2.0                               | 10                          | 50                                |
| 2.4                               | 0                           | 60                                |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## APPENDIX D

### Oral presentation and published the proceeding

ที่ ศส.๐๕๒๓.๒๐๖๖/๑๘๖



สำนักบริหารและพัฒนางานวิชาการ  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย  
จังหวัดเชียงใหม่ ๕๐๒๓๐



๒๖ สิงหาคม ๒๕๖๓



เรื่อง ตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัย

เรียน นางสาวดวงพรณิ สมบุญ

ตามที่กลุ่มภารกิจบัณฑิตศึกษา สำนักบริหารและพัฒนางานวิชาการ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้จัดให้มีการประชุมวิชาการ “การเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ ๙” ในวันที่พุธที่ ๑ กันยายน ๒๕๖๓ ณ ห้องพอลิเทคนิคเมอริทาร์ อาคาร ๒๕ ปี ศูนย์กิจการเกษตร คณะบริหารธุรกิจ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งท่านได้นำเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อเรื่อง “ผลของพริกส้มฝรั่งมิ่งโกวิทพันธุ์เคอร์เบต้า-1 ต่อการแสดงออกของฮีสโตไซยาสูโรแนบซินเทส-2 และการสังเคราะห์ไฮยาสูโรแนบซิน ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของวัว” นั้น

กลุ่มภารกิจบัณฑิตศึกษา ขอแจ้งตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัยของท่านในหัวข้อดังกล่าว โดยนำเสนอในรูปแบบบรรยาย ทั้งนี้ กลุ่มภารกิจบัณฑิตศึกษาจะดำเนินการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในรายงานการประชุม (Proceeding) ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(อาจารย์พงษ์ศักดิ์ รามทวีป)

รองผู้อำนวยการสำนักบริหารและพัฒนางานวิชาการฝ่ายวิชาการและสารสนเทศ  
รักษาการแทนผู้อำนวยการสำนักบริหารและพัฒนางานวิชาการ

กลุ่มภารกิจบัณฑิตศึกษา

โทรศัพท์ ๐ ๕๓๘๓๗ ๓๒๕๑ - ๔

โทรสาร ๐ ๕๓๘๓๗ ๘๑๓๓

**ผลของทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์ เบต้า-1 ต่อการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส-2 และการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนนในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของม้า**  
**Effect of transforming growth factor beta-1 on hyaluronan synthase-2 gene expression and hyaluronan synthesis in equine chondrocytes culture**

อรพรรณ สมหนู<sup>1</sup>, ศิริพร เพียรสุขมณี<sup>3</sup>, พีรพรรณ โปธาเจริญ<sup>2</sup>, ปรัชญา คงทวีเลิศ<sup>2</sup> และ ศิริวรรณ องค์กรไชย<sup>2</sup>

Oraphan Somnoo, Siriporn Peansukmanee, Peraphan Pothacharoen, Prachya Kongtawelet and Siriwan Ongchai

**บทคัดย่อ**

**บทนำ:** Transforming growth factor-beta (TGF-β) เป็น Growth factor ที่ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อน สารนี้กระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนให้สังเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เช่น aggrecan และ type II collagen อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานผลของ TGF-β1 ต่อการสังเคราะห์ hyaluronan (HA) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน hyaluronan synthase-2 (HAS-2) ในเซลล์กระดูกอ่อนของม้า HA เป็นสารชีวโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งของกระดูกอ่อนที่มีความสำคัญต่อการสร้างและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

**วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาผลของ TGF-β1 ต่อการแสดงออกของ hyaluronan synthase-2 (HAS-2) และการสังเคราะห์ HA ในเซลล์กระดูกอ่อนของม้า

**วิธีการ:** เตรียมเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อเข่า (carpal joints) ของม้าที่เสียชีวิตไม่เกิน 6 ชั่วโมงเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มี TGF-β1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) 3-7 วัน วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี alamar blue น้ำเลี้ยงถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ HA ด้วยวิธี ELISA ส่วนการวิเคราะห์ผลของ TGF-β1 ต่อยีน HAS-2 ทำโดยเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มี TGF-β1 2.5 ng/ml เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำเซลล์มาวิเคราะห์การแสดงออกของ HAS-2 ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

**ผลการทดลอง:** พบว่า TGF-β1 เพิ่มการสังเคราะห์ HA อย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของ TGF-β1 และพบว่าการแสดงออกของยีน HAS-2 เพิ่มมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกกระตุ้นนาน 3 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TGF-β1 แต่ TGF-β1 ไม่มีผลเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

**สรุป:** TGF-β1 กระตุ้นการแสดงออกของยีน HAS-2 ในเซลล์กระดูกอ่อนม้า ส่งผลให้การสังเคราะห์ HA เพิ่มขึ้นซึ่งสำคัญต่อการสร้างและพัฒนาของเนื้อเยื่อ ทำให้มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อน

**คำสำคัญ :** เซลล์กระดูกอ่อนม้า, ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบต้า-1, ไฮยาลูโรแนนซินเทส-2, ไฮยาลูโรแนน

<sup>1</sup> นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<sup>2</sup> หน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<sup>3</sup> ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## Abstract

**Introduction:** Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) is a growth factor that commonly used in cartilage tissue engineering to stimulate synthesis of cartilage matrix biomolecules in chondrocytes such as aggrecan and type II collagen. HA is one of cartilage molecules which plays important role in tissue formation and growth. Nevertheless, effect of TGF- $\beta$ 1 on hyaluronan synthase-2 (HAS-2) dependent hyaluronan (HA) synthesis in equine chondrocytes has not been reported.

**Objective:** To study effect of TGF- $\beta$ 1 on HAS-2 gene expression and HA synthesis in equine chondrocytes.

**Method:** The primary equine chondrocytes were prepared from cartilage of carpal joint, and were cultivated in DMEM supplemented with 10%FCS and TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) for 3-7 days. Cell proliferation was evaluated using the Alamar blue assays and HA level in the cultured medium was analyzed by ELISA technique. For study HAS-2 gene expression, cells were treated with 2.5 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 at 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36 and 48 hrs, then the total RNA was extracted and the level of HAS-2 gene expression was evaluated using semi-quantitative RT-PCR.

**Result:** TGF- $\beta$ 1 significantly enhanced HAS-2 gene expression and HA synthesis in dose-dependent manner. Expression of HAS-2 gene was found highest at the third hour of stimulation, whereas cell proliferation was not affected.

**Conclusion:** TGF- $\beta$ 1 stimulated HAS-2 expression in cultured equine chondrocytes and increased HA synthesis, which may involve in development of cartilage tissue. Thus, it's useful for applied in cartilage tissue engineering.

**Keyword:** equine chondrocytes, TGF- $\beta$ 1, hyaluronan synthase-2, HA

## คำนำ

Growth factor เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ที่มีการศึกษากันอย่างมากในเซลล์กระดูกอ่อนคือ transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) ซึ่งเป็น growth factor ที่มีบทบาทต่อกระบวนการทางชีววิทยาของเซลล์อย่างหลากหลาย ทั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation), differentiation, การพัฒนาตัวอ่อน, กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อ ตลอดจนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่างๆ (Gordon KJ and Blobe GC, 2008) ในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม TGF- $\beta$  จะมีอยู่ 3 isotypes ได้แก่ TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 และ TGF- $\beta$ 3 (Iqbal J, Dudhia J, Bird JL and Bayliss MT, 2000.) ผลของ TGF- $\beta$  ต่อพฤติกรรมของเซลล์นั้นค่อนข้างที่จะซับซ้อน โดยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อม ชนิดของเซลล์ รวมไปถึงลักษณะการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการศึกษาในเซลล์ ส่วนผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้เคยศึกษาพบว่า TGF- $\beta$ 1 เพิ่มการสังเคราะห์ proteoglycan และเพิ่มการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่สอง ในเซลล์กระดูกอ่อนของกระต่าย (Lee MC

et. al., 2000) ในเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อ (synovial membrane fibroblasts) ของกระดูก และ เซลล์สร้างเส้นใยที่ผิวหนังของคน (human skin fibroblast) เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 ทำให้การแสดงออกของยีน hyaluronan synthase-2 (HAS-2) เพิ่มขึ้น (Little CB, Ghosh P and Rose R, 1997; Rosedale PD, Hopes R, Digby NJ and offord K, 1985) ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ hyaluronan synthase สำหรับสังเคราะห์ HA ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีการศึกษาพบว่ายีน HAS-2 จะแสดงออกมากในช่วงที่ตัวอ่อนกำลังเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังศึกษาในหนูที่มีความบกพร่องของยีน HAS-1 และ HAS-3 พบว่าหนูยังมีการพัฒนาของตัวอ่อนเป็นปกติอยู่ แต่ในหนูที่มีความบกพร่องของ HAS-2 นั้นตัวอ่อนจะมีการพัฒนาเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ที่ผิดปกติอย่างรุนแรง

HA เป็น glycosaminoglycan ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยเป็นน้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่ N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) และ D-glucuronate (GlcA) เรียงต่อกันแบบซ้ำๆ การสังเคราะห์ HA จะถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ที่ตรึงอยู่ที่ผนังของเซลล์ ขนาดความยาวสายโพลีเมอร์ของ HA นั้นจะถูกกำหนดจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย HA นั้นๆ คือ เอนไซม์ hyaluronan synthase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมียีนที่เข้ารหัสสร้าง hyaluronan synthase ที่ต่างกันอยู่ 3 ยีนคือ HAS-1, HAS-2 และ HAS-3 โดย hyaluronan synthase จากยีนทั้งสามนั้นจะมีความสามารถในการสร้างสายโพลีเมอร์ของ HA ที่ต่างกันทั้งด้านปริมาณ และขนาดความยาวของสาย HA ที่ผนังเซลล์ของเซลล์กระดูกอ่อนมี receptor ที่ HA สามารถเข้าไปจับได้ เช่น CD 44 เมื่อ HA เข้าไปจับ จะเกิดการส่งสัญญาณที่มีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูกอ่อน (Ratcliffe A, 1996) งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า HA มีส่วนสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เช่น การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Inoue M, Katakami C, 1993) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (Turley EA, 1992) จนพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่างๆ ขึ้น และมีรายงานว่า HA สามารถเหนี่ยวนำให้ embryonic mesenchymal stem cell พัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้ (Toole BP, 2001; Kujawa MJ and Caplan AI, 1986) ดังนั้น HA จึงน่าจะมีบทบาทที่สำคัญต่อการสร้างและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการแสดงออกของยีน HAS-2 ในเซลล์กระดูกอ่อนของม้า จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ว่าจะสามารถเพิ่มการแสดงออกของ hyaluronan synthase-2 (HAS-2) และกระตุ้นการสังเคราะห์ HA ในเซลล์กระดูกอ่อนของม้าได้หรือไม่ โดยติดตามจากปริมาณการแสดงออกของยีน hyaluronan synthase-2 (HAS-2) ซึ่งเป็นยีนสำหรับเอนไซม์ hyaluronan synthase ที่สร้างสาย HA ที่มีขนาดใหญ่ ร่วมกับการวิเคราะห์จากปริมาณของ HA ที่เซลล์กระดูกอ่อนสร้าง ซึ่งหากพบว่า TGF- $\beta$ 1 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน HAS-2 ในเซลล์กระดูกอ่อนของม้า ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนแล้ว ความรู้พื้นฐานนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อสร้างชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของม้า เพื่อนำไปรักษาม้าที่มีปัญหาเกี่ยวกับโรคข้อได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การแยกและเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน

นำเอาชิ้นกระดูกอ่อนของม้าจากข้อเข่า (carpal joints) มาล้างด้วย Phosphate buffer solution (PBS) 2 ครั้ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ย่อย extracellular matrix ข้ามคืนด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (type I collagenase) 2.5 mg/ml จากนั้นดูดเอาเซลล์กระดูกอ่อนออกมา เลี้ยงต่อในขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% FCS (fetal calf serum)

### การกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนในการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ

การกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน HAS-2 นำเซลล์กระดูกอ่อนมาเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (12,000 cells/cm<sup>2</sup>) ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FCS อยู่ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตได้ประมาณ 80% ของพื้นที่ในขวดเลี้ยงเซลล์จึงอดอาหารเซลล์โดยเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FCS อยู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนด้วย TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) นาน 0-48 ชั่วโมง แล้วเก็บเซลล์ไปสกัด mRNA และนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR ต่อไป ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์เก็บไปวิเคราะห์ปริมาณ HA

การกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อศึกษาปริมาณการสังเคราะห์ HA ของเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน (12,000 cells/cm<sup>2</sup>) ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FCS อยู่ 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FCS และ TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) ต่อ 3 วัน แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณ HA เก็บเซลล์ไปหา DNA content

### การวิเคราะห์ปริมาณ HA (Enzyme-linked immunosorbent assay for HA)

นำ microtiter plates (Maxisorp, Nunc) มาเคลือบด้วย umbilical cord HA (100  $\mu$ l/well) ใน coating buffer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ที่งัวข้ามคืน block บริเวณที่ไม่ถูกเคลือบ ด้วย 1% (w/v) BSA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเซลล์หรือสารมาตรฐานของ HA (Healon: 39.06-10,000 ng/ml) จะถูกนำมาผสมกับ B-HABPs (biotin-HA binding proteins) ในอัตราส่วน 1:1 นำสารละลายผสมนี้เติมในหลุมของ plates ที่เตรียมไว้ เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง จึงล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง แล้วเติม peroxidase-mouse monoclonal anti-biotin เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง จึงล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง แล้วเติม peroxidase substrate รอให้เกิดสีประมาณ 15 นาที แล้วเติม 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ลงไป จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492/690 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปแปรผลโดยใช้ Genesis software

**ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)**

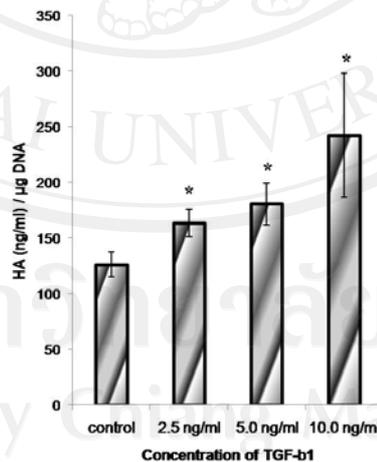
สกัด RNA จากเซลล์ จากนั้นนำ RNA มาทำ first strand cDNA นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดย primers ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ HAS-2 (5'-AGAGAAGTCATGTACACGGCCTTC-3' และ 5'-GGTCTGCTGGTTAAC-CATCTGAG-3') และ GAPDH (5'-TGGTATCGTGAAGGACTCAT-3' และ 5'-GTGGGTGCTGCTGTT-GAAGTC-3') เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนกับ house-keeping gene GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase)

**วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation)**

เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน (5,000 cells/cm<sup>2</sup>) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FCS และ TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) ได้ครบตามวันที่กำหนดไว้ (วันแรก, วันที่ 4 และวันที่ 7) ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% ซีรัมอลามาร์บิลอยู่ลงไป เลี้ยงเซลล์ต่อ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสีย้อมโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และ 630 นาโนเมตร

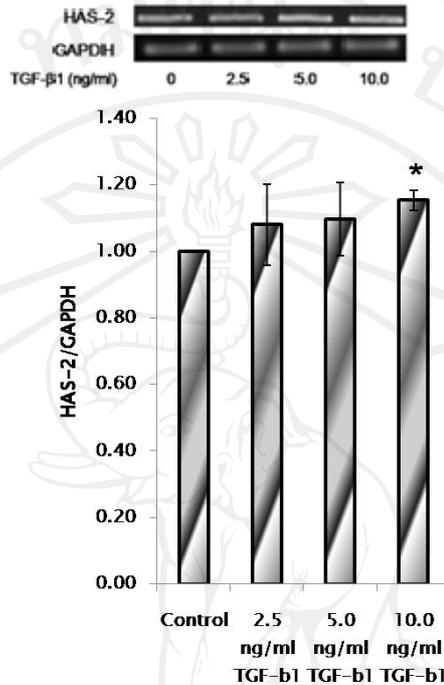
**ผลและวิจารณ์**

ในการศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการสังเคราะห์ HA ในเซลล์กระดูกอ่อน หลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ng/ml นาน 3 วัน พบว่า TGF- $\beta$ 1 กระตุ้นการสังเคราะห์ HA แบบ dose-dependent manner อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1)



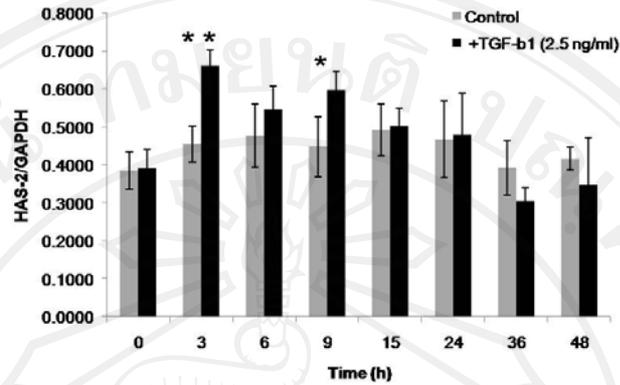
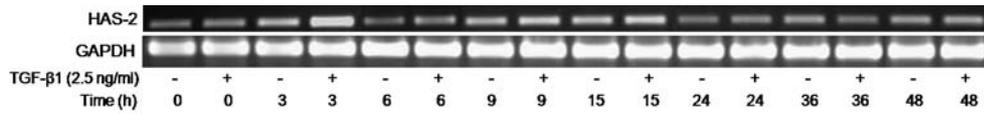
ภาพ 1: ปริมาณ HA (ng/ml/  $\mu$ g DNA) ในน้ำเลี้ยงที่ถูกสังเคราะห์โดยเซลล์กระดูกอ่อนมาที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) นาน 3 วัน (\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.05$ , Error bar=SD, n=3)

ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีน HAS-2 หลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ng/ml นาน 3 ชั่วโมง พบว่ายีน HAS-2 ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 10.0 ng/ml (ภาพที่ 2)

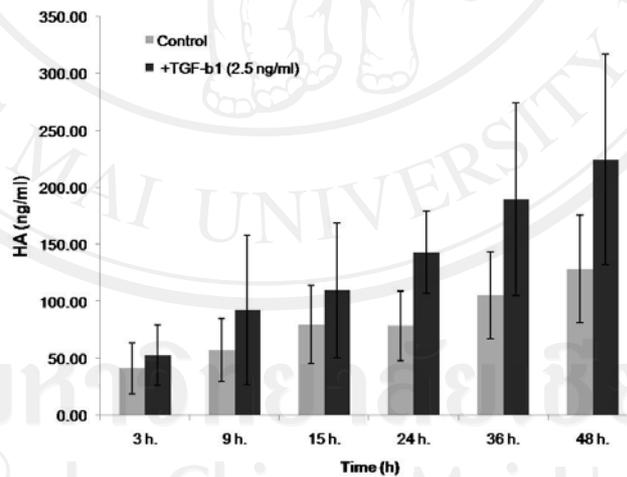


ภาพ 2: ปริมาณ mRNA ของยีน HAS-2 ในเซลล์กระดูกอ่อนม้าหลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) นาน 3 ชั่วโมง (\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.05$ , Error bar=SD, n=3)

ในการศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีน HAS-2 ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง หลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 2.5 ng/ml พบว่ายีน HAS-2 แสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 นาน 3 และ 9 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) เมื่อหาปริมาณ HA ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่างๆ พบว่าการสังเคราะห์ HA ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 จะมีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ภาพที่ 4)



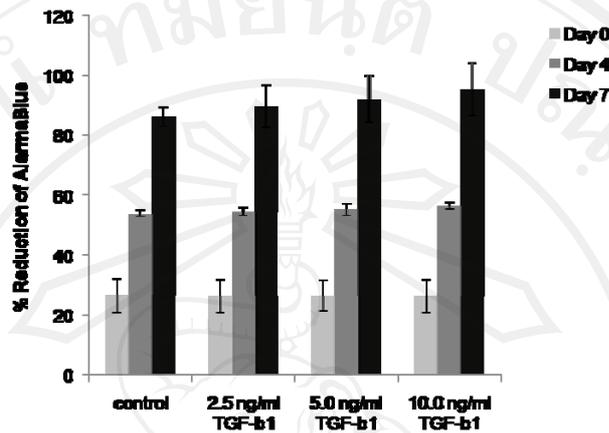
ภาพ 3: ปริมาณ mRNA ของยีน HAS-2 ในเซลล์กระดูกอ่อนม้าหลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 2.5 ng/ml ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.05$ , \*\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.01$ , Error bar=SD, n=3)



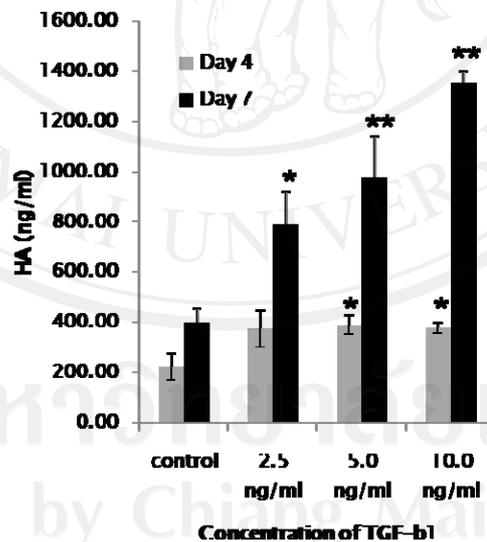
ภาพ 4: ปริมาณ HA (ng/ml) ในน้ำเลี้ยงจากเซลล์กระดูกอ่อนม้าซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 2.5 ng/ml ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (ng/ml/ μg DNA) (\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.05$ , Error bar=SD, n=3)

ส่วนในการศึกษาผลของ TGF-β1 ต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อน หลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ng/ml นาน 4 และ 7 วัน พบว่า TGF-β1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ไม่มีผลอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งในวันที่ 4 และ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ภาพที่ 5) เมื่อวัดปริมาณ HA ในน้ำเลี้ยงเซลล์พบว่าการสังเคราะห์ HA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มีการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ซึ่งจะเห็นชัดเจนในวันที่ 7 (ภาพที่ 6)



ภาพ 5: อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนของม้า หลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) ในวันที่ 0, 4 และ 7 โดยวิธี alamar blue (\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.05$ , Error bar=SD, n=3)



ภาพ 6: ปริมาณ HA (ng/ml) ในน้ำเลี้ยงจากเซลล์กระดูกอ่อนม้าซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) ในวันที่ 4 และ 7 (\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.05$ , \*\* คือ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control หรือ  $P < 0.01$ , Error bar=SD, n=3)

HA เป็นโมเลกุลสำคัญที่ประกอบอยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน นอกจากนี้มีความสำคัญต่อคุณสมบัติเชิงกลของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนแล้วยังมีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูกอ่อน เช่น พบว่า exogenous HA กระตุ้นการสังเคราะห์ glycosaminoglycan chondroitin sulfate ในเซลล์กระดูกอ่อนของกระดูกตาย (Kawasaki K, 1999) และเพิ่มการสังเคราะห์ proteoglycan ใน เซลล์กระดูกอ่อนของม้า (Freen SP, Abraham LA and Lees P, 1999) การสังเคราะห์ HA นั้นถูกกระตุ้นได้โดยสารต่างๆ เช่น TGF- $\beta$ 1 และจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ผลเช่นเดียวกันเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนของม้าด้วย TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณของ HA ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ control แบบ dose-dependent manner เช่นเดียวกันเมื่อศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการแสดงออกของยีน HAS-2 ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ hyaluronan synthase สำหรับสังเคราะห์ HA พบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 10.0 ng/ml จะเหนี่ยวนำให้ยีน HAS-2 แสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นได้ว่าปริมาณการสังเคราะห์ HA ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน HAS-2 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1

ในการศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีน HAS-2 ที่เวลาต่างๆกัน เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 เปรียบเทียบกับ control พบว่ายีน HAS-2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากถูกกระตุ้น 3 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมง มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่า ยีน HAS-2 มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์สร้างเส้นใยของกระดูกตาย หลังจากถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 นาน 6 ชั่วโมง (Tanimoto K, et al. 2004.) จะเห็นว่าปริมาณ mRNA ของ HAS-2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการกระตุ้น และจากนั้นจะลดลง ซึ่งต่างจากการสังเคราะห์ HA ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป เป็นไปได้ว่าอายุและความเสถียรของ mRNA ของ HAS-2 นั้นสั้น ถูกสร้างออกมาไม่นานก็สลายไป แต่เอนไซม์ hyaluronan synthase ที่ถูกสังเคราะห์จาก HAS-2 mRNA นั้นยังคงอยู่ที่ผนังเซลล์ และสามารถสังเคราะห์ HA ได้เรื่อยๆ ทำให้เมื่อเวลาผ่านไป แม้ปริมาณของ HAS-2 mRNA จะลดลง แต่การสังเคราะห์ HA นั้นยังเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป

จากการศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนของม้า พบว่า TGF- $\beta$ 1 ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งวันที่ 4 และ วันที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับ control แต่ก็ยังมีการสังเคราะห์ HA ที่เพิ่มขึ้นในภาวะที่มีการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 จึงเป็นการยืนยันว่าปริมาณ HA ที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นเป็นผลมาจาก TGF- $\beta$ 1 กระตุ้นเซลล์ให้มีการแสดงออกของยีน HAS-2 เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสังเคราะห์ HA มากขึ้น โดย TGF- $\beta$ 1 ไม่ได้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ มีรายงานผลของ TGF- $\beta$ 1 ในเซลล์ perichondrial พบว่า TGF- $\beta$ 1 เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของ เซลล์ perichondrial (Lee MC, et al. 2000) ซึ่งให้ผลต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเนื่องจากว่า ผลของ TGF- $\beta$  ต่อพฤติกรรมของเซลล์นั้นค่อนข้างที่จะซับซ้อน โดยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อม ชนิดของเซลล์ อายุของเซลล์ รวมไปถึงลักษณะการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย

## สรุป

TGF- $\beta$ 1 กระตุ้นการแสดงออกของยีน HAS-2 ในเซลล์กระดูกอ่อนม้า ส่งผลให้การสังเคราะห์ HA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับ control

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และหน่วยความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### เอกสารอ้างอิง

- Frean SP, Abraham LA, Lees P. In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Res Vet Sci.* 1999;67(2):183-90.
- Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(4):197-228.
- Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol.* 1999;179(2):142-8.
- Kujawa MJ, Caplan AL. Hyaluronic acid bonded to cell-culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cell cultures. *Dev Biol.* 1986;114(2):504-18.
- Lee MC, Goomer RS, Takahashi K, Harwood FL, Amiel M, Amiel D. Transforming growth factor beta one (TGF-beta 1) enhancement of the chondrocytic phenotype in aged perichondrial cells: an in vitro study. *Iowa Orthop J.* 2000;20:11-6.
- Little CB, Ghosh P, Rose R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997;5(3):161-72.
- Ratcliffe A. Articular cartilage. In: Comper WD, editor. *Extracellularmatrix*: Harwood academic; 1996.
- Inoue M, Katakami C. The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(7):2313-5.
- Rossdale PD, Hopes R, Digby NJ, offord K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec.* 1985;116(3):66-9.
- Stock AE, Bouchard N, Brown K, Spicer AP, Underhill CB, Dore M, et al. Induction of hyaluronan synthase 2 by human chorionic gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Endocrinology.* 2002;143(11):4375-84.
- Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12(2):79-87.
- Turley EA. Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11(1):21-30.

## CURRICULUM VITAE

**Name:** Miss Oraphan Somnoo

**Date of birth** 22 April 1984

### Education

2003-2007 B.Sc. (Biochemistry and Biochemical Technology), Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand

2008-2010 M.Sc. (Biochemistry), Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

### Activity

- Oral presentation and published the proceeding in “การประชุมวิชาการ: เสนอผลงานระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 4” in the topic name of “ผลของทรานส์ฟอร์มมิ่ง

โคโรน่าแฟกเตอร์เบต้า-1 ต่อการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส-2 และการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนนในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของม้า”