



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของสารชีววาสเทตินต่อการ
กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส
ของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

โดย นายพสุธา วัฒนฤทธิกุลไพศาล และคณะ

30 มิถุนายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของสารชีววาสเตติน ต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์
และระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

คณะผู้วิจัย

1. นายพสุธา ธีัญญะกิจไพศาล

2. Dr. Joseph P. Bidwell

สังกัด

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Medical school, Indiana University, USA

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มอบให้หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

22 / ก.ย. / 46

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ. นพ. รัชตะ รัชตะนาวิน ผศ. ทญ. ดร. วิสาขะ ลิ้มวงศ์ และ ผศ. ทญ. ดอลลี เมธาธารธิป ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณ รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์ ที่ให้คำแนะนำการแยกเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกศีรษะของหนู และ Professor Dr. Shohei Kasugai ที่ให้คำแนะนำในการแยกเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกของหนู ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอนุญาตใช้สถานที่และอุปกรณ์เพื่อการวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนหลังปริญญาเอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2544 และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2544

เลขหมู่

เลขทะเบียน 011657

วัน,เดือน,ปี ๕๖ ก.ช.๔๘

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/30/2544
 ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของสารซิมวาสเตติน ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก
 นักวิจัย และสถาบัน : 1. นายพสุธา ฐัญญะกิจไพศาล
 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 2. Dr. Joseph P. Bidwell
 Medical school, Indiana University, Indiana
 Email Address : pthunyak@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกระดูกซี่โครงของหนูแรกเกิดและเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู โดยเซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินในระดับความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที, [³H] thymidine incorporation assay และ Northern blot ตามลำดับ ผลการทดลองพบสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกระดูกซี่โครงและไขกระดูกของหนูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินจะถูกยับยั้งด้วยสารเมวาโลเนตตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบด้วยวิธี [³H] thymidine incorporation assay พบสารซิมวาสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 10, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมร้อยละ 17, 25, 18 และ 32 ตามลำดับ และมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-myc ร้อยละ 32, 17, 20 และ 22 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า สารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของ c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

คำหลัก : เซลล์สร้างกระดูก ซิมวาสเตติน การเพิ่มจำนวนเซลล์

Abstract

Project Code : PDF/30/2544

Project Title : Effects of simvastatin on the proliferation and the mRNA levels of c-fos and c-myc in primary calvarial cells and primary bone marrow stromal cells

Investigators Dr. Pasutha Thunyakitpisal
Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
Dr. Joseph P. Bidwell
Medical school, Indiana University, Indiana

Email Address : pthunyak@yahoo.com

Project Period 2 years

The objectives of this study is to investigate the effect of simvastatin on the proliferation and the mRNA levels of c-fos and c-myc on primary calvarial cells and primary bone marrow stromal cells. Cells were treated with the different concentrations of simvastatin for 24 hours. After that, cells were collected and analyzed by using MTT, [³H] thymidine incorporation assay and northern blot analysis, respectively. The results revealed that the toxicity dose of simvastatin in primary calvaria and bone marrow stromal cells is 2 μM as compared to the control group (p<0.05). The toxicity of simvastatin was rebound by mevalonate in a dose-dependent manner. From [³H] thymidine incorporation assay, simvastatin, at 0.5 and 1 μM, significantly suppressed the proliferation of primary calvarial cells as compared to the control group (p< 0.05). Simvastatin, at 10, 100 and 500 nM, reduced c-fos mRNA level at 17, 25, 18 and 32 percent from the control group, respectively. In the same concentration, simvastatin downregulated c-myc mRNA level at 32, 17, 20 and 22 percent from the control group, respectively. From the results, simvastatin seems to be a suppressor of osteoblast proliferation and the mRNA level of c-fos and c-myc.

Keywords : Osteoblast, Simvastatin, Proliferation

สารบัญ

หน้าหัวเรื่อง	
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
บทนำ	1-2
วิธีการวิจัย	3-9
ผลการวิจัย	10-12
บทวิจารณ์	13-17
ส่วนอ้างอิง	18-23
รายการภาพประกอบ	
รูปที่ 1	24
รูปที่ 2	25
รูปที่ 3	26
รูปที่ 4	27
รูปที่ 5	28
รูปที่ 6	29
รูปที่ 7	30
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	31

บทนำ

กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) เป็นเนื้อเยื่อที่สำคัญของอวัยวะปริทันต์ ทำหน้าที่เป็นที่อยู่ของรากฟัน ที่ยึดเกาะของเอ็นยึดปริทันต์ รองรับและกระจายแรงที่เกิดจากการบดเคี้ยว ในผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่มีการทำลายกระดูกเบ้าฟัน จะมีการพยากรณ์โรคไม่ดี (poor prognosis) หากไม่ได้รับการรักษาทันตกรรมที่ กระดูกจะถูกทำลาย ทำให้ฟันโยก ไม่สามารถรองรับแรงบดเคี้ยว และต้องถอนออกไปในที่สุด โดยที่ฟันซี่นั้นอาจจะไม่ผุเลย ถึงแม้การรักษาโรคปริทันต์โดยการกำจัดหินน้ำลายและแผ่นคราบจุลินทรีย์ จะสามารถยับยั้งโรคไม่ให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อไป แต่การสร้างขึ้นมาใหม่ของกระดูกเบ้าฟันเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ พบว่าจะมีอัตราที่ต่ำมากและไม่แน่นอน¹ ดังนั้นการเร่งหรือกระตุ้นการสร้างขึ้นมาใหม่ของกระดูกเบ้าฟัน ย่อมมีส่วนสำคัญในการบูรณะอวัยวะปริทันต์ให้กลับมาทำงานได้ตามปกติ

โดยทั่วไปขั้นตอนของการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาทดแทน ประกอบด้วย 3 ระยะที่ต่อเนื่องกันคือ ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) จากนั้นเซลล์สร้างกระดูกจะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ทำงานสมบูรณ์ (cell differentiation and maturation) เพื่อเข้าสู่ระยะการสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix synthesis) และระยะการตกตะกอนสารอนินทรีย์ (mineralization) ตามลำดับ² โดยเซลล์สร้างกระดูกเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างขึ้นมาทดแทนของกระดูกเบ้าฟัน ดังนั้นสารที่มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ เร่งการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ทำงานสมบูรณ์ และการสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ ย่อมส่งผลทำให้การสร้างขึ้นมาทดแทนของเนื้อเยื่อกระดูกเร็วขึ้น

สารสเตตินเป็นยาที่ใช้ควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด และป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis)³ โดยสารกลุ่มสเตตินจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในการเปลี่ยน acetoacetyl CoA เป็นสารเมวาโลเนต

(mevalonate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างโคเลสเตอรอล³ ได้มีการรายงานถึงผลข้างเคียงของสารกลุ่มสเตตินที่มีต่อกระดูกที่ไม่สอดคล้องกัน โดยกลุ่มหนึ่งพบว่าสารกลุ่มสเตตินมีผลในการเพิ่มมวลของกระดูกโดยรวม แรงการหายของแผลและลดการหักของกระดูกในผู้ป่วยและสัตว์ทดลอง⁴⁻⁸ ในขณะที่นักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งได้รายงานว่าสารกลุ่มสเตตินไม่มีผลในการเพิ่มมวลของกระดูกโดยรวมของผู้ป่วยและชิ้นกระดูกที่แยกจากสัตว์ทดลอง⁹⁻¹³ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารซิมวาสเตติน (simvastatin) ต่อเซลล์สร้างกระดูกในแง่ของการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัสของจีน c-fos และ c-myc ซึ่งเป็นนิวเคลียสโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกในห้องปฏิบัติการ โดยความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นการสร้างข้อมูลความรู้พื้นฐานและความเข้าใจ ถึงผลและกลไกของสารซิมวาสเตตินต่อเซลล์สร้างกระดูก และอาจนำไปสู่การพัฒนาสารซิมวาสเตตินมาใช้ในงานทางด้านสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับกระดูก

วิธีการทดลอง

การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกศีรษะของหนูทดลอง

รูปแบบและขั้นตอนดัดแปลงมาจากวารสารที่ดีพิมพ์¹⁴⁻¹⁶ กล่าวคือกะโหลกศีรษะของลูกหนูอายุ 1-2 วัน จะถูกแยกจากส่วนของเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) และ เนื้อเยื่อที่ยึดระหว่างชั้นของกะโหลกศีรษะ (sutural fibrous tissue) จากนั้นชิ้นกระดูกก็จะถูกทำให้มีขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร และย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ II (collagenase type II, Gibco BRL, UK) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Hank's salt balance solution (Gibco BRL, UK) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นสารละลายจะถูกปั่นเพื่อรวบรวมเซลล์สร้างกระดูกที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นชิ้นกระดูกก็จะถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดที่ II ครั้งละ 20-30 นาที เป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยเซลล์ที่แยกได้จากการย่อยแต่ละครั้งจะถูกเรียกเป็น cell fraction ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ โดยเซลล์ fraction ที่ 3-5 จะถูกรวมด้วยกัน และนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 มิลลิเมตร (Nunc, Denmark) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ที่ประกอบด้วยซีรัม (fetal calf serum) ร้อยละ 10 กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรบโตมัซิน ซัลเฟต 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน เซลล์จะเจริญแบ่งตัวเต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายใน 7 วัน จากนั้นจะถูกถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 โดยเซลล์สร้างกระดูกที่ใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 2-4

วิธีการแยกเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกของหนู

วิธีการแยกเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกหนู ใช้วิธี density gradient centrifugation ดัดแปลงมาจาก Lisignoli และคณะ¹⁷ โดยย่อก็คือกระดูก femur จากหนูอายุประมาณ 5-7 สัปดาห์ จะถูกนำไปจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ ประมาณ 3-5 ครั้ง จากนั้นตัดส่วนหัว (head) ของกระดูกออก ให้ต่ำกว่าส่วน epiphyseal plate ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นส่วนไขกระดูกจะถูกชำระล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ อัลฟาเอ็มอีเอ็ม (α -MEM) ที่ประกอบด้วยซีรัม (fetal calf serum) ร้อยละ 10 กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรบโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทริซินบี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มเซลล์สร้างกระดูกจะถูกแยกจากเซลล์ไขกระดูกอื่นๆ ด้วย Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham, Sweden) ที่ความเร็ว 1,900 รอบต่อนาที กลุ่มเซลล์ mononucleus จะถูกรวบรวมและล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์อัลฟา-เอ็มอีเอ็มและนำไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน เมื่อเซลล์จะเจริญแบ่งตัวเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูก subculture เพื่อเพิ่มจำนวน โดยเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 2-5

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์และความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay) จะถูกนำมาใช้ทดสอบผลของสารซิมวาสเตดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งดัดแปลงและปรับปรุงจากวิธีของ Freshney¹⁸ โดยย่อก็คือ เซลล์สร้างกระดูกจะถูกหว่าน 30,000 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ แบบ 48 หลุม เมื่อจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีจำนวน

ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (80-90% confluency) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากซีรัม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดิน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันตามที่กำหนด จนครบเป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด ที่มีสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออก และใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide : DMSO) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การทดลองนี้ได้ถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี [³H] thymidine incorporation assay

วิธีวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี [³H] thymidine incorporation รูปแบบและขั้นตอนดัดแปลงมาจากวารสารทีดีพีเอ็มพี¹⁹⁻²¹ โดยยอเซลล์จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 48 หลุม หลุมละ 30,000 เซลล์ เซลล์จะถูกเลี้ยงจนได้ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นแบบปราศจากซีรัม 2 ครั้ง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง เซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยน (Phosphate buffer saline : PBS) จำนวน 3 ครั้ง และถูกตรึงด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วยสารละลาย TCA ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง สาย DNA จะถูกละลายโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

(NaOH) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 16 ชั่วโมง และปรับสภาวะความเป็นกรดต่างด้วยกรดไฮโดรคลอไรด์ (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นสารละลายจะถูกใส่ในขวดพลาสติกที่มีสาร Scintillation fluid (Wallac Scintillation Product, UK) และวัดปริมาณสาร [^3H] thymidine ด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter Wallac-1414 (Biorad, USA) การทดลองนี้ได้ถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การแยกสายอาร์เอ็นเอโดยรวมจากเซลล์สร้างกระดูก

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู จะถูกเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงจนได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นแบบปราศจากซีรั่ม 2 ครั้ง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สายอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จะถูกแยกจากเซลล์ ด้วยสาร TRIzol reagent (GibcoBRL, UK) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่สาร TRI reagent 3 มิลลิลิตร จากนั้นสายอาร์เอ็นเอทั้งหมดจะถูกรวบรวมและเขย่าอย่างแรง ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนกลุ่มไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein complex) ให้ออกจากกัน สารคลอโรฟอร์มจะเติมลงไปในการละลาย เขย่าอย่างแรง และนำไปปั่นแยกชั้นสายอาร์เอ็นเอโดยรวมจากส่วนของโปรตีนและสายดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยสารละลายในส่วนบนที่เป็นส่วนสายอาร์เอ็นเอโดยรวมจะถูกดูดแยก และทำให้ตกตะกอนด้วย isopropanol สายอาร์เอ็นเอโดยรวมที่ตกตะกอนจะถูกล้างด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นละลายสายอาร์เอ็นเอโดยรวมด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (RNase free water)

การวัดค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสายอาร์เอ็นเอโดยรวม ทำโดยคำนวณจากค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อการค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 280 โดยค่าอัตราส่วนที่ได้ ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 1.6

ส่วนความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอโดยรวม คำนวณจากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

$$= (\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260}) \times \text{Dilution factor} \times 40 / 1000$$

การสร้าง antisense radiolabeled riboprobe

pTRI vector ที่มีส่วนของท่อนจิ้น c-fos, c-myc และ GAPDH (Ambion Inc, USA) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ antisense radiolabel riboprobe ด้วยวิธี In vitro transcription โดยใช้ชุด Maxicript T7 RNA polymerase (Ambion Inc, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยย่คือ pTRI vector 1 ไมโครกรัมจะถูกใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1 มิลลิโมลาร์ของ ATP, CTP, GTP และ 8.35 ไมโครโมลาร์ (α -³²P) UTP (800 Ci/mmol, Amersham, England), 10 mM DTT, 10 unit ของ T7 RNA polymerase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงใส่เอนไซม์ Rnase-free Dnase เพื่อย่อยสารดีเอ็นเอต้นแบบ

Antisense radiolabeled riboprobe จะถูกทำให้ตกตะกอน เพื่อแยกจากนิวคลีโอไทด์อิสระ (free nucleotide) ด้วยสารละลาย ammonium acetate ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ absolute alcohol จำนวน 3 เท่าของปฏิกิริยา จากนั้น riboprobe จะถูกล้างด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ และถูกทำให้ละลายน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาณ 500 ไมโครลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยค่ากัมภาพรังสีของ riboprobe จะถูกวัดด้วยเครื่อง liquid Scintillation Counter Wallac-1414 (Biorad, USA)

การทำ Northern blot

อาร์เอ็นเอโดยรวม 1-5 ไมโครกรัม (total RNA) จากเซลล์สร้างกระดูก จะผสมกับ loading buffer (20 mM MOPs, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 0.025 (w/v) bromophenol blue, 70% formamide, 5% glycerol, 0.065% formaldehyde) และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสายอาร์เอ็นเอจะถูกแยกตามขนาดด้วย agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV illumination)

เจลจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที และปรับสภาพด้วย 10x SSC buffer (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate) สายอาร์เอ็นเอที่อยู่ในเจล จะถูกเคลื่อนย้ายมายังแผ่นเมมเบรน (Hybond N⁺, Amersham, USA) ด้วยวิธี capillary transfer เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และแผ่นเมมเบรนจะถูกทำให้แห้งและอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อยึดสารอาร์เอ็นเอให้อยู่กับแผ่นเมมเบรน

แผ่นเมมเบรนจะแช่ในสารละลาย Ultrahybrid (Ambion Inc, USA) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส และใส่สาร radiolabeled riboprobe ($0.5-1 \times 10^6$ cpm ต่อ 1 มิลลิตรของ Ultrahybrid) โดยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่ออย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นเมมเบรนจะถูกล้างด้วยสารละลาย low stringency washing buffer (2x SSC, 0.1% SDS) จำนวน 2 ครั้งๆละ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างต่อด้วยสารละลาย high stringency washing buffer (0.1x SSC, 0.1% SDS) จำนวน 2 ครั้งๆละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยสัญญาณของจีนที่สนใจจะปรากฏด้วยวิธี autoradiograph จากนั้นจะวัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Densitometer

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (One-way Analysis of Variance) และแบบทดสอบของ scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทั้งนี้ในการวัดผลจะให้ค่าเฉลี่ยที่อ่านได้ในกลุ่มควบคุมเป็น 100 หรือแสดงในรูปอัตราส่วนเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลอง

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตติน ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ ด้วยสารเอ็มทีที ในสภาวะปราศจากซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ มีผลลดจำนวนเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 98.35 ± 3.69 , 95.49 ± 0.57 , 92.19 ± 2.07 , 93.89 ± 0.77 , 91.88 ± 1.25 , 92.62 ± 3.68 และ 87.97 ± 4.59 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย โดยสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ (2 ไมโครโมลาร์) มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู ดังแสดงในกราฟรูปที่ 1

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตติน ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกด้วยสารเอ็มทีที ในสภาวะปราศจากซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ มีผลเพิ่ม/ลดจำนวนเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 100.46 ± 5.35 , 99.93 ± 4.28 , 97.79 ± 7.96 , 97.98 ± 6.11 และ 89.25 ± 7.06 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละร้อย โดยที่ความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ (2 ไมโครโมลาร์) มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2

สารซิมวาสเตดินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ

ผลของสารซิมวาสเตดินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ
หนู ได้นำมาทดสอบด้วยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay จากการศึกษาพบว่าสารซิม
วาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ มีผลยับยั้งการ
เพิ่มจำนวนเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 84.23 ± 6.4 , 87.84 ± 1.98 , 79.91 ± 10.45 , 80.13 ± 6.29 , $73.39 \pm$
 2.41 , 42.13 ± 2.94 และ 34.17 ± 9.39 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวนเซลล์
เป็นร้อยละร้อย โดยที่ความเข้มข้น 500 ($p < 0.01$), 1000 ($p < 0.001$) และ 2000 ($p < 0.001$) นาโนโม
ลาร์ มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดินสามารถยับยั้งด้วยสารเมวาโลเนต

เมื่อทดสอบสารซิมวาสเตดินที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารเมวาโลเนต ซึ่งเป็น
สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ
500 ไมโครโมลาร์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารเมวาโลเนตมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเพิ่ม
ขึ้นร้อยละ 102.42 ± 12.23 , 118.59 ± 5.19 , 133.07 ± 6.23 , 132.95 ± 7.82 และ 138.45 ± 7.35 ตาม
ลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารซิมวาสเตดินเพียงอย่างเดียวซึ่งให้จำนวนเซลล์เป็นร้อยละ
ร้อย โดยที่ความเข้มข้นของสารเมวาโลเนต 50, 100 และ 500 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$, $p < 0.01$ และ $p < 0.005$ ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4

เซลล์สร้างกระดูกเมื่อถูกทดสอบด้วยสารเมวาโลเนตที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์เพียง
อย่างเดียว พบว่าจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่วัดได้ (99.2 ± 7.51) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (100 ± 2.69) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้จำนวน
เซลล์เป็นร้อยละร้อย (รูปที่ 5)

สารชีววาสเดตินลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก

เมื่อทดสอบเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ ด้วยสารชีววาสเดติน ในสภาวะปราศจากซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos และ c-myc ด้วยวิธี Northern blot พบว่า สารชีววาสเดตินที่ความเข้มข้น 10, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos ร้อยละ 17, 25, 18 และ 32 ตามลำดับ (รูปที่ 6) และที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารชีววาสเดตินมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-myc ร้อยละ 32, 17, 20 และ 22 ตามลำดับ (รูปที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ กลุ่มผู้วิจัยได้นำเสนอ ผลของการศึกษาความเป็นพิษของสารซิมวาสเตติน ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกระดูกไขกระดูกและไขกระดูกของหนู โดยใช้วิธีการวัดปริมาณของเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที ผลของสารซิมวาสเตตินต่อการเพิ่ม/ลด จำนวนเซลล์ โดยวิธี $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay และผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-fos และ c-myc โดยวิธีวิเคราะห์ Northern blot

สารกลุ่มสเตติน ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3 methyl glutary-CoA reductase ในการสร้างสารเมวาโลเนตซึ่งจะนำไปสร้างเป็นโคเลสเตอรอลในที่สุด นอกจากนี้สารกลุ่มสเตตินยังมีผลยับยั้งการสร้างกลุ่ม isoprenoid เช่น geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) และ farnesyl pyrophosphate (FPP) ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมกลุ่มไขมัน (lipid attachment) ให้กับนิวเคลียสโปรตีน small GTPase เช่น Ras และ Rho GTPase²³⁻²⁴ ทำให้ ras และ rho สามารถยึดเกาะและเคลื่อนที่ไปมารอบผนังเซลล์ ไปยังตำแหน่งเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ต้องเคลื่อนที่ผ่านส่วนไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ โดยที่ส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic part) สามารถทำงานซึ่งเกี่ยวข้องการถ่ายทอดสัญญาณจากตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ (cell surface receptor) ส่งต่อมายังภายในเซลล์ (signal transduction) โดยโปรตีน ras และ rho มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์²⁵

การวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยสารเอ็มทีที ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารที่ต้องการทดสอบ โดยอาศัยหลักการที่ตรวจวัดระดับของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ที่พบอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการหายใจ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีที เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซัน (formazan) สีม่วง^{18,25} เมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม ก็จะสามารถนำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ฐานเพื่อหาปริมาณเซลล์ ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก สีม่วงของสารละลายของผลึกฟอร์มาแซนก็จะมี ความเข้มข้นมากขึ้น และทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งวิธีนี้สามารถนำไปใช้วัดในแง่การเพิ่ม จำนวนของเซลล์และการตรวจสอบวัดความเป็นพิษกับสารที่ใช้ทดลอง

วิธีวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay อาศัยหลัก การที่เซลล์เมื่อมีการแบ่งตัวหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ จะมีการจำลองสร้างสายดีเอ็นเอ โดย อาศัยสารนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ adenosine, guanine, cytosine และ thymidine ดังนั้นการใส่สารนิว คลีโอไทด์ที่ถูกทำให้อยู่ในสภาพของสารกัมมันตภาพรังสีในอาหารเลี้ยงเซลล์ เช่น [^3H] thymidine ย่อมทำให้ [^3H] thymidine มีโอกาสเข้าไปเป็นส่วนประกอบของสายดีเอ็นเอ ทำให้สามารถตรวจวัด การเข้าร่วมของ [^3H] thymidine ในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่²⁶ ดังนั้นถ้าสารที่ทดสอบมีผลต่อการ เพิ่ม/ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ก็จะมีค่าสารกัมมภาพรังสีจากเซลล์ที่ทดสอบ สูง/ต่ำกว่าเซลล์กลุ่ม ควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ หรืออาจกล่าวได้ว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมาก ก็จะพบว่ามีค่าสาร กัมมันตภาพรังสีสูงกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวช้า ซึ่งวิธีนี้จะมีความไว (sensitivity) สูง

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด และเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจาก ไชกระดูกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับการตีพิมพ์และยอมรับจากนักวิจัยว่า เป็นเซลล์ต้นแบบใน การศึกษาเซลล์สร้างกระดูก เนื่องจากแหล่งเนื้อเยื่อที่มาของเซลล์ ความสามารถของเซลล์ในการ แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (osteoblast marker gene) และความสามารถใน การตกตะกอนสารอนินทรีย์ (calcification) เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ระดับความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดิน ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ และ เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไชกระดูกของหนู อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ($p < 0.01$)

จากการศึกษาด้วยวิธี [^3H] thymidine incorporation assay พบว่าสารซิมวาสเตดินที่ระดับ ความเข้มข้น 500 และ 1000 นาโนโมลาร์ มีผลยับยั้งการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้าง

กระดูก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99.0 และ 99.9 ตามลำดับ ส่วนการลดลงของจำนวนเซลล์สร้างกระดูกเมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสเตดินที่ระดับความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ เมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที คณะผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากความเป็นพิษของสารซิมวาสเตดิน ซึ่งผลของสารซิมวาสเตดินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกนี้สอดคล้องกับรายงานว่าสารกลุ่มสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดและเซลล์ mesangial ของไต ผ่านทาง โปรตีน Rho GTPase และ p21²⁷⁻²⁸

ความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูก สามารถถูกยับยั้งด้วยสารเมวาโลเนต ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ (by product) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใส่สารเมวาโลเนตที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ จำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การใส่สารเมวาโลเนตเพียงอย่างเดียว ไม่มีคุณสมบัติในการเพิ่มหรือลดจำนวนเซลล์สร้างกระดูก แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินบางส่วนผ่านทางกลไกการสร้างโคเลสเตอรอล หรือสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือดัดแปลงพัฒนา (intermediate substance) ในระหว่างการสร้างโคเลสเตอรอล เช่น GGPP และ FPP ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

c-myc และ c-fos เป็นนิวเคลียสโปรตีน (transcription factor) ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์²⁹⁻³¹ โดยในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน c-myc สามารถทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักตัว (quiescent) เข้าสู่ระยะการแบ่งตัว และการสร้าง c-myc อย่างสม่ำเสมอ (constitutive expression) สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวถึงจะอยู่ในภาวะปราศจาก growth factor³² โดย c-myc จะจับคู่กับนิวเคลียสโปรตีน Max เป็นกลุ่มโปรตีนต่างกัน (heterodimer) และไปจับกับ E-box DNA element ของโปรโมเตอร์ (promoter)

ของเงินที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น ornithine decarboxylase และ Cdc25A³³⁻³⁴ ส่วนโปรตีน c-fos จะมีการสร้างเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย growth factors เช่น transforming growth factor- β วิตามินดี ซึ่งจัดเป็นสารกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก โดยระหว่างที่เซลล์สร้างกระดูกมีการแบ่งตัว³⁵ จะพบว่าระดับโปรตีน c-fos จะสูงกว่าปกติ โดย c-fos จะจับคู่กับนิวเคลียสโปรตีน c-myc เป็นกลุ่มโปรตีน AP-1 ไปกระตุ้นการสร้าง cyclin D1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้การแบ่งเซลล์เคลื่อนจากระยะ G1 ไปสู่ระยะ S³¹ แต่เมื่อเซลล์สร้างกระดูกเข้าสู่ระยะสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ และระยะการตกตะกอนสารอนินทรีย์ ระดับ c-fos จะลดลง³⁶

จากข้อมูลทีกล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาผลของสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 250 และ 500 นาโนโมลาร์ ต่อระดับอาร์เอ็นเอรหัสของเงิน c-fos และ c-myc ในเซลล์สร้างกระดูก โดยตัดความเข้มข้นที่ 1000 และ 2000 นาโนโมลาร์ออก เพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเป็นพิษของสาร ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot แสดงให้เห็นว่า สารซิมวาสเตตินมีผลในการลดระดับอาร์เอ็นเอรหัสของเงิน c-fos ร้อยละ 17, 25, 18 และ 32 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารซิมวาสเตตินมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอรหัสของเงิน c-myc ร้อยละ 32, 17, 20 และ 22 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ได้มีการรายงานผลของสารซิมวาสเตตินในการเร่งเซลล์สร้างกระดูกในการเข้าสู่ระยะการสร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีนบีเอ็มพี-2 (BMP : bone morphogenetic protein)^{4,37} ซึ่งเป็นสาร growth factor ที่แยกได้จากกระดูก และสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกเมื่อฝังได้เนื้อเยื่อเส้นใยของหนู กระตุ้นการสร้าง alkaline phosphatase enzyme, vascular endothelial growth factor และ osteocalcin³⁸⁻³⁹ เมื่อรวมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ซึ่งแสดงว่าสารซิมวาสเตตินยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับนิวเคลียสโปร

ที่ *c-fos* และ *c-myc* ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่เร่งเซลล์สร้างกระดูกให้เข้าสู่ระยะการสร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์และการตกตะกอนสารอินทรีย์

จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้ทั้งหมด อาจสรุปได้ว่าสารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ และกลไกของสารซิมวาสเตตินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก อาจเกิดโดยผ่านทางสารเมวาโลเนตซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างโคเลสเตอรอล และ/หรือการยับยั้งการสร้างโปรตีน *c-myc* และ *c-fos* แต่อย่างไรก็ดีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อวัดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและโปรตีนของ *c-myc* และ *c-fos* ในเซลล์สร้างกระดูกที่ทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินร่วมกับสารเมวาโลเนตตลอดจนผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับโปรตีน Ras และ Rho อาจช่วยให้เราเข้าใจกลไกของสารซิมวาสเตตินในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *J Clin Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:103-16.
2. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993;14:424-42.
3. Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. *Osteoporos Int.* 2003 Jun;14(4):273-82.
4. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999 ;286:1946-9.
5. Rejnmark L, Buus NH, Vestergaard P, Andreasen F, Larsen ML, Mosekilde L. Statins decrease bone turnover in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:581-9.
6. Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. *Calcif Tissue Int.* 2001;69:299-304.

7. Chan MH, Mak TW, Chiu RW, Chow CC, Chan IH, Lam CW. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4556-9.
8. Herrington DM, Potvin Klein K. Statins, hormones, and women: benefits and drawbacks for atherosclerosis and osteoporosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2001;3:35-42.
9. LaCroix AZ, Cauley JA, Pettinger M, Hsia J, Bauer DC, McGowan J, Chen Z, Lewis CE, McNeeley SG, Passaro MD, Jackson RD. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med.* 2003;139:97-104.
10. Sirola J, Sirola J, Honkanen R, Kroger H, Jurvelin JS, Maenpaa P, Saarikoski S. Relation of statin use and bone loss: a prospective population-based cohort study in early postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2002;13:537-41.
11. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Gungor T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res.* 2003;18:88-96.
12. Wada Y, Nakamura Y, Koshiyama H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Arch Intern Med.* 2000;160:2865.
13. Nuckolls GH, Kane A, Shum L, Slavkin HC. Lovastatin promotes cartilage growth but inhibits endochondral ossification of the cranial base in organ culture. *J Bone Miner Res.* 2000; 15:S1; S426.

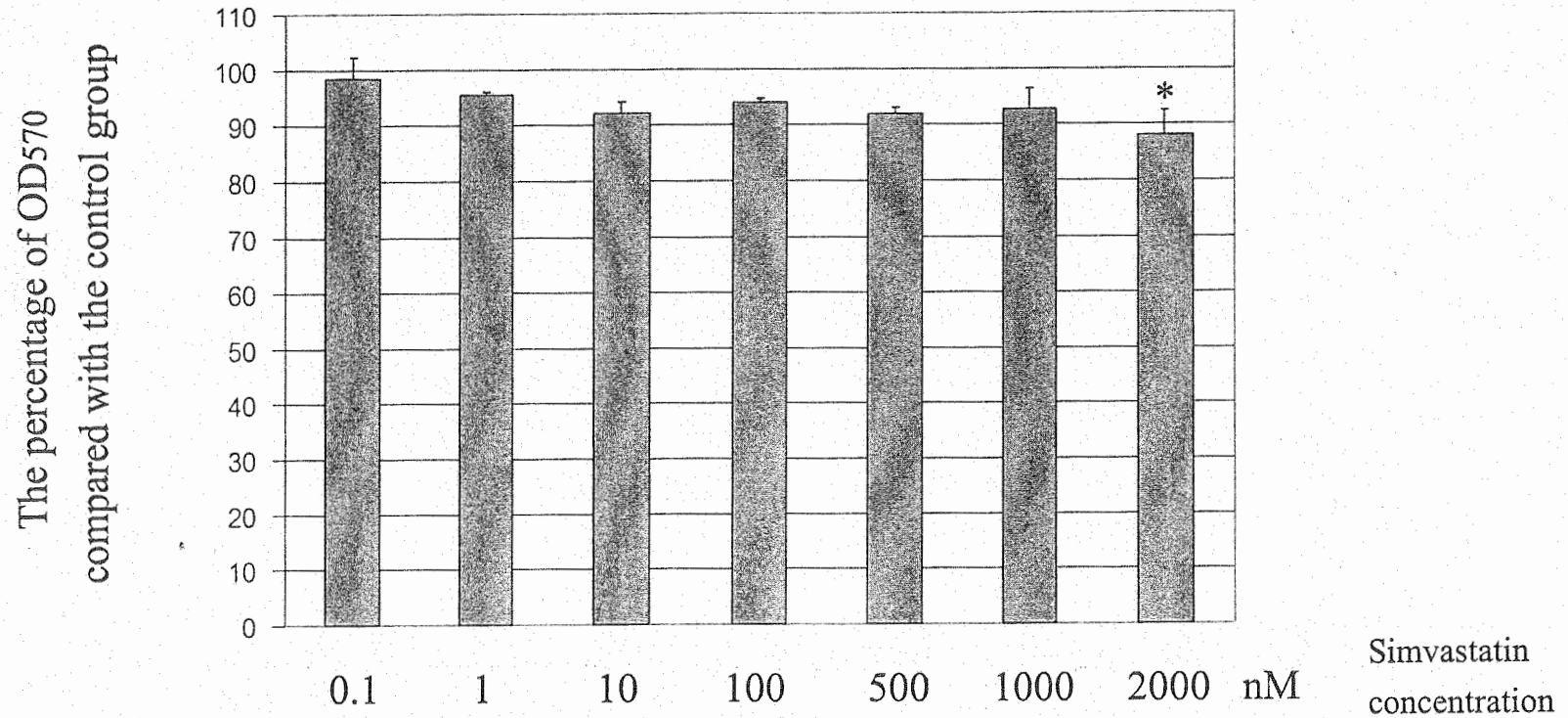
14. Uchida M, Shima M., Shimoaka T., Fujieda A., Obara K., et al. Regulation of Matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2000, 185: 207-214.
15. Wong G.L. and Cohn D.V. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surface. 1975, *PNAS*. 72: 3167-71.
16. Aronow M.A., Gerstenfeld L.C., Owen T.A., Tassinari M.S., Stein G.S. and Lian J.B. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. 1990, *Journal of Cellular Physiology* 143: 213-21.
17. Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, Cocchini B, Zini N, Fini M, Grassi F, Piacentini A, Facchini A. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure. *Connect Tissue Res*. 2001;42:49-58.
18. Freshney RI. *Culture of animal cells : A manual of basic technique*. 3rd edition. New York: Wiley-Liss, Inc.; 1994.
19. Abraham L.A. and Mackie EJ. Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999, 14:1320-29.

20. Dell'Era P., Mohammadi M., Presta M. Different tyrosine autophosphorylation requirement in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Molecular Biology of the Cell*. 1999, 10: 23-33.
21. Mohi M.G., Arai K., Watanabe S. Activation and functional analysis of Janus kinase2 in BAF3 cells using the coumermycin/gyrase B system. *Molecular Biology of the Cell*. 1998, 9: 3299-308.
22. Fenton JW 2nd, Jeske WP, Catalfamo JL, Brezniak DV, Moon DG, Shen GX. Statin drugs and dietary isoprenoids downregulate protein prenylation in signal transduction and are antithrombotic and prothrombolytic agents. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67:85-91.
23. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-30.
24. Scita, Giorgio, Tenca, Pierluigi, Frittoli, Emanuela, Tocchetti, Arianna, Innocenti, Metello, Giardina, Giuseppina, Di Fiore, Pier Paolo. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J*. 2000;19: 2393-2398.
25. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988;48:589-601.
26. Fakan S. High-resolution autoradiography as a tool for the localization of nucleic acid synthesis and distribution in the mammalian cell nucleus. *J Microsc*. 1976;106:159-71.

27. Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickinson T, Thompson MM, London NJ. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J Vasc Surg.* 2002;36:150-7.
28. Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS. Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8301-5.
29. Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol.* 1998;8:202-6.
30. Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L. Making decisions through Myc. *FEBS Lett.* 2001;490:153-62.
31. Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001;20:2401-12.
32. Henriksson M, Luscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* 1996;68:109-82.
33. Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:7804-8.
34. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature.* 1996 ;382:511-7.
35. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999;13:3037-51.

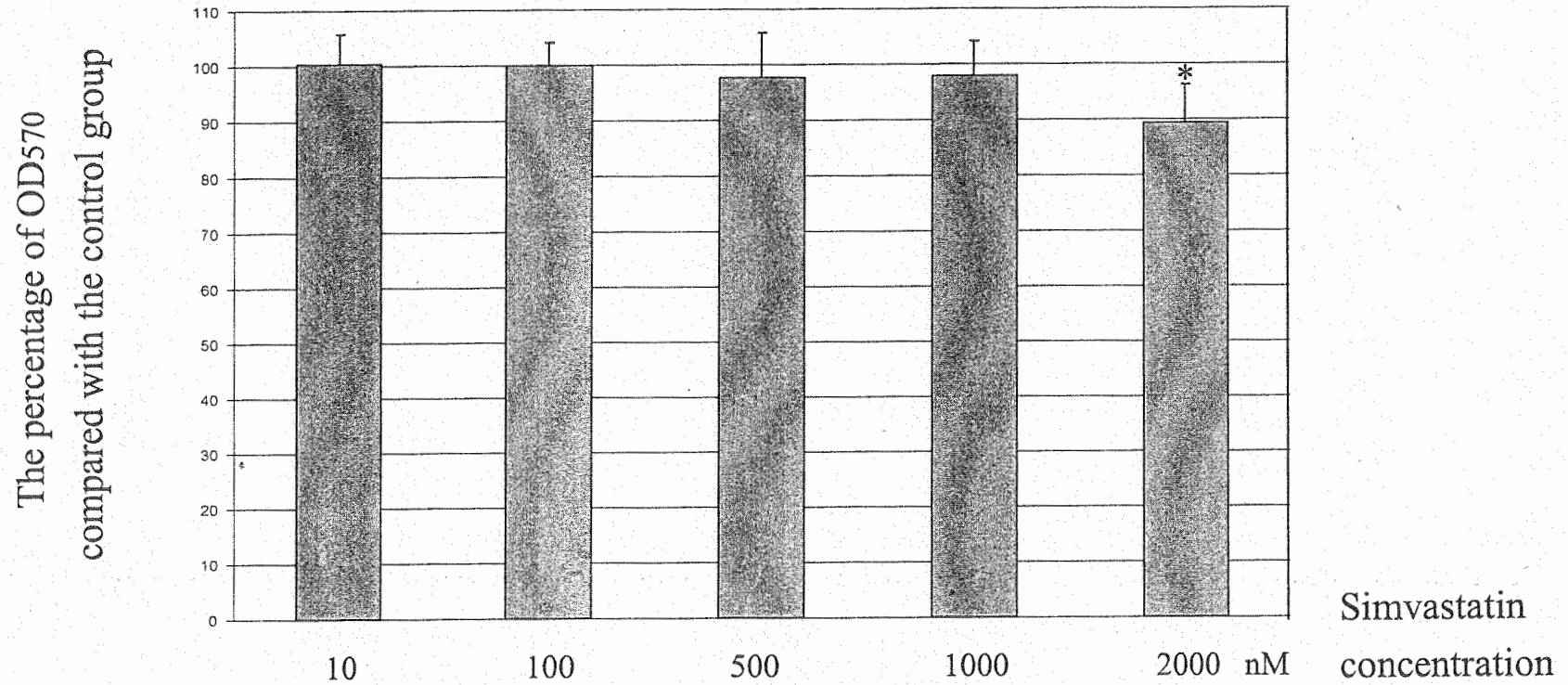
36. McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology*. 1996;137:4398-408.
37. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271:688-92.
38. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003 Feb;144(2):681-92.
39. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 ;280:874-7.

Effect of simvastatin on the toxicity of rat calvaria cells via MTT assay



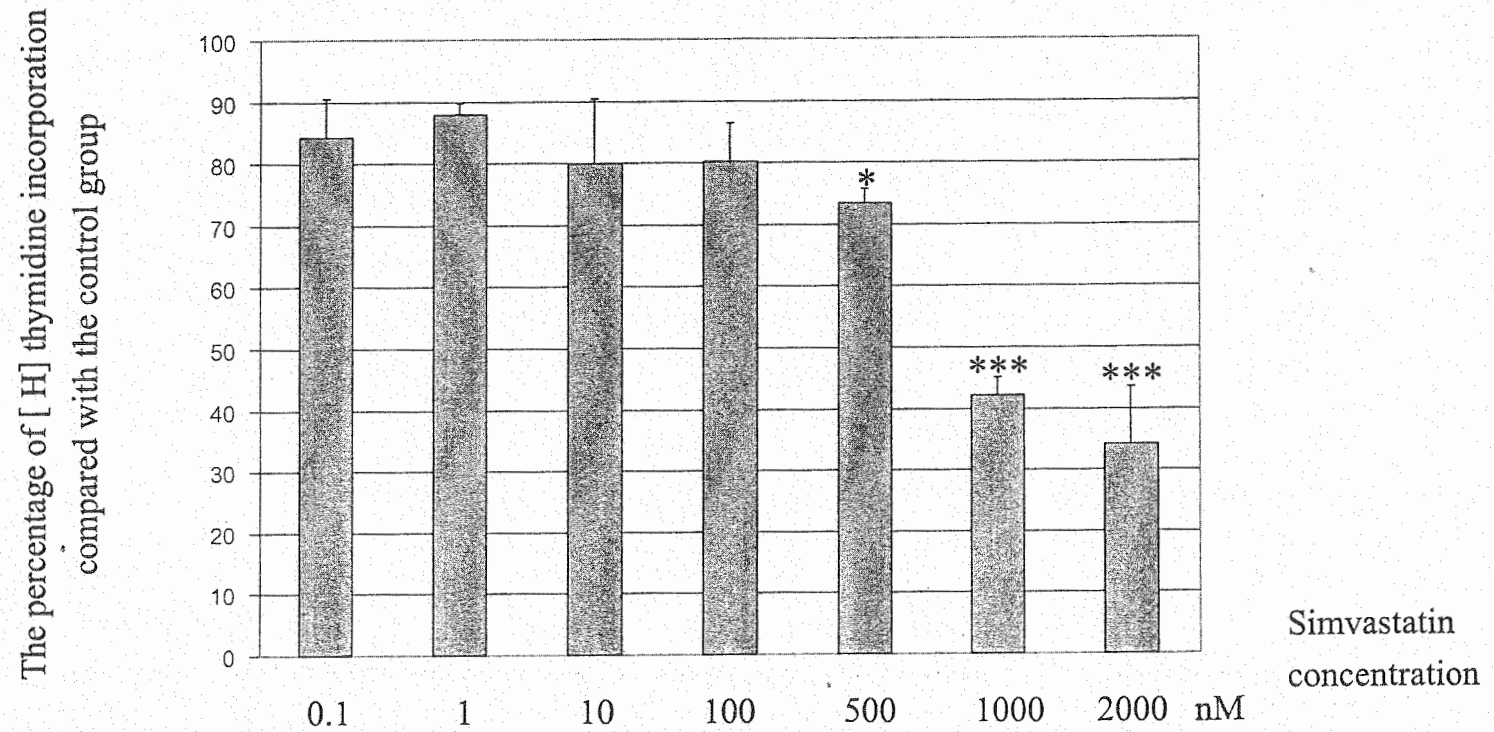
รูปที่ 1 ผลของสารซิมวาสแตตินต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $\alpha = 0.01$ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=18)

Effect of simvastatin on the toxicity of rat bone marrow stromal cells
via MTT assay



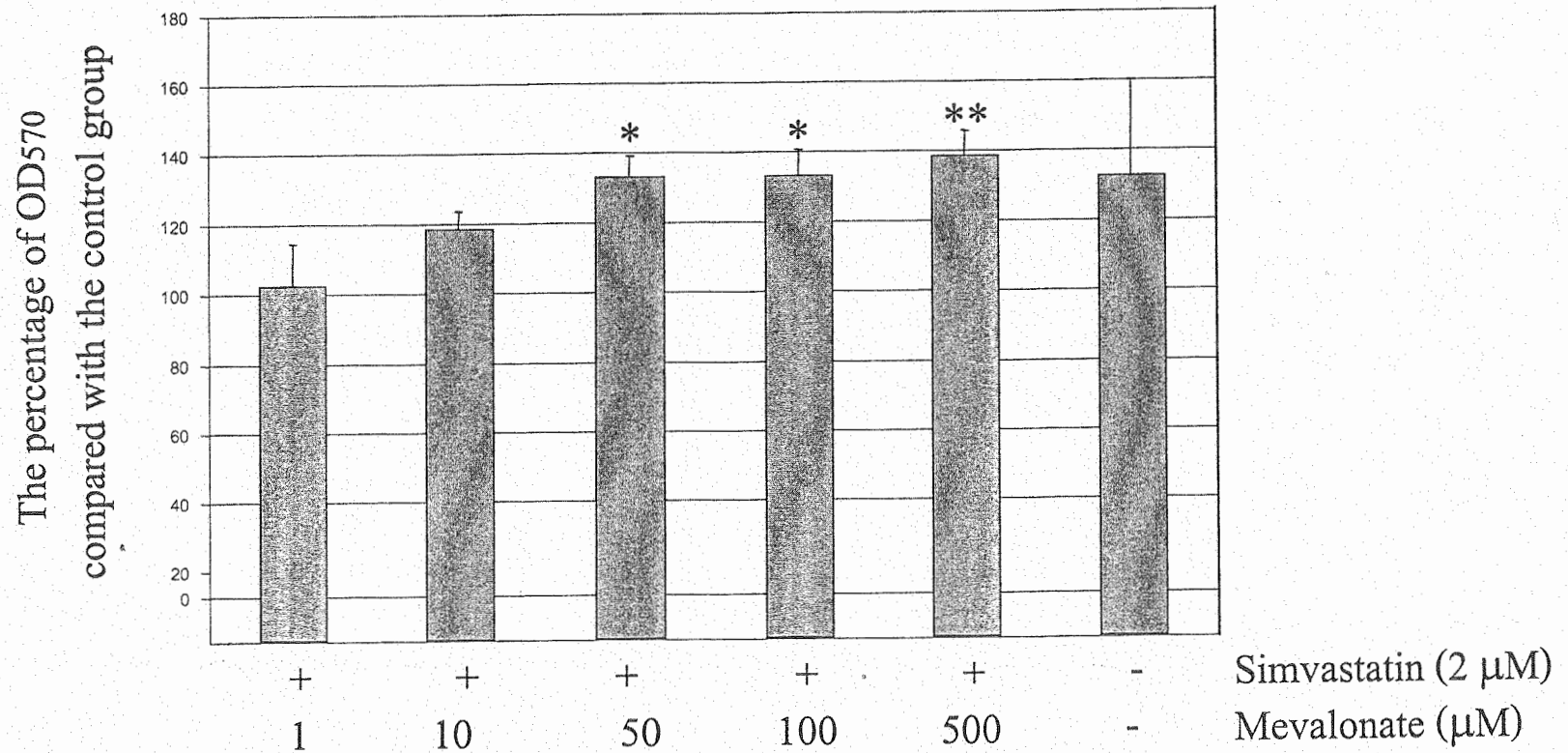
รูปที่ 2 ผลของสารซิมวาสแตตินต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีทีที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $\alpha = 0.01$ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=12)

Effect of simvastatin on the proliferation of rat calvaria cells via the [³H] thymidine incorporation assay



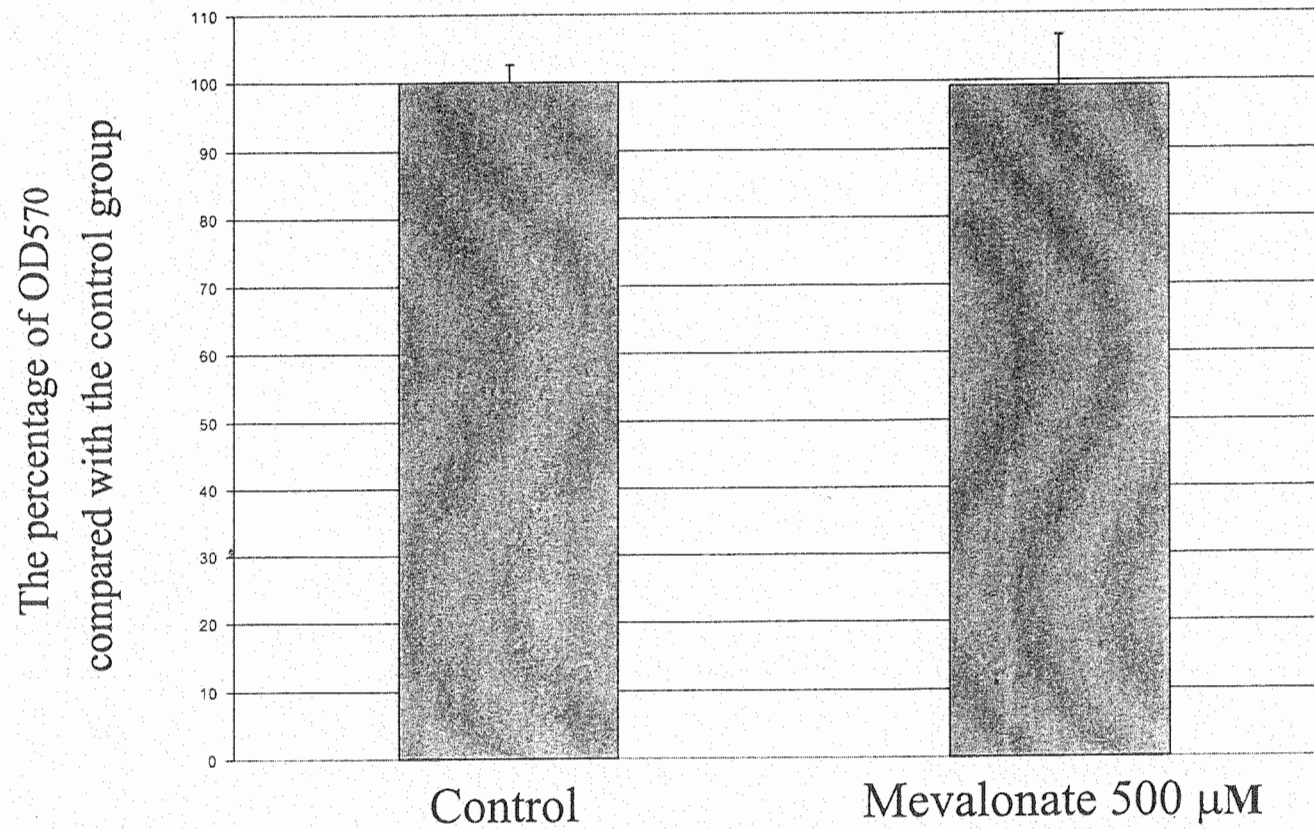
รูปที่ 3. ผลของสารซิมวาสแตตินต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี [³H] thymidine incorporation assay เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * และ *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $\alpha = 0.01$ และ 0.001 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=18)

The toxicity of simvastatin in primary bone marrow stromal cells
was rebound by mevalonate



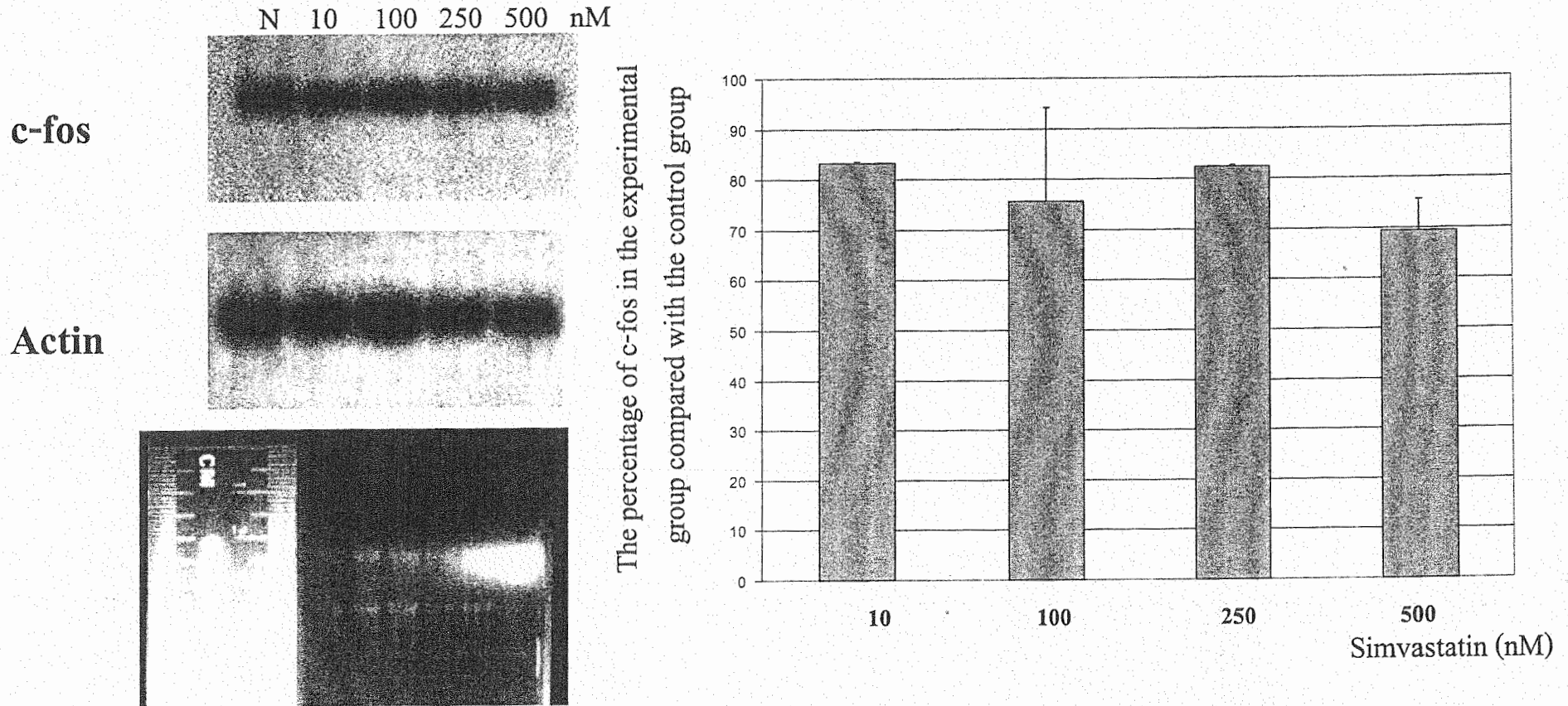
รูปที่ 4 ผลของสารซิมวาสเตตินและสารเมวาโลเนตต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตติน 2 ไมโครโมลาร์ และสารเมวาโลเนตตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง * และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินอย่างเดียว $\alpha = 0.01$ และ 0.005 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=12$)

Mevalonate does not affect the primary bone marrow stromal cells proliferation



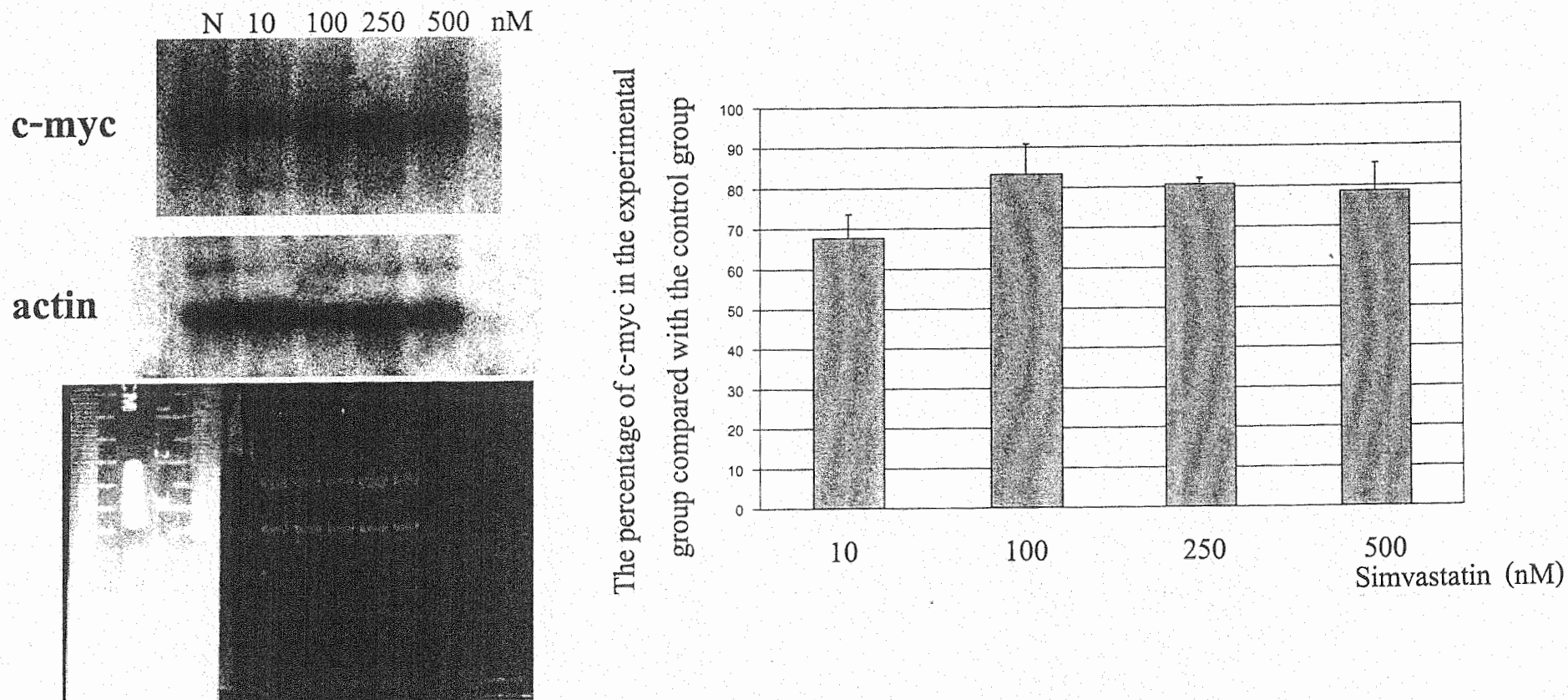
รูปที่ 5 ผลของสารเมวาโลเนตต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารเมวาโลเนตที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

Effect of simvastatin on the steady state of c-fos mRNA of primary calvaria



รูปที่ 6. ผลของสารซิมวาสแตตินต่อระดับอาร์เอ็นเอของยีน c-fos ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละของระดับอาร์เอ็นเอของยีน c-fos ในกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Effect of simvastatin on the steady state of c-myc mRNA of primary calvaria



รูปที่ 7. ผลของสารซิมวาสแตตินต่อระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส จีน c-myc ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน c-myc ในกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. กระทบได้ส่งบทคัดย่อ เพื่อนำเสนอผลงานที่ได้จากการศึกษา ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสาขาทันตแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่ เดือนตุลาคม 2546
2. กระทบได้นำข้อมูลที่ได้ มาเพิ่มเติมในการสอนวิชา Advances Oral Biology ซึ่งเป็นวิชาการระดับปริญญาโท-เอก ในหัวข้อเรื่อง " Statin : Present and Future application