



ผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 จากมนุษย์

Effect of Human Antimicrobial Peptide LL-37 on Osteoclastogenesis

ชยารพ สุพรรณชาติ

สรัญญา ธารนพงษ์

ปรีณา โขติจำลอง

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

รายงานฉบับสมบูรณ์

สิงหาคม 2555

โครงการวิจัยได้รับทุนวิจัย

ประจำปีงบประมาณพุทธศักราช 2553



ผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 จากมนุษย์

Effect of Human Antimicrobial Peptide LL-37 on Osteoclastogenesis



ชยารพ สุพรรณชาติ

สรัญญา ธารนพงษ์

ปรีณา โชติจำลอง

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

รายงานฉบับสมบูรณ์

สิงหาคม 2555

โครงการวิจัยได้รับทุนวิจัย

ประจำปีงบประมาณพุทธศักราช 2553

การสลายกระดูกเป็นสาเหตุหนึ่งของการสูญเสียกระดูกเบาฟั่นในสภาวะปริทันต์อักเสบ แอลแอล-37 เป็นเพปไทด์ด้านจุลชีพที่อยู่ในตระกูลของแคเทอรีไลซินที่ปรากฏในมนุษย์ ภาวะขาดแคลนเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 เกิดขึ้นในผู้ที่มีโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 น่าจะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการทำลายกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อดูหน้าที่ของเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ในระบบภูมิคุ้มกันของกระดูกโดยการห้ามการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก โดยใช้วิธีสกัดเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกจากเลือดมนุษย์มาศึกษาเลี้ยงในสภาวะที่มีการกระตุ้นให้มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกพร้อมกับเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าปริมาณความเข้มข้นของเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ส่งผลขัดขวางการสร้างเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียสและลดการแสดงออกของ TRAcP ตลอดจนลดอัตราการย่อยเนื้อฟันข้าง ($P < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ส่งผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการเร่งอัตราการแบ่งตัวของเซลล์โดยการแสดงออกของ PCNA นอกจากนี้พบว่าเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ไปควบคุมการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกซึ่งได้แก่ TCIRG1, CLC-7, และ NFAT2 โดยมีเกิดจากการแสดงออกของ NFAT2 ในนิวเคลียสของเซลล์

Uncoupled bone resorption leads to net alveolar bone loss in periodontitis. The deficiency of LL-37, the only human antimicrobial peptide in the cathelicidin family, in patients with aggressive periodontitis suggests that LL-37 may play a pivotal role in inhibition of alveolar bone destruction in periodontitis. We aimed to investigate a novel function of LL-37 in osteoimmunity by blocking osteoclastogenesis in vitro. Human osteoclast progenitor cells were isolated from a buffy coat of blood samples. The cells were cultured in the presence of varying concentrations of LL-37 during an in vitro induction of osteoclastogenesis. Non-toxic doses of LL-37 could block multinuclear formation of the progenitor cells and significantly diminish the number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells and the formation of resorption pits ($P<0.05$), whereas these concentrations induced cellular proliferation as demonstrated by increased expression of proliferating cell nuclear antigen. Expression of some osteoclast markers, including chloride-proton exchanger CLC-7, T-cell, immune regulator 1, ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3, and nuclear factor of activated T-cells 2 (NFAT2) was down-regulated by LL-37 treatment, and nuclear translocation of NFAT2 was blocked by LL-37 treatment. Collectively, our findings demonstrate that the interference in nuclear translocation of NFAT2 by LL-37 inhibits the in vitro osteoclastogenesis.

คำนำ

กระดูกเป็นอวัยวะสำคัญของร่างกายที่ช่วยประคองอวัยวะอื่นๆให้ทำงานได้ตามปกติ การสูญเสียกระดูกทำให้เกิดโรคอื่นๆตามมามากมายที่ปรากฏในโรคปริทันต์อักเสบที่มีการสลายกระดูกเข้าฟันและส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียฟันตามมา ในสภาวะที่มีการกระตุ้นจากการอักเสบโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการติดเชื้อร่วมด้วยมักจะทำให้กระดูกมีการสลายตัวมากกว่าปกติ แต่อย่างไรก็ตาม ณ ปัจจุบัน ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงกลไกของการติดเชื้อและการอักเสบในเนื้อเยื่ออันนำไปสู่การสลายกระดูก จึงอาจเป็นไปได้ว่าเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ โดยเฉพาะแอลแอล-37 ที่สร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อและการอักเสบ การศึกษานี้เป็นการวิจัยฤทธิ์ของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อกระบวนการสลายกระดูก ทั้งนี้เพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคที่มีการทำลายกระดูกในผู้ป่วยทั่วไปและผู้ที่มีโรคปริทันต์อักเสบ การวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้เป็นการรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์เพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการสลายกระดูกที่ทำในห้องปฏิบัติการซึ่งใช้ระยะเวลาศึกษาที่แผนกวิจัยชีววิทยาช่องปากและศูนย์วิจัยทางทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณแหล่งทุนที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยโดยทุนวิจัยของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2553 มา ณ ที่นี้

ชยารพ สุพรรณชาติ

(หัวหน้าคณะผู้วิจัย)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
คำนำ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	
— ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
— ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
— วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
วิธีการทดลอง	
— สารเคมี	4
— การคัดแยกเซลล์โมโนไซต์หรือเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก	4
— การทดสอบความเป็นพิษของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อเซลล์ต้นกำเนิด ของเซลล์สลายกระดูก	5
— การศึกษาผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อกระบวนการแปรสภาพ เป็นเซลล์สลายกระดูก	6
— การศึกษาผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการสลายกระดูก	7
— การศึกษาการแสดงออกของสารพันธุกรรมระดับ Messenger Ribonucleic Acid	8
— การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี Immunoblot	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
— การศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์	10
ผลการทดลอง	11
อภิปรายผลการทดลอง	19
สรุปผลการทดลอง	22
เอกสารอ้างอิง	23
งบประมาณ	27
กิตติกรรมประกาศ	28
ประวัติผู้วิจัย	29

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อความมีชีวิตและการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก	11
รูปที่ 2 ระดับความเข้มข้นของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37ที่เป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก	12
รูปที่ 3 การศึกษาผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก	13
รูปที่ 4 การศึกษาผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก	14
รูปที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก	15
รูปที่ 6 ผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการสลายเนื้อฟัน	16
รูปที่ 7 การศึกษาผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแสดงออกของ NFAT2	17
รูปที่ 8 การศึกษาผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแสดงออกของ NFAT2 ในระดับ RNA	18