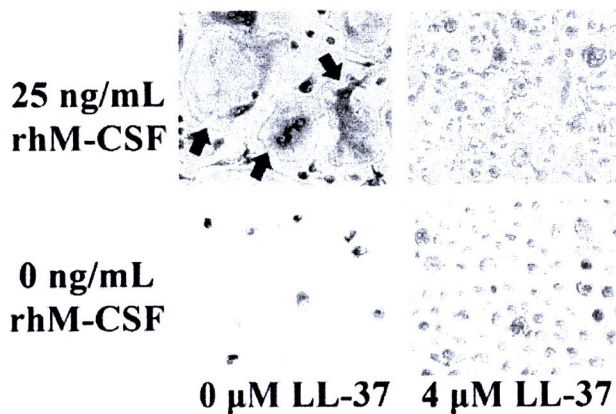


ผลการทดลอง

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 รักษาความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก

เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมประกอบด้วยสารกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก RANKL ในสภาวะที่มีและปราศจาก M-CSF พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มี M-CSF สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกภายในระยะเวลา 7 วัน แต่ในสภาวะที่ปราศจาก M-CSF เซลล์มีจำนวนลดลงมากหรือแทบไม่มีเลย เมื่อเติมเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ปริมาณ 4 ไมโครโมลาร์ลงในทั้งสองสภาวะ ทำให้เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจาก M-CSF ยังคงมีชีวิตอยู่ถึงแม้จะเลี้ยงไปถึงวันที่ 7 อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มี M-CSF กลับพบว่าเซลล์ที่สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกน้อยลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่ปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ดังรูปที่ 1

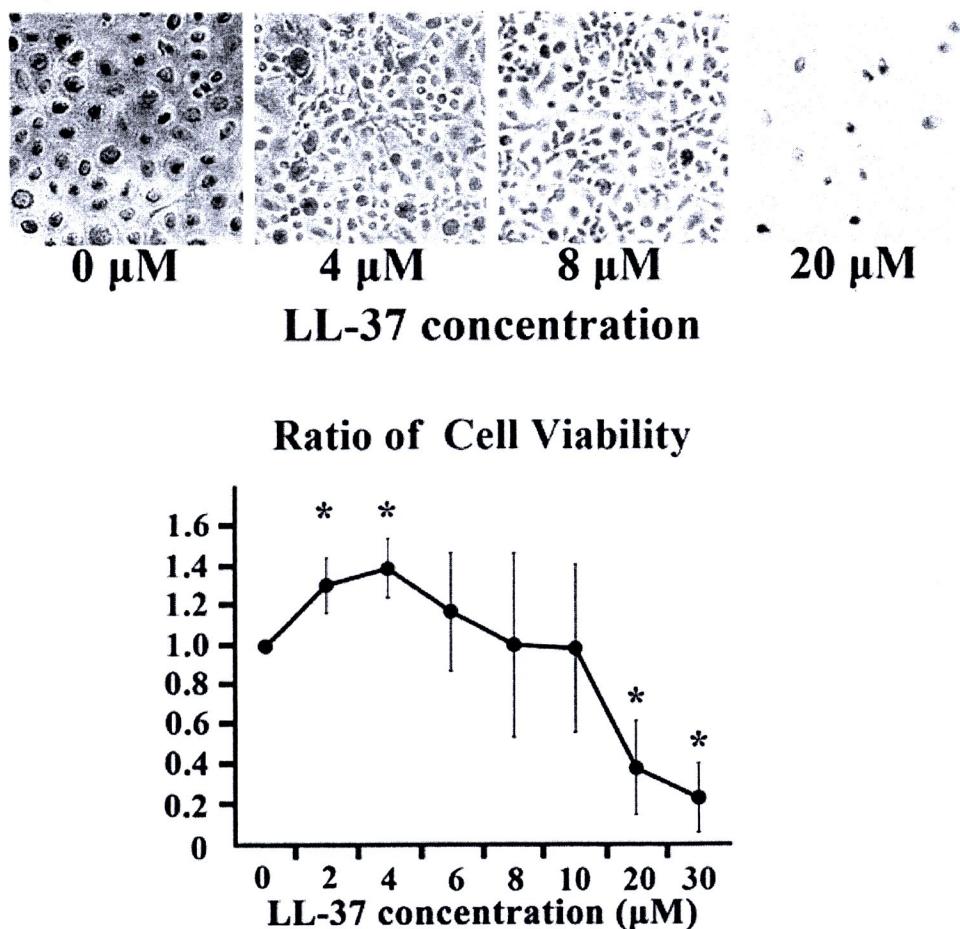


รูปที่ 1 ผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อความมีชีวิตและการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุพลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นได้รับการตรึงสภาพและย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP (สีม่วงแดง) ที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก (ลูกศรชี้)

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก

เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่มีความเข้มข้นหลายระดับจะถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย M-CSF เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นพบว่าเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอล

แอล-37 ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 20 ไมโครโมลาร์จะทำให้เซลล์ตาย ในขณะที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครโมลาร์ไม่ทำให้เซลล์ตาย อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์ได้รับเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ระดับความเข้มข้นน้อย (ระหว่าง 2-6 ไมโครโมลาร์) ทำให้มีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่มากกว่าในกลุ่มที่ไม่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 อยู่เลย ดังรูปที่ 2 นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาค้นคว้าเพื่อระดับการแบ่งตัวของเซลล์โดยใช้การแสดงออกของโปรตีน PCNA พบว่า เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2-10 ไมโครโมลาร์มีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวมากกว่าในสภาวะที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2 การศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 จนถึง 30 ไมโครโมลาร์ เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุพลาสติกเป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นได้รับการตรึงสภาพและย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของแอนติบอดี TRAcP (แถวบน) นอกจากนี้ทำการศึกษางานของ mitochondrial dehydrogenase โดยทดสอบจาก MTT (แถวล่าง)



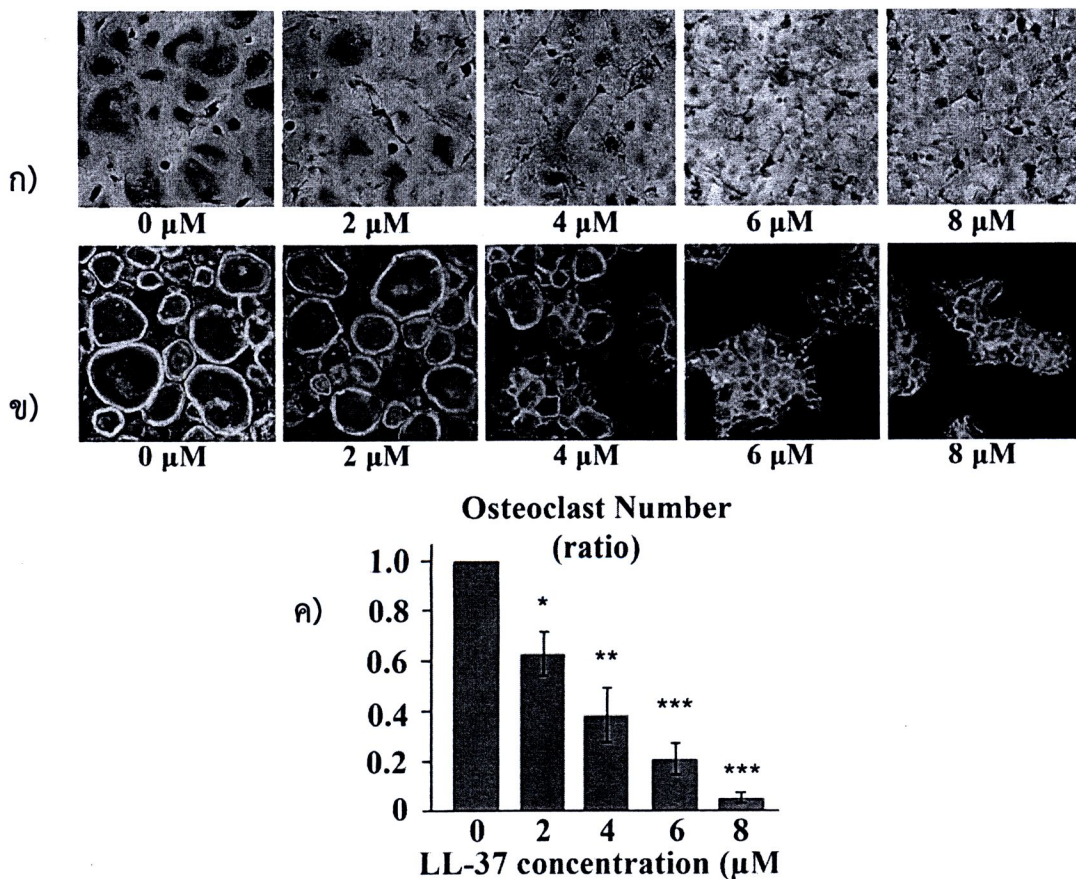
D 37 concentration (μM)
 2 4 6 8 10 20 30
PCNA —————
GAPDH —————

รูปที่ 3 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก โดยการดูระดับการแสดงออกของ PCNA จากการนำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกันไปแยกโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis และ Immunoblot

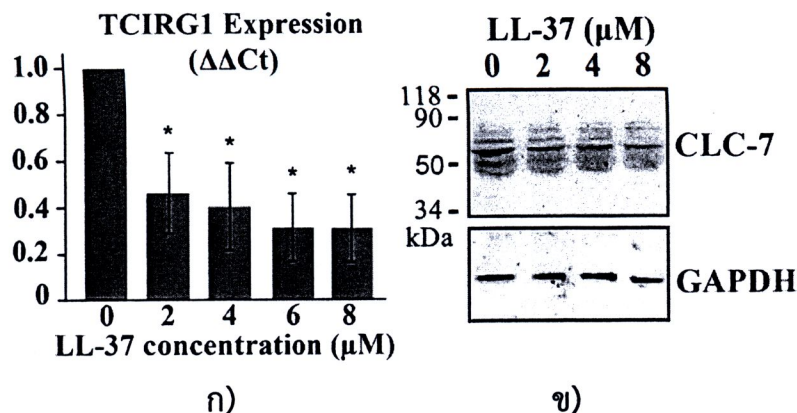
เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

หลังจากทราบระดับความเป็นพิษของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก ทำการศึกษาต่อโดยเลือกใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ในระดับที่ปลอดภัยมาทดสอบดูผลต่อการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง 0, 2, 4, 6, และ 8 ไมโครโมลาร์ถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ระหว่างการกระตุ้นให้เป็นเซลล์สลายกระดูกเป็นระยะเวลา 7 หรือ 10 วัน พบว่าจำนวนเซลล์หลายนิวเคลียสที่ย้อมติดสีที่บ่งถึงการแสดงออกของ TRAcP และแสดงลักษณะ F-actin เป็นวงรอบที่ขอบเซลล์ ที่ทำการนับด้วยการสังเกตจากตาเปล่ามีจำนวนลดลงตามลำดับเมื่อมีปริมาณเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาดูระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูกในระดับ RNA และโปรตีน พบว่าการแสดงออกของยีน TCIRG1 และโปรตีน CLC-7 ลดระดับลงเมื่อมีระดับเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 เพิ่มขึ้น (รูปที่ 5) จากการทดสอบดังกล่าวจึงยืนยันได้ว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 มีฤทธิ์ยับยั้งการแปรสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สลายกระดูก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 26 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250484
เลขเรียกหนังสือ



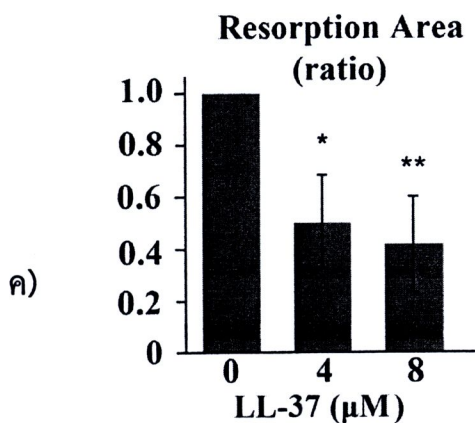
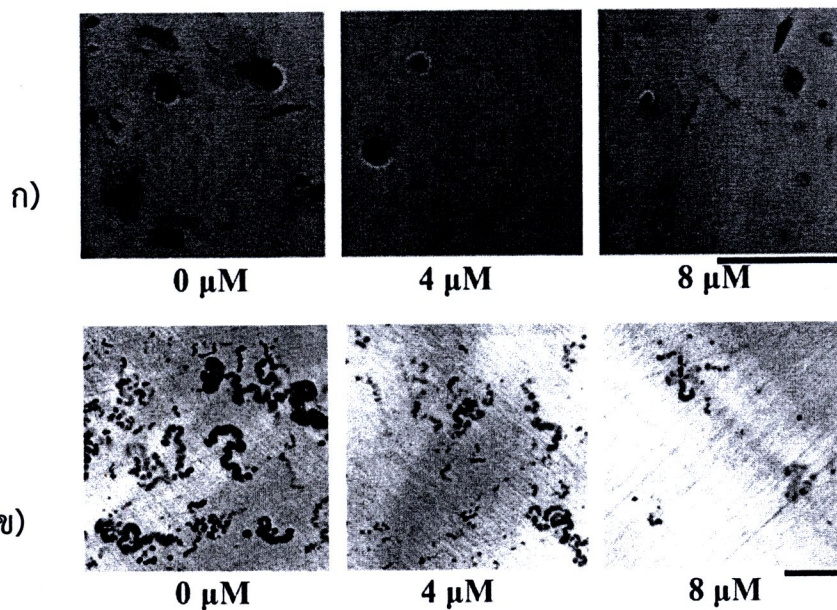
รูปที่ 4 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก โดยการสังเกตรูปร่างเซลล์ที่แสดงลักษณะของเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงและกระตุ้นบนผิววัสดุสองชนิด ก) เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 บนผิวพลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วถูกตรึงสภาพก่อนนำไปย้อมดูการแสดงออกของ TRAcP (ติดสีม่วงแดง) และ PCNA ที่นิวเคลียส (ติดสีน้ำตาล) ข) เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 บนผิวแก้วเป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วถูกตรึงสภาพก่อนนำไปย้อมดูการแสดงออกของ TRAcP (แสดงออกแสงสีแดง) และ F-actin (แสดงออกแสงสีเขียว) รวมทั้ง DAPI (แสดงออกแสงสีน้ำเงิน) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ และแผ่นกรองแสงช่วงความถี่ต่างๆ และ ค) แผนภูมิรูปแท่งแสดงสัดส่วนจำนวนของเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มีความเข้มข้นเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ พร้อมบาร์แสดงระดับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ (* คือ $p < 0.05$, ** คือ $p < 0.01$, *** คือ $p < 0.005$)



รูปที่ 5 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก โดยดูระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก ก) แผนภูมิรูปแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีน TCIRG1 ในเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มีความเข้มข้นเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ พร้อมบาร์แสดงระดับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ (* คือ $p < 0.05$) ข) ภาพที่ถ่ายจากเครื่อง ChemiDoc XRS ที่แสดงการแสดงผลของ CLC-7 และ GAPDH ในเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มีความเข้มข้นเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ

เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ทำให้การสลายเนื้อฟันลดลงเป็นผลจากการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

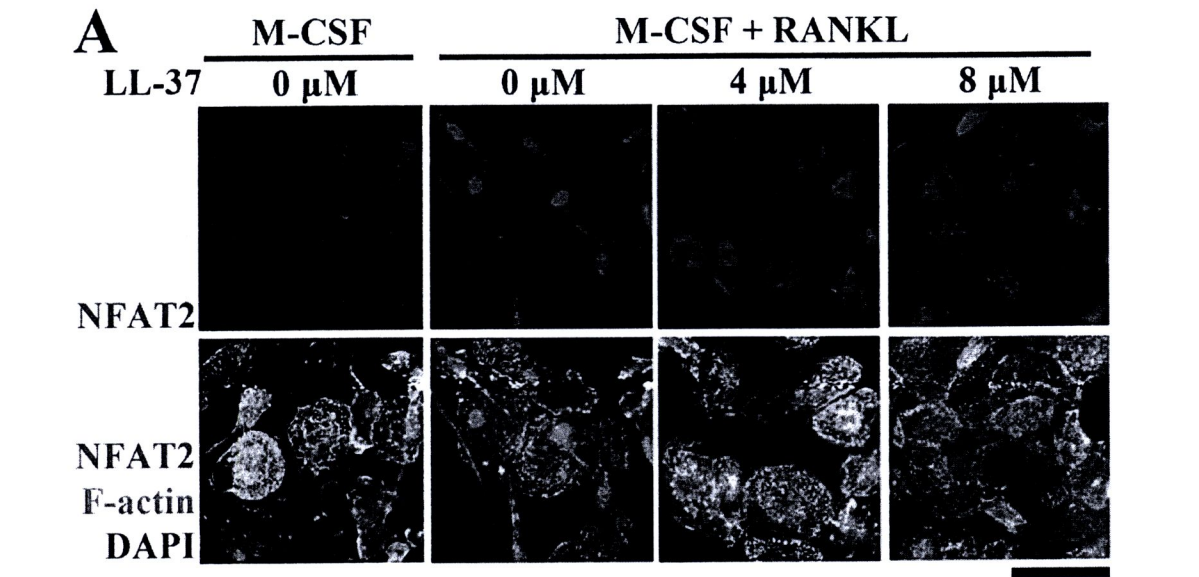
เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ถูกใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในระหว่างกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงบนผิวเนื้อฟันให้แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดนำแผ่นเนื้อฟันมาศึกษาเพื่อสังเกตการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกและวัดปริมาณการย่อยสลายเนื้อฟัน จากการสังเกตการแปรสภาพเซลล์สลายกระดูกบนเนื้อฟัน พบว่า ปริมาณเซลล์สลายกระดูกที่แสดงออก TRAcP และ F-actin มีจำนวนลดลงในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 (รูปที่ 6) จากนั้นนำมาวัดพื้นที่ที่มีการสลายเนื้อฟัน พบว่าพื้นที่เนื้อฟันที่ถูกย่อยสลายจากเซลล์สลายกระดูกซึ่งถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 มีเนื้อที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่เลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6)



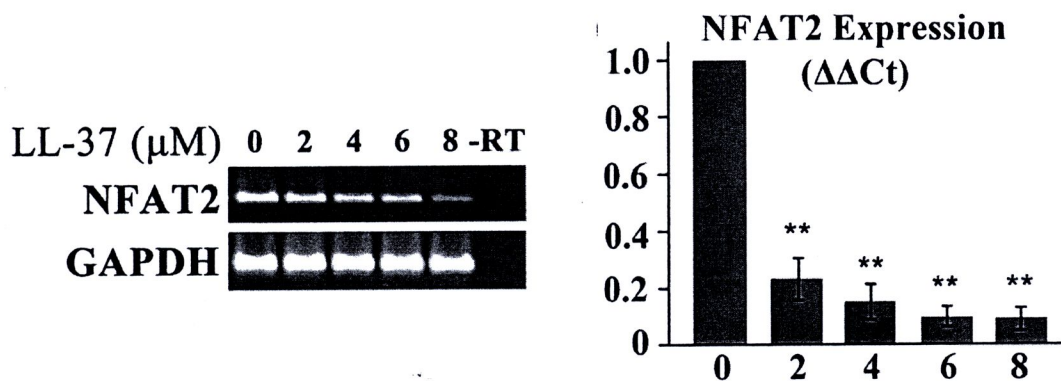
รูปที่ 6 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการสลายเนื้อฟัน ก) ภาพถ่ายโดยใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ร่วมกับแผ่นกรองแสงเพื่อดูเซลล์สลายกระดูกที่แสดงออก TRAcP และลักษณะ F-actin (สีเขียวสว่าง) ในสถานะที่มีความเข้มข้นของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ ข) ภาพถ่ายเนื้อฟันหลังจากกำจัดเซลล์ที่ค้างอยู่บนเนื้อฟันและถูกย้อมด้วยหมึกดำเพื่อสังเกตเนื้อฟันที่ถูกย่อยสลายในสถานะที่มีความเข้มข้นของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ (แท่งสีดำได้ภาพแสดงมาตราส่วนมีความยาว 200 ไมโครเมตร) ค) แผนภูมิรูปแท่งแสดงสัดส่วนพื้นที่การย่อยสลายเนื้อฟันจากเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงในสถานะที่มีความเข้มข้นเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ พร้อมบาร์แสดงระดับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ (* คือ $p < 0.05$, ** คือ $p < 0.01$)

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ยับยั้งการเคลื่อน NFAT2 เข้าสู่นิวเคลียสและยับยั้งการแสดงออกของ NFAT2

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ถูกใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นไปเป็นเซลล์สลายกระดูกเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาศึกษาการแสดงออกของ NFAT2 ซึ่งเป็น Transcription factor ของยีนจำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก พบว่าการแสดงออกของ NFAT2 ที่บริเวณไซโทพลาซึมของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ทั้งที่ความเข้มข้น 4 และ 8 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ในสภาวะที่ปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 จะมีการแสดงออกของ NFAT2 ที่นิวเคลียส (รูปที่ 7) นอกจากนี้การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน NFAT2 พบว่ามีการแสดงออกของ NFAT2 ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 การศึกษาผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแสดงออกของ NFAT2 ภาพถ่ายรูปเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์และแผ่นกรองแสง เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกถูกเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้น (ไม่มี RANKL) และในสภาวะที่มีการกระตุ้นให้มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก (มี RANKL) โดยมีระดับความเข้มข้นของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ต่างกัน แล้วทำการย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์เพื่อสังเกตการแสดงออกของ NFAT2 (สีแดง), F-actin (สีเขียว), และ DAPI (สีน้ำเงิน) (แท่งสีดำได้ภาพแสดงมาตราส่วนมีความยาว 50 ไมโครเมตร)



รูปที่ 8 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการแสดงออกของ NFAT2 ในระดับ RNA เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับความเข้มข้นต่างๆ จะถูกย่อยและสกัดแยก RNA ออกมาแล้วนำมาศึกษาระดับการแสดงออกของ NFAT2 ก) โดยวิธี Reverse transcriptase และ PCR แล้วนำไปสังเกตโดยวิธี Gel electrophoresis และ ข) ปริมาณการแสดงออกของ NFAT2 โดยวิธี Real-Time PCR ถูกแสดงในแผนภูมิรูปแท่งแสดงเป็นสัดส่วนการแสดงออกของ NFAT ในเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ระดับต่างๆ พร้อมบาร์แสดงระดับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ (** คือ $p < 0.01$)