

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47396



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การวิจัยสหสาขาเพื่อพัฒนาศักยภาพการวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก

**Multidisciplinary approach to cultivate and strengthen research in
calcium and bone metabolism**

ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย สัญญาเลขที่ RTA 5080008

ผู้วิจัย ศาสตราจารย์ ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา และเครือข่ายวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)



E47396

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การวิจัยสหสาขาเพื่อพัฒนาศักยภาพการวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก

**Multidisciplinary approach to cultivate and strengthen research in
calcium and bone metabolism**

ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย สัญญาเลขที่ RTA 5080008

ผู้วิจัย ศาสตราจารย์ ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ
สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา และเครือข่ายวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

พฤศจิกายน 2553



บทคัดย่อ

E 47396

การที่เราจะป้องกันหรือลดอุบัติการณ์ของโรคกระดูกพรุนและ Metabolic bone disease อื่น ๆ ในผู้สูงอายุ ซึ่งเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของประชากรสูงอายุนั้น เราจะต้องมีความเข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลต่อมวลกระดูก สาเหตุของพยาธิสรีรวิทยาตลอดจนปัจจัยที่จะช่วยชะลอการเสียมวลกระดูก เครือข่ายวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูกจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะใช้การวิจัยสหสาขาค้นคว้าให้ได้องค์ความรู้ที่เป็นองค์รวม ตั้งแต่กลไกการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ วัฏจักรการสร้าง-สลายกระดูก และปัจจัยควบคุมต่าง ๆ เพื่อให้ความรู้เหล่านี้สามารถใช้เป็นฐานต่อยอดสู่การพัฒนาวิธีป้องกัน การวินิจฉัยและการรักษาต่อไป

การวิจัยแบ่งเป็นสองส่วน คือ การวิจัยบทบาทของโพรแลคตินในฐานะฮอร์โมนควบคุมสมดุลแคลเซียมและกระดูก โดยเฉพาะในแม่ที่ตั้งท้องและให้นมลูก และการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมวัฏจักรการสร้าง-สลายกระดูก (bone turnover) โดยระบบประสาท

การวิจัยของเราในสัตว์ทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า โพรแลคตินเป็นฮอร์โมนที่ทำให้ร่างกายของแม่มีแคลเซียมในเลือดเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของลูกในท้อง และสำหรับการสังเคราะห์น้ำนมเลี้ยงลูกอ่อน โดยมีผลกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ทั้งการดูดซึมแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน ATP (transcellular active transport) และแบบขนส่งผ่านช่องระหว่างเซลล์แบบไม่ใช้ ATP โดยตรง (paracellular transport) การที่แม่หนูมีระดับของโพรแลคตินในเลือดสูงมากเป็นเวลานาน เช่น 75-100 นาโนกรัม/มิลลิลิตรในช่วงท้อง และ 200-300 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในช่วงหลังคลอดจะมีผลระยะยาวทำให้เซลล์ดูดซึมสร้างโปรตีนขนส่งแคลเซียมแบบผ่านเซลล์มากขึ้น เช่น ช่องขนส่งแคลเซียมชนิด TRPV6 TRPV5 โปรตีนจับแคลเซียม Calbindin D9k และลดการสร้างโปรตีนควบคุม tight junction เช่น occludin และ ZO-1 ทำให้แคลเซียมผ่านช่องระหว่างเซลล์ได้ดีขึ้น การเพิ่มการขนส่งแคลเซียมถึง 2 เท่าจากภาวะปกตินี้ เราเรียกว่า เป็นขั้น -1 (Step -1) การดูดซึมแคลเซียมขั้น -1 นี้จะถูกกระตุ้นให้สูงมากขึ้นอีกเป็นขั้น -2 (Step-2) เมื่อระดับของโพรแลคตินในเลือดพุ่งขึ้นไปถึง 600-800 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เช่น 15-90 นาทีหลังลูกดูดนม ขั้น -2 นี้ ใช้กลไกการตอบสนองระดับเซลล์อย่างเฉียบพลันและไม่ใช้การแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียม ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น ให้คำแนะนำแก่แม่ที่ให้นมลูกว่าควรดื่มนมหรือรับประทานแคลเซียมเสริมประมาณ 30 นาทีก่อนให้ลูกดูดนม ทั้งนี้เพราะระดับโพรแลคตินที่พุ่งสูงขึ้นขั้น -2 นี้จะทำให้แม่ดูดซึมแคลเซียมได้เพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้มีแคลเซียมเพียงพอในการผลิตน้ำนม โดยร่างกายไม่จำเป็นต้องดึงแคลเซียมมาจากกระดูก ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ในระยะยาว นอกจากนี้เรายังพบว่าโพรแลคตินมีผลกระตุ้นวัฏจักรการสร้าง-สลายกระดูก โดยมีส่วนทำให้มีการสะสมแคลเซียมในกระดูกของแม่ในช่วงตั้งท้อง และกระตุ้นการสลายกระดูกหลังคลอดเพื่อดึงแคลเซียมมาใช้ผลิตน้ำนม เราได้พิสูจน์ว่าโพรแลคตินสามารถออกฤทธิ์โดยตรงที่เซลล์กระดูกออสติโอเบลาสต์โดยมีผลกระตุ้นการหลั่ง RANKL และลดการหลั่ง Osteoprotegerin เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์สลายกระดูกออสติโอคลาสต์ องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับโพรแลคตินนี้ได้ตีพิมพ์เป็นบทความปริทัศน์ใน Trends in Endocrinology & Metabolism 2010 Vol.21, pp. 395-456

ในการศึกษาส่วนที่สองเกี่ยวกับระบบประสาทและการควบคุมวัฏจักรการสร้าง-สลายกระดูก (Bone turnover) เราได้พบว่านอกจากการกระตุ้นของระบบซิมพาเทติกผ่านทางตัวรับอดรี

เนอจิกซินิด เบต้า-2 (β_2 -AR) และ อัลฟา-1 (α_1 -AR) ซึ่งเป็นที่ทราบกันแล้วนั้น เราจึงพบว่าการควบคุมเกิดขึ้นผ่านตัวรับออร์โธเนอจิก เบต้า 3 (β_3 -AR) ด้วย มีผลทำให้เซลล์ต้นแบบเจริญไปเป็นเซลล์ออสติโอเบลาสต์เร็วขึ้น แต่ถ้าใช้ยับยั้ง β_3 -AR ในขนาดยาต่ำๆกลับมีผลกระตุ้นการสร้างกระดูก โดยปกติแล้วการป้องกันไม่ให้สูญเสียมวลกระดูกมักใช้ยาลดการสลายกระดูก ทั้งนี้เนื่องจากไม่ค่อยมีปัจจัยหรือยาที่สามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นผลการวิจัยนี้จึงมีประโยชน์มากและสามารถต่อยอดสู่การพัฒนา β_3 -AR เพื่อใช้เป็นตัวเร่งอัตราการสร้างกระดูกได้ หนึ่งวัฏจักรของการสร้าง-สลายกระดูกนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการขนส่งสารอิเล็กโทรไลต์ระหว่างน้ำกระดูก (bone fluid) กับเลือด ซึ่งในปัจจุบันมีสมมติฐานว่าการขนส่งจะถูกควบคุมโดยเยื่อเมมเบรนที่ผิวกระดูก (bone membrane) ที่เกิดจากการเรียงตัวของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ต่อกันเป็นแผ่น epithelium เราได้พิสูจน์คุณสมบัติของเยื่อเมมเบรนนี้โดยตรวจพบการแสดงออกของ mRNA ของโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ความเป็น epithelium tight junction ได้แก่ (ZO-1,-2,-3, cingulin, occludin, cingulin-1 ถึง -12, -14 ถึง -20, -22 และ -23 และโปรตีนคลอดินหลายตัวโดยเฉพาะคลอดิน -16 ซึ่งทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของแคลเซียมใน tight junction จึงเป็นการพิสูจน์ว่าเยื่อเมมเบรนที่กระดูกมีจริงซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการลดอุบัติการณ์ของโรคกระดูกพรุนและ metabolism bone disease อื่นๆ และน่าจะเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการวิจัยหาวิธีควบคุมอัตราการสลายกระดูก

Abstract**E** 47396

In order to prevent and reduce the incidence of osteoporosis and other metabolic bone diseases in the elderly, the proportion of which is on the rise, we need to understand what factors and how they that determine bone mass, etiology and pathophysiology and factors that can slow down changes in bone microarchitecture and bone loss. Our Consortium for Calcium and Bone Research (COCAB), thus aimed to use a multidisciplinary approach to obtain knowledge regarding the mechanisms of intestinal calcium absorption, bone remodeling and factors involved in their regulation so that these findings would provide solid foundation for future research for prevention, diagnoses, and treatment.

Our research was divided into two major projects. First was the study of the role of prolactin as a calcium regulating hormone, especially its significance in pregnancy and lactation. The second project was the study of regulation of bone turnover by the nervous system.

Study in experimental animals and cultured cells showed that prolactin, a pituitary hormone, enables maternal boby to provide adequate calcium for fetal development and milk production by stimulating the intestinal calcium absorption, both the transcellular active transport and paracellular transport. For example, in rats, long termed elevation of circulating prolactin to 75-100 ng/mL in pregnancy and 200-300 ng/mL in lactation increases the expression of proteins involved in the transcellular calcium transport, namely TRPV6, TRPV5, and calbindin D9k, and reduces the expressions of proteins that regulate tight junction, namely occludin and ZO-1 resulting in increased paracellular calcium transport, we call this approximately two-fold increase in intestinal calcium absorption Step-1, which is immediately increased to Step-2 when blood prolactin level shoots up to 600-800 ng/mL 15-90 minutes after the start of nursing. This Step-2 response is acute and does not involve expression of calcium transporter genes. Based on this information, lactating mothers should drink a glass of milk or take calcium supplement about 30 minutes before nursing the baby as the elevated prolactin level in Step-2 will further increase maternal calcium absorption. The absorbed calcium will thus be available for milk production and help reduce demand for resorbed calcium from bone, which will be beneficial to mother in the long run.

Prolactin also has a stimulating effect on bone remodeling. Together with other hormones, prolactin induces bone calcium accumulation during pregnancy and bone resorption during lactation. We have shown that prolactin can directly stimulate osteoblasts to secrete RANKL and to stop secreting osteoprotegerin, thus resulting in enhanced osteoclastogenesis and bone resorption. Our work on prolactin and its calcium regulating

F47396

roles has recently been published as a review in Trends in Endocrinology & Metabolism, 2010 Vol.21, and pp 395-456.

In part two of our project, we studied the neural control of bone turnover by identifying adrenergic receptors as the sympathetic nervous system has been known to regulate bone remodeling. Besides β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) and α_1 -adrenergic receptor (α_1 -AR), we found that it was β_3 -adrenergic receptor β_3 -AR that mediates the stimulatory effect of the sympathetic neural control on differentiation of progenitor cells into osteoblasts. In addition, we showed that low doses of β_3 -AR blocker could induce bone formation. Decrease in bone loss is generally achieved by preventing bone resorption and not by increasing bone formation as anabolic agents are rare. However, our finding is of potential importance and can lead to development of β_3 -adrenergic agonists that could be used to enhance bone formation.

It is well known that bone remodeling or bone turnover is directly associated with ion exchanges eg., calcium and phosphate between the extracellular fluid and bone fluid. However, very little is known about the barrier separating the two compartments or "bone membrane", which is believed to be an epithelium-like layer of bone lining cells (also known as inactive osteoblasts). Another of our recent investigations has provided evidence of the existence of this bone membrane. We showed that osteoblasts expressed mRNA of epithelial tight junction-associated proteins, namely, ZO-1,-2,-3, cingulin, occludin, claudins-1 to -12, -14 to -20, -22 and -23. Many claudin proteins were expressed; of special interest is claudin -16, which is like a calcium channel in the tight junction. Therefore, we have provided evidence in support of the existence of bone membrane, which could be an important new target for research on drugs to modulate bone resorption.