



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับโปรตีนและอาร์เอ็นเอคาร์พัส
ของเอนไซม์เมทริกซ์เมทิลโลโปรตีน-9 ในเซลล์สร้างกระดูก

โดย

ผศ.ทพ.ดร.พสุธา ัญญะกิจไพศาล

ตุลาคม 2545

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับโปรตีนและอาร์เอ็นเอในรหัส
ของเอนไซม์เมทริกซ์เมทิลโลโปรตีนเอส-9 ในเซลล์สร้างกระดูก

โดย

ผศ. ทพ. ดร. พสุธา ธีญะกิจไพศาล

เดือนตุลาคม พ.ศ. 2545

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ทญ. ดร. วิสาขะ ลิ้มวงศ์ และ ผศ. ทญ. ดอลลี เมธาธราธิป ที่ให้คำแนะนำ และสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณ รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ ที่ให้คำแนะนำการ แยกเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกศีรษะของหนู ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอนุญาตใช้สถานที่และอุปกรณ์เพื่อการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก กองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2544

เลขหมู่
เลขทะเบียน ๐๑๑๖๒๗
วัน,เดือน,ปี ๒๓.๒.๔๕

ชื่อโครงการวิจัย	ผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับโปรตีนและอาร์เอ็นเอในเซลล์ของ เอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-9 (เอ็มเอ็มพี-9) ในเซลล์สร้างกระดูก
ชื่อผู้วิจัย	ผศ. ทพ. ดร. พสุธา ธีญญะกิจไพศาล
ปีที่ทำวิจัยเสร็จ	ตุลาคม 2545

บทคัดย่อ

เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส ที่มีความเกี่ยวข้องกับต่อพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ที่มีการทำลายของกระดูกบ่าฟัน วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารซิมวาสเตติน ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ระดับโปรตีนและระดับอาร์เอ็นเอในเซลล์ของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์ไลน์สร้างกระดูก U2-OS และเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู จากการทดลองและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแบบเจลละติน ไชโมกราฟี และแบบเวสต์เทิร์นตามลำดับ พบว่าสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 100-500 นาโนโมลาร์ สามารถยับยั้งระดับเอนไซม์ และการสร้างโปรตีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 5-15 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งระดับเอนไซม์ และการสร้างโปรตีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์ไลน์สร้างกระดูก U2-OS ภายใน 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่าสารซิมวาสเตตินสามารถลดระดับการถอดรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์ไลน์ U2-OS ลดลง ตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองได้เสนอแนะว่า สารซิมวาสเตตินสามารถมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก

Project Title	Effect of simvastatin on the protein and mRNAs level of enzyme matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in osteoblasts
Name of the Investigator	Assistant Professor Dr. Pasutha Thunyakitpisal
Year	October, 2002

Abstract

MMP-9 is a member of enzyme matrix metalloproteinase group (MMPs) that has been associated with the pathological stage of periodontal disease including alveolar bone resorption. The purpose of this study was to investigate the effect of simvastatin on the enzyme activity, protein and mRNA level of MMP-9 in osteoblast cell line U2-OS and primary calvaria cells. The results from gelatin zymography and western blot analysis indicated that simvastatin, at concentration 100-500 nM, suppress the MMP-9 activity and the protein level within 24 hours in calvaria cells. While simvastatin, at concentration 5-15 μ M, reduce the MMP-9 activity and the protein level within 48 hours in U2-OS. RT-PCR analysis demonstrated simvastatin downregulated the mRNA level of MMP-9 expression in dose- and time- dependent manner. Taking together, these results suggest that simvastatin could downregulate the MMP-9 expression in osteoblast.

สารบัญ

หน้าหัวเรื่อง	
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
บทนำ	1-3
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4-9
วิธีการวิจัย	10-14
ผลการวิจัย	15-17
การอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	18- 20
ข้อสรุป	21
ส่วนอ้างอิง	22-28
รายการภาพประกอบ	
รูปที่ 1	29
รูปที่ 2	30
รูปที่ 3	31
รูปที่ 4	32-33
รูปที่ 5	34
รูปที่ 6	35-36

บทนำ

โรคปริทันต์นับเป็นปัญหาหลักทางทันตสาธารณสุขของประเทศไทย สาเหตุของโรคเกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งอาศัยอยู่บนหินน้ำลายและแผ่นคราบจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งประกอบด้วย เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament), เหงือก (gingiva), เคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) และทำให้สูญเสียฟันไปในที่สุด ได้มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างโรคที่มีการทำลายของกระดูกเช่น โรคไขข้ออักเสบและโรคปริทันต์กับระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 (MMP-9)¹⁻⁶ โดยในโรคปริทันต์ จะพบระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างน้ำลายและน้ำจากร่องเหงือก (gingival crevicular fluid) ที่เก็บจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์และระดับของเอนไซม์ลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษา³⁻⁵

เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 หรือ เจละติเนส-บี (gelatinase-B) เป็นโปรตีนในกลุ่มเอนไซม์เมทริกซ์ เมทัลโลโปรทีเนส (matrix metalloproteinases : MMPs) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายส่วนของ เมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่สำคัญของเนื้อเยื่อ อาทิเช่น คอลลาเจน (collagen) อีลาสติน (elastin) ลามินิน (laminin) และไฟโบรเนกติน (fibronectin)⁷ เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 สามารถสร้างได้ในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ⁸⁻¹⁰ เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast)¹¹⁻¹² และเซลล์สลายกระดูก (osteoclast)¹³⁻¹⁴ เชื่อว่าเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเนื้อเยื่อกระดูกมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูก รวมทั้งการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญต่อการพัฒนาและคงสภาพของโครงสร้างของกระดูก¹⁵⁻¹⁷ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 มีความเกี่ยวข้องกับการลุกลาม (invasion) และแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งของกระดูก (osteosarcoma) ในหนูทดลอง¹⁸

แม้ว่าระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกกับการสลายกระดูก ยังไม่มีความเกี่ยวข้องกันโดยตรง แต่เมื่อทดสอบเซลล์สร้างกระดูกด้วยสารไซโตไคน์ (cytokine) หรือฮอร์โมนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสลายกระดูก เช่น สารอินเตอร์ลิวคินวัน-เบต้า (interleukin 1 β ; IL-1 β), ทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor-alpha ; TNF- α) และพาราไทรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone) พบว่าเซลล์สร้างกระดูกจะสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เพิ่มขึ้น^{12,19-20} จากข้อมูลเบื้องต้นมีการเสนอแนะว่า เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่สร้างในเซลล์สร้างกระดูก อาจมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายกระดูก การปรับแต่งกระดูก และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งของกระดูก ดังนั้นการควบคุมการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก อาจช่วยในการควบคุมและป้องกันการสลายกระดูกและการลุกลามของเซลล์มะเร็งกระดูกได้อีกวิธีหนึ่ง

สแตติน (statin) เป็นกลุ่มยาที่ใช้ในการลดปริมาณโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด เพื่อป้องกันการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวเฉียบพลัน²¹⁻²² มีรายงานความสัมพันธ์ของการใช้ยากกลุ่มสแตตินกับการลดลงของการหักของกระดูกเชิงกรานในผู้ป่วยสูงอายุ และการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density) ภายหลังจากใช้สารสแตติน ซึ่งทำให้อัตราเสี่ยงในการหักของกระดูกเนื่องจากภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis)²³⁻²⁵ ถึงแม้กลไกของสารสแตตินต่อการสร้างเพิ่มขึ้นของกระดูกยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการเสนอแนะว่า สารสแตตินอาจจะมีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกให้เกิดการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้น หรืออาจยับยั้งการสลายตัวของกระดูก โดยที่อัตราการสร้างกระดูกคงเดิม ทำให้เกิดผลลัพธ์คือการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกโดยรวม²⁶

การทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารกลุ่มสแตตินสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์แมคโครเฟจ (macrophage)²⁷ และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 (MMP-1) ในเซลล์บุหลอดเลือด (endothelium)²⁸ ดังนั้นสารกลุ่มสแตตินจึงอาจมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ MMP-9 ใน

เซลล์สร้างกระดูก และเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ในการศึกษาถึงผลสารสเตตินต่อการยับยั้งการสลายกระดูก โดยควบคุมการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในระดับอนุชีววิทยา ในแง่ของการสร้างอาร์เอ็นเอเอ็นอาร์หัสและโปรตีน โดยความรู้พื้นฐานที่ได้จากการวิจัย จะก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจ และอาจนำไปสู่การพัฒนาองค์ความรู้ในสาขาทางด้านการแพทย์และทันตแพทย์ ที่เกี่ยวข้องกับกระดูก อาทิเช่น การควบคุมโรคที่มีการทำลายของกระดูก เช่นโรคปริทันต์และภาวะกระดูกพรุน ตลอดจนการนำสารสเตตินไปใช้ร่วมกับรากเทียม (dental implant) เพื่อเพิ่มการยึดติดของวัสดุกับกระดูกเบ้าฟัน

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มเอนไซม์เมทริกซ์ เมทัลโลโปรทีเนสหรือเอ็มเอ็มพี (matrix metalloproteinase ; MMP) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารเมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ทั้งในสภาวะปกติ อาทิเช่น การปรับแต่งของเนื้อเยื่อ (remodeling) หรือสภาวะพยาธิสภาพที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อ เช่น โรคปริทันต์ โรคข้อต่ออักเสบ (arthritis) การลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น โดยกลุ่มเอนไซม์เมทัลโลโปรทีเนสสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) กลุ่มเอนไซม์เจละติเนส (gelatinase) กลุ่มเอนไซม์สโตรมิไลซิน (stromelysin) กลุ่มเมทริกไลซิน (matrilysins) และกลุ่มเมมเบรน (membrane type-MMPs) โดยเอนไซม์เหล่านี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันในส่วนของแคทาลิติกโดเมน (conserved catalytic domain) และต้องการไอออนของสังกะสี (Zinc²⁺) เพื่อการทำงาน^{7,29-30}

กลุ่มเอนไซม์เจละติเนส ประกอบด้วย เอนไซม์เจละติเนส-เอ หรือเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 (gelatinase-A / MMP-2) และเอนไซม์เจละติเนส-บี หรือเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 (gelatinase-B / MMP-9) โดยตำแหน่งของจีน (gene) เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 อยู่บนโครโมโซมมนุษย์คู่ที่ 20 มีความยาว 7.7 kb ประกอบด้วย 13 exons ส่วนอาร์เอ็นเอเข้ารหัสมีความยาวประมาณ 2.5 kb³¹ จากการศึกษาค้นคว้าถึงการควบคุมการถอดรหัสของจีนเอ็มเอ็มพี-9 โดยการค้นหากลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อนิวเคลียสโปรตีน (transcription factor) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของจีน ตรงบริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ที่อยู่ 5' ของจีนเอ็มเอ็มพี-9 (5' cis-regulatory element) พบ TPA response element (-79, -533, -1651), NF- κ B consensus site (-600), SP-1 consensus site (-558), C-Ets consensus site (-541), CA repeat (-131 to -90) และ

retinoblastoma binding element (-55) โดยนิวเคลียสโปรตีนที่จับกับ cis-regulatory element เหล่านี้ สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยสาร phorbol ester (TPA), tumor necrosis factor- α , src oncogene และ ras oncogene⁴⁷⁻⁵¹

เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ถูกสร้างในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์นิวโทรฟิลด์ เซลล์อีโอซิโนฟิลด์ และเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ นอกจากนี้ยังพบในเซลล์สร้างกระดูก เซลล์สลายกระดูก เซลล์สร้างเคอราติน โดยตอนแรกโปรตีนจะถูกสร้างในรูปแบบที่ยังไม่พร้อมจะทำงาน (proform/ latent form) มีมวลโปรตีนประมาณ 92 kDa ประกอบไปด้วย สัญญาณชักนำ(signal peptide) โปรเปปไทด์ (propeptide), แคทาลิติกโดเมน (catalytic domain), ไฟโบรเนกติน ชนิด II โดเมน (fibronectin type II domain), โดเมนที่คล้ายคอลลาเจน (collagen-like domain) และโดเมนฮีโมเพกซิน (hemopexin-like domain) โดยโดเมนที่คล้ายคอลลาเจน โดเมนฮีโมเพกซิน และไฟโบรเนกตินโดเมน ถูกเสนอแนะว่าอาจมีผลต่อการจับตัวระหว่างเอนไซม์และสารเมทริกซ์ตั้งต้น³² การตัดส่วนโปรเปปไทด์ (propeptide) ที่อยู่ทางด้าน N-terminus ของสายโปรตีน ทำให้เอนไซม์มีมวลโปรตีนเหลือประมาณ 84 kDa และพร้อมที่จะทำงาน เอนไซม์จะดีเนสทำหน้าที่ในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ IV, V, VII, X, XI เส้นใยอิลาสตินและไฟโบรเนกติน และทำหน้าที่ในการย่อยสลายเจละติน ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของเส้นใยคอลลาเจนที่ถูกย่อยเบื้องต้นด้วยกลุ่มเอนไซม์คอลลาจิเนส^{7,29-30} ยิ่งไปกว่านั้นกลุ่มเอนไซม์เจละตินดีเนสเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเนื้องอกและมะเร็ง เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ IV ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ basement membrane⁷

นอกจากหน้าที่หลักในการสร้างกระดูกแล้ว เซลล์สร้างกระดูกมีบทบาทสำคัญในการสลายของกระดูก โดยควบคุมการเข้ามาของเซลล์สลายกระดูกและการเริ่มต้นของการสลายกระดูก³³⁻³⁴ โดยเซลล์สร้างกระดูกจะย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ยังไม่ตกผลึกของสารอินทรีย์

(nonmineralized organic matrix) ด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสและเอนไซม์เฮอร์ดิเนส เกิดเป็นช่องว่างเผยแผ่ (exposed) ส่วนของกระดูกที่ตกผลึกสารอนินทรีย์ (calcified bone) ทำให้เซลล์สลายกระดูกสามารถเข้ามาสัมผัสกับพื้นผิวกระดูกและเริ่มกระบวนการสลายกระดูก³⁵ Holiday และคณะ เสนอแนวความคิดว่าชิ้นส่วนของเส้นใยคอลลาเจนที่ถูกย่อย จะมีผลกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูกและทำให้เกิดการสลายของกระดูก³⁶ โดยการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) จะมีผลต่อโครงสร้างสามมิติของเนื้อเยื่อ และมีผลส่งต่อไปยังการทำงานและพฤติกรรมของเซลล์ ได้แก่ การยึดติดระหว่างเซลล์ (cell attachment) การแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การดิฟเฟอเรนทิเอชัน (differentiation) และการแสดงออกของจีน³⁷⁻³⁸ ดังนั้นเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 จึงเกี่ยวข้องกับการสลายกระดูก โดยการย่อยสลายส่วนของเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของกระดูกโดยตรง หรือผ่านทาง การย่อยชิ้นส่วนของเส้นใยคอลลาเจน

หนูทดลองที่ถูกทำลายจีนเอ็มเอ็มพี-9 (MMP-9 deficient mice) พบมีความผิดปกติของการสร้างกระดูก โดยการพัฒนาที่ช้ากว่าปกติของกระดูกบริเวณ growth plate และกระดูกที่พัฒนามาจากโครงกระดูกอ่อน (endochondral ossification)³⁹ หนูทดลองที่มีส่วนโปรโมเตอร์ (promoter) ของจีนเอ็มเอ็มพี-9 ติดกับจีน lac Z (Gelatinase B/lacZ transgenic mice) พบมีการแสดงสัญญาณของจีน lacZ ของส่วนเนื้อเยื่อผิวหนัง และเนื้อเยื่อที่จะพัฒนาเป็นกระดูกไขสันหลัง กระดูกซี่โครง กระดูกแขนขา นิ้ว และกระดูกขากรรไกร ของลูกหนูในครรภ์⁴⁰ จากข้อมูลเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่สร้างจากเซลล์สร้างกระดูก มีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง สลาย และการปรับแต่งของกระดูก ดังนั้นเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจศึกษา เพื่อการเข้าใจกลไกและการควบคุมการสร้างเอนไซม์ในเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการควบคุมการสลายตัวและการปรับแต่งของกระดูก

สารกลุ่มสเตตินและผลของสารกลุ่มสเตตินต่อการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นโดยรวมของกระดูก

สารในกลุ่มสเตติน ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ เพื่อลดระดับของโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดและลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจล้มเหลวแบบเฉียบพลัน โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ควบคุมการสร้างโคเลสเตอรอลภายในเซลล์ (endogenous synthesis)⁴¹⁻⁴³ สารกลุ่มสเตตินยังมีผลต่อการทำงานของโปรตีน Ras ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (protooncogene) โดยมีผลต่อการยึดติดของโปรตีน Ras กับผนังด้านในของเซลล์ (cytoplasmic membrane association) และการทำงานของโปรตีน (biological function)⁴⁴⁻⁴⁵ นอกเหนือจากผลต่อการยับยั้งการสร้างโคเลสเตอรอลภายในเซลล์และการทำงานของโปรตีน Ras ได้มีการรายงานถึงผลของสารซิมวาสแตติน (simvastatin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสเตติน ต่อการกระตุ้น Akt protein kinase ในเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) โดย Akt protein kinase จะเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มกลุ่มฟอสเฟต (PO₄) ให้กับ nitric oxide synthase ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิด apoptosis และการให้สารซิมวาสแตตินจะกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดขึ้นมาใหม่ (angiogenesis) ในกระต่ายทดลอง⁴⁶ ดังนั้นสารสเตตินอาจจะมีผลต่อเซลล์ โดยผ่านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโคเลสเตอรอล และ/หรือมีผลทางกระบวนการที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโคเลสเตอรอล

ได้มีการรายงานถึงผลข้างเคียงของสารกลุ่มสเตตินต่อการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density) รวมทั้งการลดลงของการหักของกระดูกเชิงกรานในผู้ป่วยสูงอายุที่ได้รับยากกลุ่มสเตติน ซึ่งทำให้ลดอัตราเสี่ยงของการหักของกระดูกเนื่องจากโรคกระดูกพรุน (osteoporosis)²³⁻²⁵ ยิ่งไปกว่านั้นการทดลองในหนู ที่ได้รับการฉีดสารสเตตินเข้าไปใต้ชั้นหนังศีรษะหรือการให้กินสารสเตติน พบมีการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกโดยรวม²⁶ อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้น

ของมวลกระดูกโดยรวม อาจจะมาจากการเพิ่มขึ้นของกระดูกที่เกิดจากเซลล์สร้างกระดูกมีการสร้างกระดูกมากขึ้น และ/หรือการสลายตัวของกระดูกลดลง

ในแง่ของการยับยั้งการสลายของกระดูกของสารกลุ่มสเตติน อาจจะมาจากการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก เนื่องจากมีการรายงานถึงผลของสารกลุ่มสเตตินที่มีต่อระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในระดับโปรตีนและอาร์เอ็นเอในเซลล์ของเซลล์แมคโครเฟจ (macrophage)²⁷ จากการทำวิจัยนำร่องของผู้เสนอโครงการ พบว่าสารซิมวาสเตตินซึ่งอยู่ในกลุ่มสเตติน สามารถลดระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก U2-OS เมื่อทดสอบเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงที่มีสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยสารผสมระหว่างคอนคานาวาริน-เอ (concanavalin-A) ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ร่วมกับสารซิมวาสเตติน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบมีการลดลงของระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ตามความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ดี ผลการทดลองที่ได้จากวิธีไซโมแกรม ซึ่งเป็นวิธีวัดการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ยังไม่สามารถที่จะชี้แนะว่า สารซิมวาสเตตินมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องมาจากการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในระดับการถอดรหัสของจีน (transcription) เพื่อสร้างสายอาร์เอ็นเอในรหัส หรือการแปรสัญญาณจากสายอาร์เอ็นเอในรหัสไปสู่สายโปรตีน (translation) หรือการควบคุมโปรตีนภายหลังการแปรสัญญาณ (post-translation control)

ดังนั้นสารซิมวาสเตติน จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ในการศึกษาค้นคว้ากลไกการควบคุมหรือยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในระดับของอาร์เอ็นเอในรหัส และในระดับปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น โดยความรู้พื้นฐานที่ได้จะก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงกลไกระดับโมเลกุลของสารซิมวาสเตตินต่อเซลล์สร้างกระดูก และอาจนำไปสู่การพัฒนาองค์ความรู้และการ

ประยุกต์ใช้ในสาขาทางด้านการแพทย์และทันตแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก อาทิเช่น การยับยั้งการสลายตัวของกระดูกในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์หรือภาวะกระดูกพรุน

วิธีการวิจัย

การการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก (calvaria cell) จากชิ้นส่วนกระดูกศีรษะของหนู
 รูปแบบและขั้นตอนดัดแปลงมาจากวารสารทีตีพิมพ์⁵²⁻⁵³ กระโหลกศีรษะของลูกหนู อายุ
 1-2 วัน จะถูกแยกจากส่วนของเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) และเนื้อเยื่อที่ยึดระหว่างชั้นของ
 กระโหลกศีรษะ (sutural fibrous tissue) จากนั้นชิ้นกระดูกก็จะถูกทำให้มีขนาดประมาณ 2 x 2
 มิลลิเมตร และย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ II (collagenase type III, Gibco BRL) ที่
 ความเข้มข้น 0.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Hank's salt balance solution (Gibco BRL) ที่อุณหภูมิ
 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสารละลายจะถูกปั่นเพื่อรวบรวมเซลล์สร้างกระดูกที่ความเร็ว
 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นชิ้นกระดูกก็จะถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส
 ชนิดที่ II ครึ่งละ 20-30 นาที โดยเซลล์ที่แยกได้จากการย่อยแต่ละครั้ง จะถูกเรียกเป็น เซลล์สร้าง
 กระดูกที่ได้จากการย่อยครั้งที่ 1,2,3 และ 4 (calvaria cell fraction ที่ 1, 2,3 และ 4) ตามลำดับ
 เซลล์ที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 มิลลิเมตร (Nunc) เซลล์จะเจริญแบ่งตัว
 เต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายใน 7 วัน จากนั้นจะถูกถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร (Nunc)
 และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 โดยเซลล์สร้างกระดูกที่ใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 2-4

ส่วนเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ (U2-OS human osteoblast cell line, ATCC
 number: HTB-96) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Professor Maea-aki Ikeda, Tokyo Medical and
 Dental University, Japan โดยเซลล์สร้างกระดูก (calvaria cell) และ U2-OS osteoblast cell
 line จะถูกเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco Modified Eagle's
 Medium) ที่ประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ คือ ซีรัม (Fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ
 20, แอล-กลูตามีน (L-Glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, เพนนิซิลิน-จี (Penicillin-G) ความ

เข้มข้น 100 ยูนิท/มิลลิลิตร, สเตรปโตไมซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดได้จาก GIBCO (USA) จากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2-3 วัน

การทดสอบสารชีวกลิตินต่อการทำงานของเอนไซม์, ระดับโปรตีนและอาร์เอ็นเอในเซลล์ของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9

เซลล์สร้างกระดูกจะถูกหว่าน 200,000 เซลล์ต่อหลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (Nucn) หรือ 500,000 เซลล์ ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมร้อยละ 10 เมื่อจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเติบโตและมีจำนวนประมาณร้อยละ 80-90 ของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ (90% confluence) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากซีรัม เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นอาหารเพาะเลี้ยงปราศจากซีรัมที่มีสารชีวกลิตินที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จนครบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (conditioned media) จะถูกรวบรวมเพื่อตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ด้วยวิธีไซโมกราฟี (zymography) และวัดปริมาณของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ด้วยวิธี Western immunoblot analysis ส่วนเซลล์จะถูกจัดเก็บเพื่อแยกสกัดอาร์เอ็นเอในขั้นต่อไป

การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ด้วยวิธีเจลละตินไซโมกราฟี (Gelatin zymography)

วิธีวัด Gelatinolytic activity ของเอนไซม์เจลาติเนส อาศัยความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเจลาติน โดยรูปแบบและขั้นตอน ดัดแปลงจากวารสารที่ตีพิมพ์¹² โปรตีนที่อยู่ใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกรวบรวมหลังการทดสอบ (conditioned medium) จะถูกแยกตามมวลโมเลกุลด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis) ในสภาวะ non-reducing ด้วย 10% SDS-PAGE ที่มี 0.1% เจลลาติน จากนั้นแผ่นเจลจะถูกนำไปแช่ในสารละลาย Renaturing buffer (2.5% Triton X-100) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปแช่ในสารละลาย Activating buffer [50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂ และ 0.02% Polyoxyethylene ether(Brij-35)] เป็นเวลา 16-48 ชั่วโมง ความสามารถในการย่อยเจลาตินของเอนไซม์เจลาติเนส-บี จะตรวจวัดด้วยการย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 โดยการทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Western immunoblot analysis

รูปแบบและขั้นตอน ดัดแปลงจากวารสารทีตีพิมพ์¹⁰ โดยย่อคือโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกรวบรวมหลังการทดสอบ (conditioned medium) ตามเวลาที่กำหนดจากนั้นสารอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีน (BIO-RAD) โปรตีน 50 ไมโครกรัมจะถูกทำให้เดือดเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) โดยใช้อะคริลามายด์เจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (SDS-PAGE) จากนั้นโปรตีนจะถูกเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน (PVDF membrane) ด้วยไฟฟ้า แผ่น PVDF จะถูกนำไปแช่ในสารละลาย Blocking solution เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงแล้วนำไปทดสอบกับแอนติบอดีที่เฉพาะ (monoclonal antibody) ต่อเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 (Sigma cat no. M5302, USA) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตามด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate, Sigma cat no. A6154) และตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วย Enhanced Chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagent kit (Amersham Life Science) โดยสัญญาณที่ได้จะปรากฏบนแผ่นฟิล์มตามความเข้มข้นของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านความเข้มข้นเดนซิโตมิเตอร์ GS-700 Imaging

densitometer (Bio Rad, USA) และคำนวณด้วยโปรแกรม Molecular Analyst Software version 1.5, Bio Rad, USA)

การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ นำรหัสด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

รูปแบบและขั้นตอน ดัดแปลงจากวารสารทีตีพิมพ์¹² โดยย่อคืออาร์เอ็นเอจากเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในสภาวะข้างต้น จะถูกแยกด้วยสาร TRIzol ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (Gibco BRL) ปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย UV-spectrophotometer ที่ OD 260/280 จากนั้นนำอาร์เอ็นเอ ปริมาณ 2 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองจะถูกเปลี่ยนเป็น single strand cDNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase และขยายสัญญาณด้วยปฏิกิริยา PCR 25 รอบ โดยใช้ forward and reverse primers ที่ออกแบบให้สอดคล้อง (complementary) กับ cDNA ของจีนเอ็มเอ็มพี-9 โดยสัญญาณที่ได้จะแสดงถึงระดับอาร์เอ็นเอของจีนเอ็มเอ็มพี-9 เพื่อเป็นการยืนยันว่า จำนวนอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้ในการขยายสัญญาณของจีนเอ็มเอ็มพี-9 มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณของจีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น house keeping gene จะถูกนำมาขยายสัญญาณด้วย forward and reverse primers ที่ออกแบบให้สอดคล้อง (complementary) กับ cDNA ของจีน GAPDH เพื่อเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดย PCR product จะนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรส เจล (gel electrophoresis) เพื่อเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากแต่ละกลุ่มทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่

ทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแฉง
ทางเดียว (One-way Analysis of Variance) และแบบทดสอบของ scheffe ที่ระดับความ
เชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

สารซิมวาสเตตินลดระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์ U2-OS

เจลละติน ไซโมกราฟี เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้วัดระดับการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเจลาติเนส โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มีสามารถเฉพาะในการย่อยสลายเจลาติน ซึ่งวิธีนี้มีความไวสูงมาก สามารถวัดเอนไซม์ในระดับพิโคกรัม (picogram) ทำให้เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ซึ่งถูกแยกตามมวลโมเลกุลด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้า ในสภาวะ non-reducing เมื่อได้มีการปรับสภาพของเอนไซม์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับการทำงาน จะทำให้สามารถย่อยเจลาตินที่ผสมอยู่ในเนื้อเจล เกิดเป็นแถบใสของเจลเมื่อย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue ขณะที่ส่วนอื่นของเจลที่ยังคงมีเจลาตินอยู่จะถูกย้อมติดสีน้ำเงิน

จากเจลาตินไซโมกราฟี พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สารซิมวาสเตตินไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ของเซลล์ U2-OS ในขณะที่ทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าการลดลงของระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ตามลำดับความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1) มีประเด็นที่น่าสนใจที่ควรกล่าวถึงคือ ระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 หรือ เจลละตินเอส-เอ ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 68 kDa มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9

เพื่อทดสอบว่าสารซิมวาสเตตินไม่มีผลโดยตรงต่อการย่อยสลายเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่ถูกหลั่งออกมาจากนอกเซลล์ ดังนั้น conditioned media ที่เก็บมาจากเซลล์ U2-OS ในสภาวะปราศจากซีรัม ถูกนำมาทดสอบกับสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้นและอยู่ในสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกับที่ทดสอบในเซลล์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมา

วิเคราะห์ด้วยวิธีเจลละติน ไชโมกราฟ ผลการทดลองพบว่าสารซิมวาสเตตินไม่มีโดยตรงต่อการย่อยสลายเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่อยู่ใน conditioned media (รูปที่ 2)

สารซิมวาสเตตินสามารถลดระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพีที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ U2-OS

เพื่อเป็นการยืนยันว่า แอบริตีนที่พบโดยวิธีเจลละติน ไชโมกราฟ เป็นเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 วิธีทดสอบ Western blot โดยใช้แอนติบอดีเฉพาะต่อเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และตรวจวัดโดยวิธี chemiluminescent ถูกนำมาใช้ ผลการทดลองพบว่า สารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครโมลาร์ สามารถลดระดับโปรตีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 อย่างมีนัยสำคัญ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

สารซิมวาสเตตินสามารถลดระดับอาร์เอ็นเอ mRNA ของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9

เพื่อเป็นการตรวจสอบ การลดลงของการทำงานและระดับโปรตีนของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เกิดจากการลดลงของการแปลสัญญาณ (translation) หรือ การอ่านรหัสของจีน (transcription) เซลล์สร้างกระดูก U2-OS ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยเซลล์จะถูกรวบรวมที่ระยะเวลาที่ 0, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกรวบรวมเพื่อแยกสายอาร์เอ็นเอ จากนั้นสายอาร์เอ็นเอ mRNA จะถูกนำมาแปลงและขยายสัญญาณด้วยวิธี reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

จาก RT-PCR พบว่าระดับอาร์เอ็นเอ mRNA ของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ลดตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสเตติน (รูปที่ 4 และ 5)

สารซิมวาสเตตินมีผลยับยั้งการทำงานและระดับโปรตีนของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์

สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู

เนื่องจากเซลล์ U2-OS เป็นเซลล์ไลน์ของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งของกระดูก ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ที่ไม่เหมือนกับเซลล์สร้างกระดูกปกติ ดังนั้นเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนูแรกเกิด ที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสในครั้งที่ 3-5 (calvaria cells fraction 3-5) จึงถูกนำมาทดสอบกับสารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 500 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น conditioned media จะถูกรวบรวมเพื่อทดสอบด้วยวิธีเจลาติน ไซโมกราฟฟี และ western blot analysis ผลการทดลองพบว่าสารซิมวาสเตตินระดับความเข้มข้น 250-500 นาโนโมลาร์ มีผลยับยั้งการทำงานและระดับโปรตีนของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 (รูปที่ 6)

การอภิปรายผล

ในงานวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาผลของสารซิมวาสเตดินต่อระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก โดยใช้ เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู (primary calvaria cell) และเซลล์ไลน์สร้างกระดูก U2-OS โดยศึกษาในแง่ของการทำงานของเอนไซม์ ระดับเอนไซม์ที่ถูกสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ และระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส โดยวิธีเจละติน ไชโมกราฟี, western blot และ RT-PCR ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกันและเสนอแนะว่า ในเซลล์สร้างกระดูก สารซิมวาสเตดินสามารถยับยั้งการถอดรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ทำให้ระดับเอนไซม์ที่หลั่งออกมาและการทำงานของเอนไซม์ลดลงตามลำดับ โดยสารซิมวาสเตดินสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะ ที่ระดับความเข้มข้น 250 – 500 นาโนโมลาร์ และ เซลล์ไลน์สร้างกระดูก U2-OS ที่ระดับความเข้มข้น 5-15 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ถึงแม้ว่าระดับความเข้มข้นของสารซิมวาสเตตินที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกทั้งสองจะแตกต่างกันมาก ซึ่งอาจจะอธิบายได้ในแง่ของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะเป็น primary cell culture ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายเป็นเซลล์สร้างกระดูก ส่วนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก U2-OS เป็นเซลล์มะเร็งกระดูกที่ยังมีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์สร้างกระดูกปกติ แต่เซลล์ไลน์นี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในและการทำงานของเซลล์ ทำให้มีความสามารถทนต่อฤทธิ์ของสารซิมวาสเตตินได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามจากการทดสอบความเป็นพิษของสารซิมวาสเตตินที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะและ เซลล์ U2-OS ด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารซิมวาสเตติน 2 ไมโครโมลาร์ และ 20 ไมโครโมลาร์ มีความเป็น

พิษต่อเซลล์ ที่ระดับความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการลดลงของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและการสร้างโปรตีนจึงไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษของสารซิมวาสเตติน แต่เกิดจากผลของสารซิมวาสเตตินที่มีต่อการถอดรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ประเด็นที่น่าสนใจต่อไปคือ ระดับความเข้มข้นของสารซิมวาสเตติน 250-500 นาโนโมลาร์ ที่มีผลต่อระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะนั้น อยู่ในช่วงระดับความเข้มข้นที่พบในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับสารซิมวาสเตตินในการควบคุมระดับคลอเลสเตอรอล ซึ่งอยู่ในค่าระหว่าง 20-270 นาโนโมลาร์⁵⁴ ดังนั้นเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู จึงเหมาะสมต่อการศึกษาผลของสารซิมวาสเตตินต่อการแสดงออกของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9

เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของกระดูก โดยเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ I, III, IV และ V รวมทั้งสายคอลลาเจนที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 หรือ คอลลาจีเนส-1 (denatured collagen/ gelatin) ในหนูทดลองที่ถูกทำลายจีนของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 (MMP-9 knockout mice) พบมีความล่าช้าของการพัฒนาส่วนช่องว่างของไขกระดูก (bone marrow cavity)⁵⁵ และมีการพัฒนาที่ช้ากว่าปกติของกระดูกบริเวณ growth plate และกระดูกที่พัฒนามาจากโครงกระดูกอ่อน (endochondral ossification)³⁹ ถึงแม้ว่าบทบาทของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่หลังจากเซลล์สร้างกระดูกต่อการสร้างและสลายกระดูกยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกด้วยฮอร์โมนหรือสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูก เช่น พาราไทรอยด์ฮอร์โมน หรือ Tumor necrosis factor – alpha พบมีการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 มากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นในการทดลองโดยการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะโรคปริทันต์ พบมีการละลายของกระดูกเข้าฟันลดลง⁵⁶ ดังนั้นเอนไซม์

เอ็มเอ็มพี-9 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการละลายกระดูกน้ำฟืนของโรคปริทันต์ ได้มีการเสนอแนะว่าเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่หลังจากเซลล์สร้างกระดูกน่าจะเกี่ยวข้องกับการเตรียมพื้นผิวของกระดูก โดยการย่อยสลายสารหลังภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) สำหรับการเคลื่อนที่เข้าออกของเซลล์สลายกระดูก และการเริ่มต้นของการสลายกระดูก³³⁻³⁴ โดยเซลล์สร้างกระดูกจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ยังไม่ตกผลึกของสารอินทรีย์ (nonmineralized organic matrix / osteoid) ด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสและเอนไซม์เอนโดเพนส เกิดเป็นช่องว่างเผยแผ่ (exposed) ส่วนของกระดูกที่ตกผลึกสารอินทรีย์ (calcified bone) ทำให้เซลล์สลายกระดูกสามารถเข้ามาสัมผัสกับพื้นผิวกระดูกและเริ่มกระบวนการสลายกระดูก

สารซิมวาสเตตินเป็นสารในกลุ่มสเตติน ซึ่งได้มีการรายงานถึงผลในการเพิ่มมวลกระดูกโดยรวมในผู้ป่วยและหนูทดลองที่ได้รับสารสเตติน ถึงแม้ว่ากลไกที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีการเสนอแนะว่า สารสเตตินอาจเร่งการสร้างกระดูกใหม่ หรือลดการสลายกระดูกหรือทั้งสองอย่าง ได้มีการรายงานถึงผลของสารสเตตินในการกระตุ้นการสร้างสาร bone morphogenesis protein (BMP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เร่งการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก²⁶ การค้นพบว่าสารซิมวาสเตตินสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก ในระดับการถอดรหัสของจีนในการรายงานครั้งนี้ ถือได้ว่าเป็นการค้นพบครั้งแรก เพราะจากการสืบค้นหาของผู้วิจัยนั้น ยังไม่เคยพบการรายงานในวารสารมาก่อน จากผลการทดลอง ได้เสนอแนะว่าสารซิมวาสเตตินน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการสลายตัวของกระดูก โดยผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูก แต่อย่างไรก็ดีการศึกษาผลของสารซิมวาสเตตินต่อระดับเอนไซม์คอลลาจิเนส ซึ่งเป็นเอ็มเอ็มพีที่เกี่ยวข้องกับการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ

กระดูก ในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูก ตลอดจนศึกษาถึงการควบคุมการถอดรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 โดยการใช้ promoter-reporter gene assay เพื่อค้นหาช่วงของ promoter ของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และนิวเคลียสโปรตีนที่ตอบสนองต่อสารซิมวาสเตติน ในเซลล์สร้างกระดูกนั้น เป็นสิ่งที่ท้าทายและน่าสนใจในการศึกษาต่อไป

ข้อสรุป

สารซิมวาสเตตินสามารถลดระดับเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่สร้างจากเซลล์สร้างกระดูก โดยมีผลไปยับยั้งการสร้างอาร์เอ็นเอ นำรหัส ทำให้การแปลสัญญาณจากสายอาร์เอ็นเอ นำรหัสไปสู่สายโปรตีนลดลง โดยผลของสารซิมวาสเตตินที่มีต่อการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เป็นไปตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น สารซิมวาสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 250-500 นาโนโมลาร์ และ 5-15 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากกะโหลกศีรษะของหนู และในเซลล์ไลน์สร้างกระดูก U2-OS ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

1. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 59(6):455-61, 2000.
2. Ahrens, D., Koch, A.E., Pope, M., Stein-Picarella, M., and Niedbala, M.J. Expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: 1576, 1996.
3. Makela, M., Salo, T., Uitto, V.J., and Larjava, H.: Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J. Dent. Res.* 3 : 1397-406, 1994.
4. Ingman, T., Sorsa, T., Lindy, O., Koski, H., and Kontinen Y.T. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 21 : 26-31, 1994.
5. Teng, Y.T., Sodek, J., and McCulloch C.A.G. Gingival crevicular fluid gelatinase and its relationship to periodontal disease in human subjects. *J Periodont Res.* 27 : 544-552, 1992.
6. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993, 64 : 474-84, 1993
7. Woessner J.F., Nagase H. *Matrix metalloproteinases and TIMPs.* Oxford University Press, Inc. New York, 2000.
8. Masure S., Proost P., Van Damme J., Opdenakker G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *European Journal of Biochemistry*, 198: 391-98, 1991.

9. Corbel M., Theret N., Caulet-Maugendre S., Germain N., Lagente V., Clement B., Boichot E.
Increased activity of matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase) and neutrophil recruitment following chronic exposure to endotoxin in the mouse. *American Journal of Respiratory and Critical care medicine*, 157:A567, 1998.
10. Trocme C, Gaudin P, Berthier S., Barro C., Zaoui P., Morel F. Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 20677-84, 1998
11. Lorenao, J.A., Pilbeam, C.C., Kalinowski, J.F., and Hibbs M.S. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. *Matrix* 12: 282-290, 1992.
12. Kusano, K., Miyaura, C., Inada, M., Tamura, T., Ito, A., Nagase, H., Kamoi, K., and Suda, T.
Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9 and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvariae : association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139: 1338-45, 1998.
13. Okada Y, Naka K, Kawanura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M.
Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts : implications for bone resorption. *Lab Invest* 1995; 106: 1071-82
14. Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 1994;124:1091-102.
15. Delaisse J.M., Engsig M.T., Everts V., Ovejero M.C., Ferreras M., et al. Proteinase in bone resorption : obvious and less obvious roles. *Clinica Chimica Acta*. 291:223-34, 2000.

16. Onyia J., Hale L.V., Miles R.R., Cain R.L., Tu Y., Hulman J.F., Hock J., Santerre RF. Molecular characterization of gene expression changes in ROS 17/2.8 cells cultured in diffusion chambers in vivo. *Calcif Tissue Int*, 65:133-8, 1999
17. McClelland P., Onyia J., Miles R.R., Tu Y., Liang J., Harvey A.K., Chandrasekhar S., Hock J., Bidwell J.P. Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. *J Cell Biochem* 70:391-401, 1998.
18. Kido A., Tsutsumi M., Iki K., Takahama M., Tsujiuchi T., Morishita T., Tamai S., Konishi Y. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP-9) correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats. *Cancer Letters* 137:209-16, 1999.
19. Uchida, M., Shima, M., Shimoaka, T., Fujieda, A., Obara, K., Suzuki, H., Nagai, Y., Ikeda, T., Yamato, H. and Kawaguchi, H. Regulation of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 185 : 207-214, 2000.
20. Nagase, H. and Woessner J.F. : Matrix metalloproteinases. *J Biol. Chem.* 274: 21491-21494, 1999.
21. Rossouw, J.E., Lewis, B., Rifkind B.M.: The value of lowering cholesterol after myocardial infarction. *N. Eng. J. Med.* 323(16): 1112-9, 1990.
22. Brown W.V. : Cholesterol lowering in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 86(4B): 29H-32H, 2000.
23. Chan, K.A., Andrade, S.E., Boles, M., Buist D.S., Chase G.A. Donahue, J.G. et al. : Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet.* 355(9222) : 2185-8, 2000.

24. Chung, Y.S, Lee, M.D., Lee, S.K, Kim, H.M., and Fitzpatrick, L.A. : HM-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(3) : 1137-42, 2000.
25. Wang, P.S., Solomon, D.H., Mogun, H., and Avorn, J.: HMG-coA reductas inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA.* 283(24): 3211-6, 2000.
26. Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyce, B., Zhao, M., and Gutierrez, G. : Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statin. *Science.* 286: 1946-1949, 1999.
27. Bellosta, S., Via, D., Canavesi, M., Pfister, P., Fumagalli, R., Paoletti, R., and Bernini, F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 18(11) : 1671-8, 2000
28. Ikeda, U., Shimpo, M., Ohki, R., Inaba, H., Takahashi, M., Yamamoto, K., and Shimada, K. Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Hypertension,* 36: 325-329, 2000
29. Liotta L.A., Steeg P.A., Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis : an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-36, 1991.
30. Birkedal-Hensen, H., Proteolytic remodeling of extracellular matrix, *Curr. Opin. Cell. Biol.*7:728-35, 1995.
31. Munaut C. Salonurmis T., Kontusaari S., Reponen P., Morita T., Foidart JM., Tryggvason K. Murine matrix metalloproteinase 9 gene. *Journal of Biological Chemistry.* 274: 5588-96, 1999.
32. Massova I., Kotra L.P., Fridman R., Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB.*12:1075-95, 1998.
33. Rodan G.A., Martin T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33:349-51, 1981.

34. Aubin J.E., Bonnellye B. Osteoprotegerin and its ligand : a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int.* 11:905-13, 2000.
35. Chambers T.J., Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 76:155-65, 1985.
36. Holiday L.S., Welgus, H.G., Fliszar, C.J., Veith, G.M., Jeffrey, J.J., and Gluck, S.L. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem*, 272: 22053-8, 2000
37. Boudreau N., Bissell MJ. Extracellular matrix signaling : integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 10:640-6, 1998.
38. Bidwell J.P., Alvarez M., Feister H., Onyia J., Hock J. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *Journal of Bone and Mineral Research.* 13: 155-67, 1998.
39. Vu T.H., Shipley J.M., Bergers G., Berger J.E., Helms J.A., Hanahan D., Shapiro S.D., Senior R.M., Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-22, 1998.
40. Mohan R., Rinehart W.B., Bargagna-Mohan P., Fini M.E. Gelatinase B/lac Z transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during development and injury-related tissue remodeling. *Journal of Biological Chemistry.* 273: 25903-14, 1998.
41. Lubeert Stryer. *Biochemistry 3rd edition* ; Chapter 23 : Biosynthesis of lipids, W.H. Freeman and company, New York, USA. 1988.
42. Brown, S.M., Faust, R.J., and Goldstein L.J. : Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *Journal of Biological Chemistry.* 253 : 1121-28, 1978.
43. Hardman, J.G. and Limbird, L.E.: *Goodman & Gilman's : The pharmacological basis of therapeutics*, 9th International edition, The McGraw-Hill companies, Inc. 1996.

44. Brown, S.M. and Goldstein, L.J. : Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *Journal of Lipid Research*. 21: 505-17, 1980.
45. Schafer, W.R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim S. and Rine, J. : Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in RAS genes of yeast and humans, *Science*. 245: 379-385, 1989.
46. Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer D.J., Sessa, W.C. and Walsh, K. : The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Medicine*. 6 : 1004-1010, 2000.
47. Sato H., Seiki M. : Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*.8, 395-405, 1993.
48. Sato H., Kita M., Seiki M.: v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 23460-8, 1993.
49. Gum R., Lengyel E., Juarez J.: Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 10672-80, 1996.
50. Ricca A., Biroccio A., Bufalo D., Mackay A., Santoni A., Cipitelli M. : bcl-2 over-expression enhances NF-kB activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7^{ADR} breast cancer cells. *International Journal of Cancer*. 86, 188-196, 2000.
51. Himelstein E., Lee E., Sato H., Seiki M., Muschel R. : Tumor cell contact mediated transcriptional activation of the fibroblast matrix metalloproteinase-9 gene: involvement of multiple transcription

- factors including Ets and an alternating purine-pyrimidine repeat. *Clinical Experiment Metastasis*. 16, 169-77, 1998.
52. 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. *PNAS*. 72: 3167-71, 1975.
53. 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. *Journal of Cellular Physiology* 143: 213-21, 1990.
54. Desager J.P. , Horsmans Y. *Clin. Pharmacokinet*. 31: 348-371, 1996.
55. Chen Q.J., Lund L., Lenhard T., Engsig M., Winding B., Therkildsen B., Pedersen AC., Delaisse J.M. MMP-9 is a regulator of osteoclast recruitment as demonstrated by targeted mutagenesis. *Bone* 23:S548, 1998.
56. Ramamurthy N.S., Xu J-W, Bird J., Baxter A., Bhogal R., Wills R., Watson B., Owen D., Wolff M., Greenwald R.A. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J Periodont Res* 37:1-7, 2002.

Simvastatin decreases the gelatinolytic activity of MMP-9 in dose-dependent manner, at 48 hr.

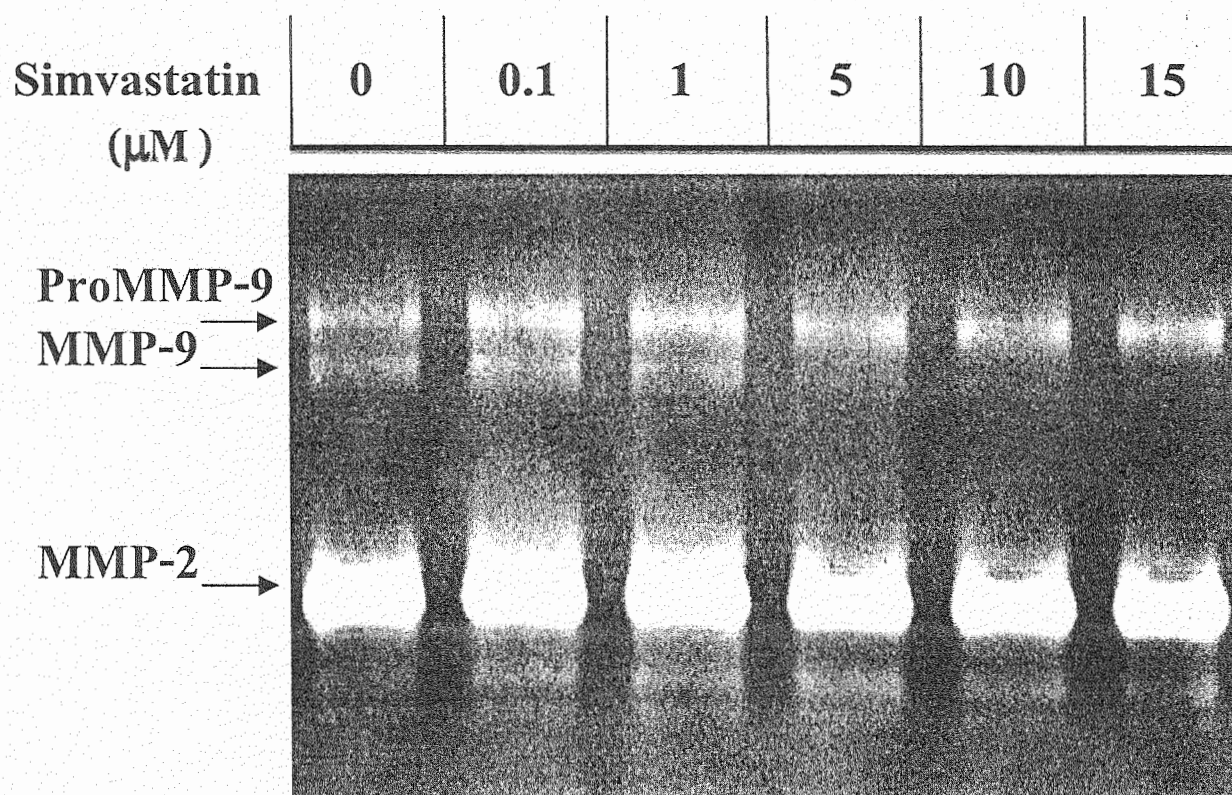


Figure 1. ผลของสารซิมวาสแตตินต่อระดับการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 เมื่อเซลล์ U2-OS ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แถบสีสีขาวแสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์สร้างกระดูก U2-OS เมื่อวัดด้วยวิธี gelatinolytic activity

Simvastatin do not have the direct effect on MMP-9 degradation in conditioned media collected from U2-OS

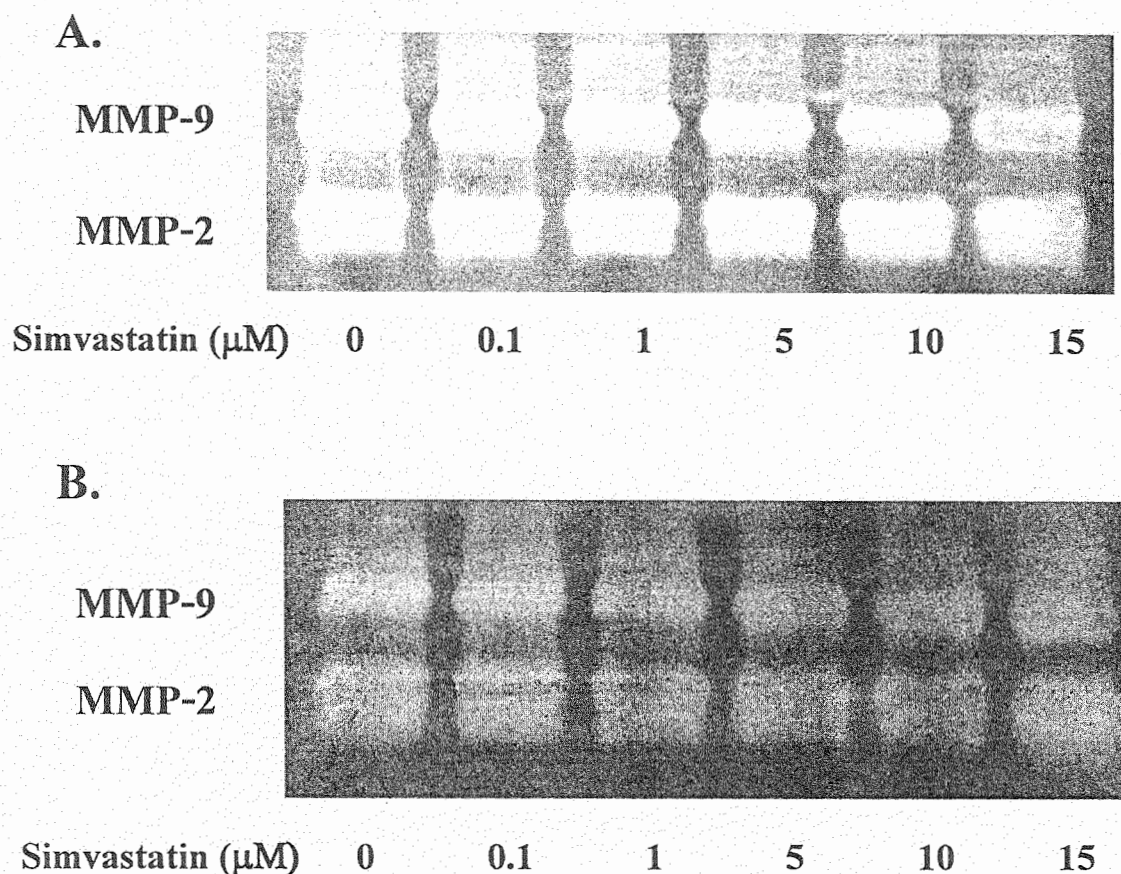


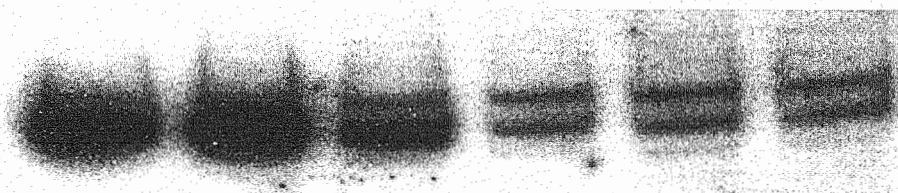
Figure 2. Condition media ที่เก็บจาก U2-OS ถูกนำมาทดสอบด้วยสารซิมวาสเตติน ในสภาวะที่เหมือนกับทดสอบกับเซลล์ U2-OS และนำมาวิเคราะห์โดยวิธีเจลิตินไซโมแกรม

A. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และ -2 เมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

B. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และ -2 เมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสเตตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

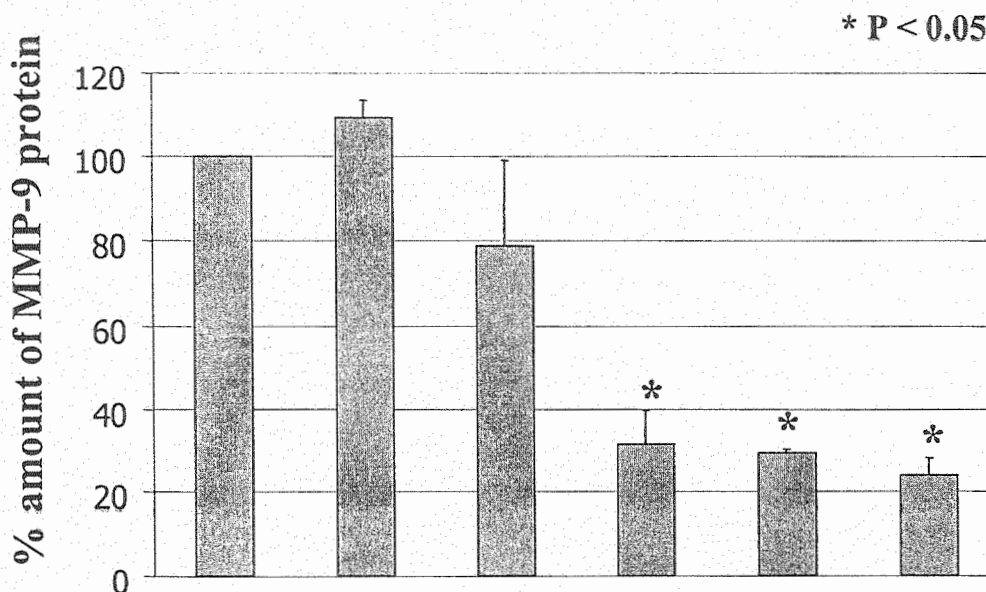
Western blot revealed simvastatin reduces the MMP-9 expression in U2-OS at 48 hr.

A.



Simvastatin (μM) 0 0.1 1 5 10 15

B.



Simvastatin (μM) 0 0.1 1 5 10 15

Figure 3. ผลของสารซิมวาสแตตินต่อการหลั่งเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ของเซลล์ U2-OS

โดยเซลล์ถูกทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่หลั่งออกจากเซลล์ เมื่อวัดด้วยวิธี western blot

B. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของความเข้มของแถบโปรตีน ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

และวิเคราะห์ทางสถิติ โดยโปรแกรม ANOVA , Schffe's test. $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

Simvastatin reduces the level of MMP-9 mRNA expression of U2-OS cell in time dependent manner

A.

Simvastatin (μM) 0 0.1 1 5 7.5 10 15

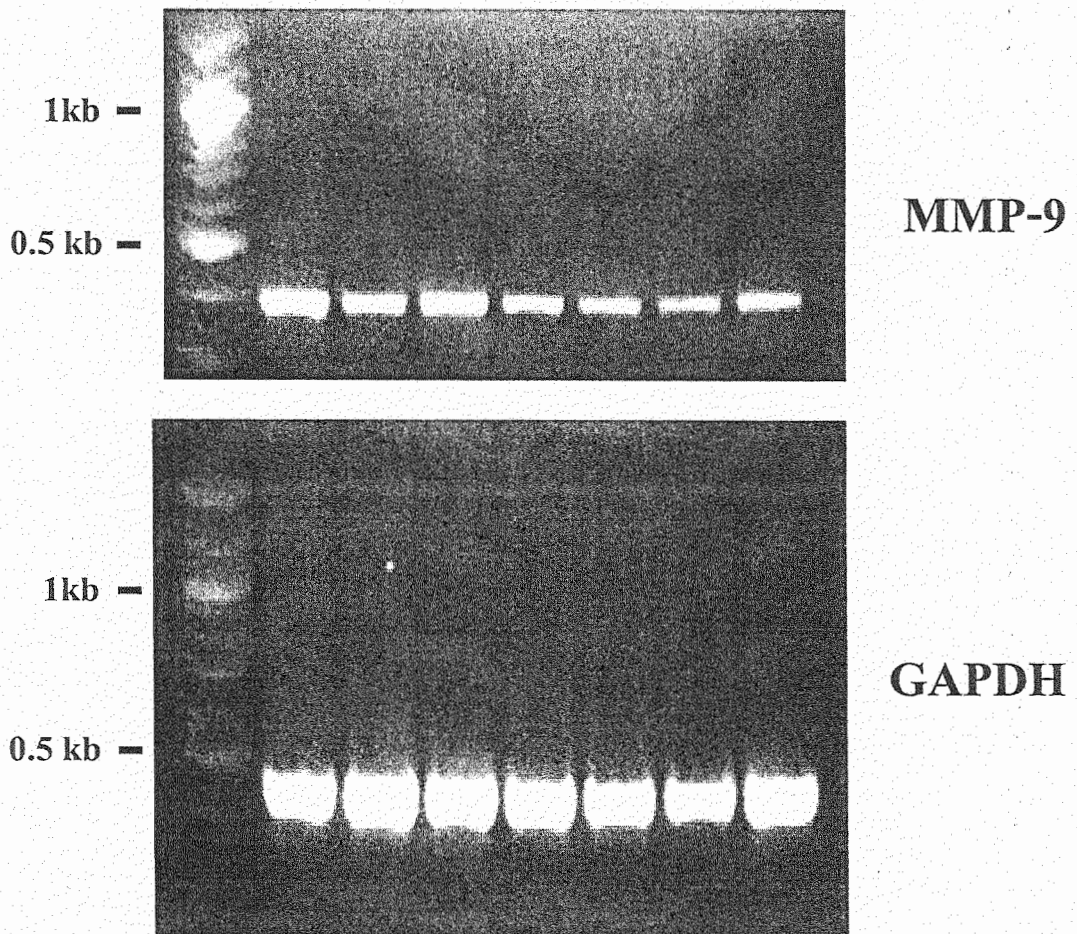


Figure 4. สารซิมวาสแตตินมีผลยับยั้งการถอดรหัสของจีนเอ็มเอ็มพี-9 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

A RT-PCR ส่วนของจีนเอ็มเอ็มพี-9 และ GAPDH ที่ถูกขยายสัญญาณและย้อมด้วย ethidium bromide
 B. ตารางแสดงความสัมพันธ์เป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน เอ็มเอ็มพี-9 เมื่อเปรียบเทียบกับจีน GAPDH

**Simvastatin reduces the level of MMP-9 mRNA
expression of U2-OS cell in time dependent manner (cont.)**

* P < 0.05

B.

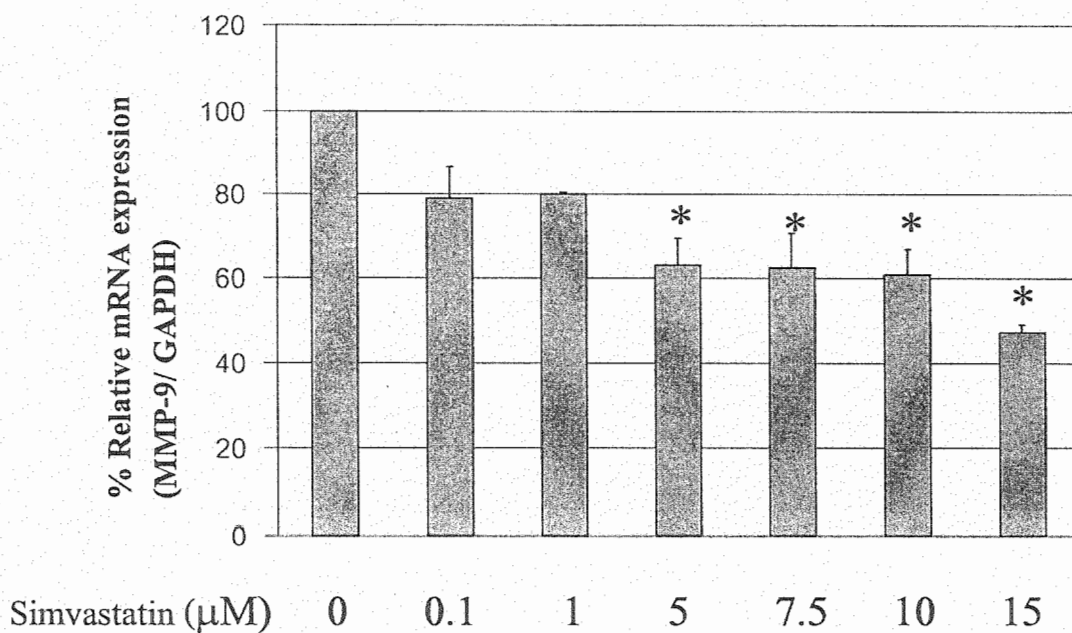


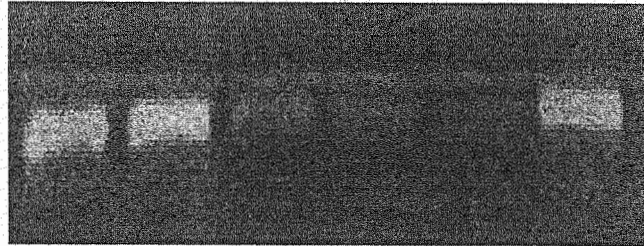
Figure 4. สารซิมวาสแตตินมีผลยับยั้งการถอดรหัสของจีนเอ็มเอ็มพี-9 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

B. ตารางแสดงความสัมพันธ์เป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีน เอ็มเอ็มพี-9 เมื่อเปรียบเทียบกับจีน GAPDH

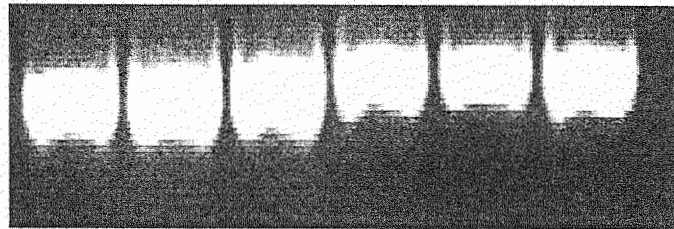
A.

Simvastatin (10 μ M)	-	+	+	+	+	-
Time (hour)	0	4	8	16	24	24

MMP-9

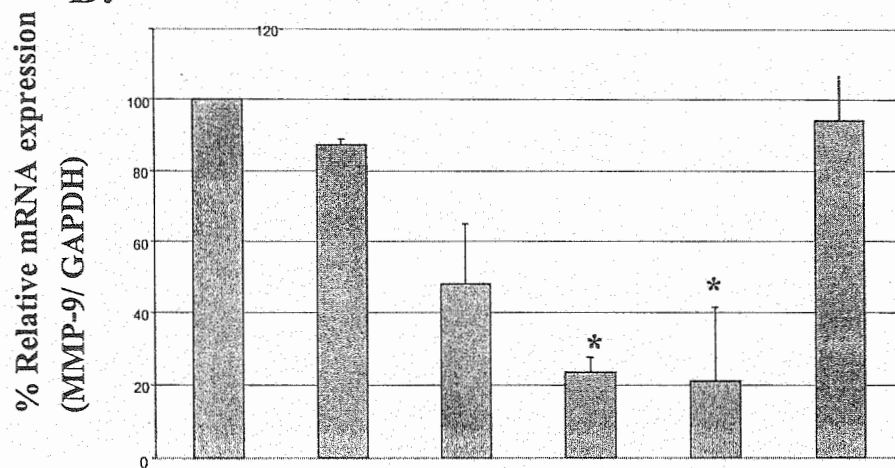


GAPDH



B.

* $P < 0.05$



Simvastatin (10 μ M)	-	+	+	+	+	-
Time	0	4	8	16	24	24

Fig.5 สารซิมวาสแตตินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์สามารถลดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น

A. ส่วนของจีนเอ็มเอ็มพี-9 และ GAPDH ที่ถูกขยายสัญญาณและย้อมด้วย ethidium bromide

B. ตารางแสดงความสัมพันธ์เป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของจีนเอ็มเอ็มพี-9 เมื่อเปรียบเทียบกับจีน GAPDH

Effect of simvastatin on the gelatinolytic activity and protein levels of enzyme MMP-9 in primary calvaria cells

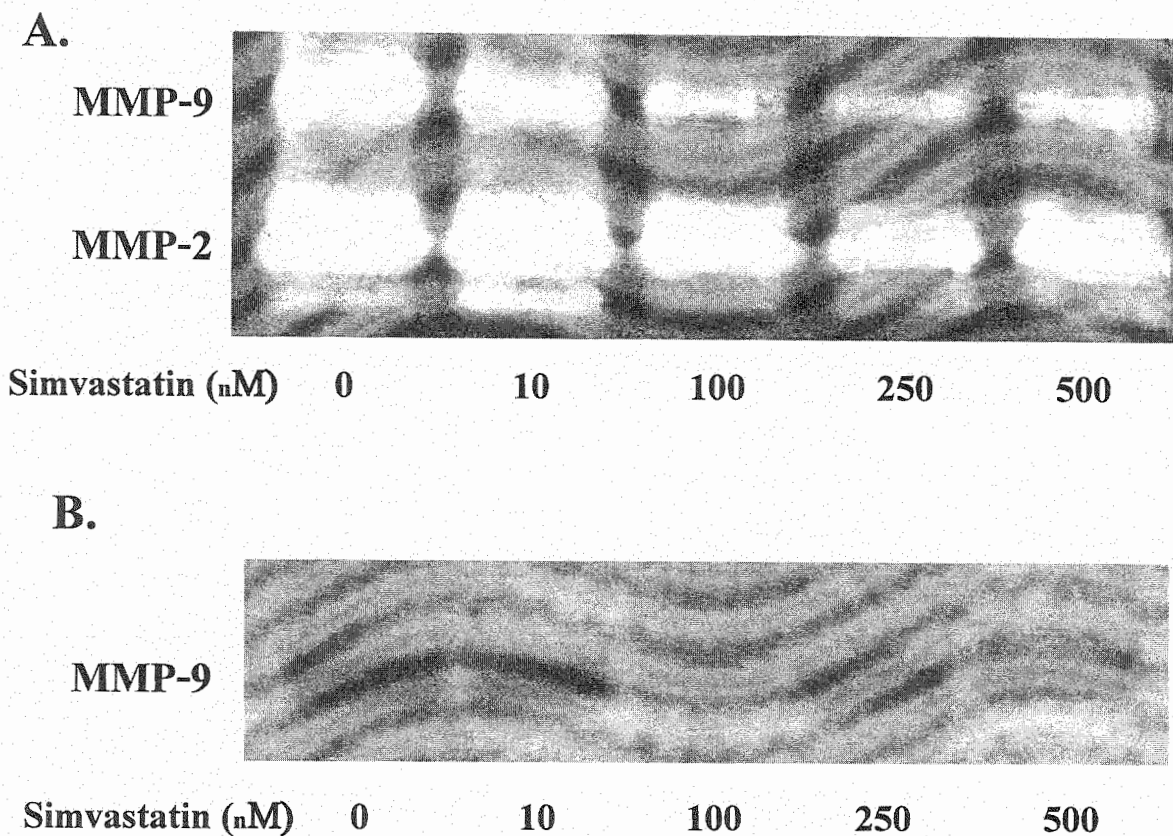


Figure 6 ผลของสารซิมวาสแตตินที่มีต่อระดับการทำงานและโปรตีนของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกแยกจากกะโหลกศีรษะของหนู

A. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และ -2 เมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

B. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่หลังออกจากเซลล์ เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี western blot

C. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์กับความเข้มของแถบโปรตีน ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ และวิเคราะห์ทางสถิติ โดยโปรแกรม ANOVA , Schffe's test. ที่ระดับ $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

**Effect of simvastatin on the gelatinolytic activity and protein levels of enzyme MMP-9 in primary calvaria cells
(cont.)**

C.

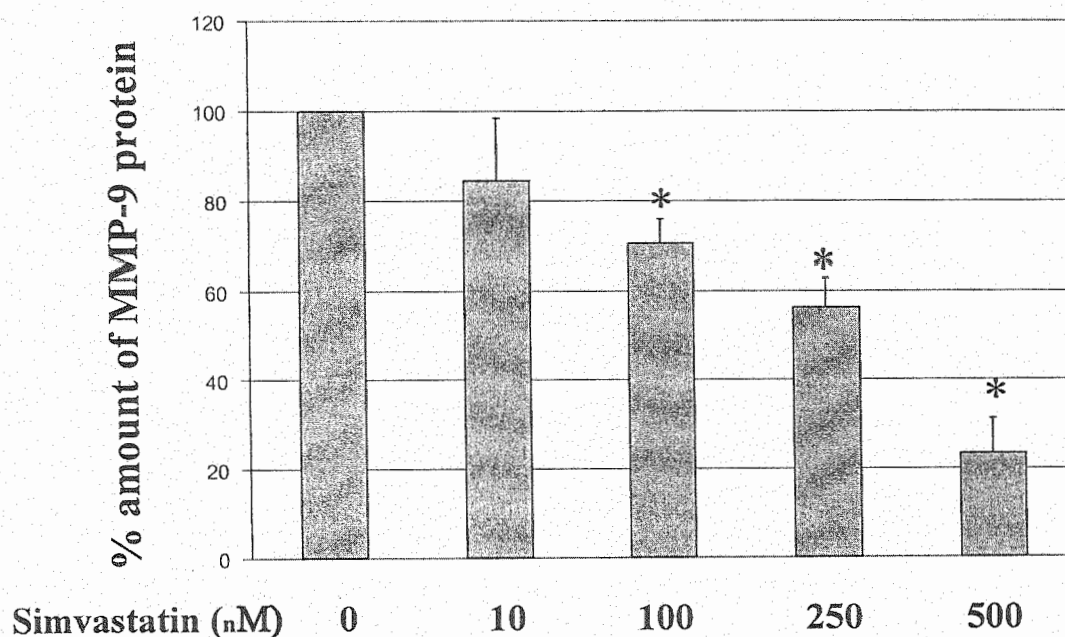


Figure 6 ผลของสารซิมวาสแตตินที่มีต่อระดับการทำงานและโปรตีนของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ในเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกแยกจากกะโหลกศีรษะของหนู

A. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 และ -2 เมื่อทดสอบด้วยสารซิมวาสแตตินตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

B. แสดงแถบของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-9 ที่หลั่งออกจากเซลล์ เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี western blot

C. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ความเข้มของแถบโปรตีน ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ และวิเคราะห์ทางสถิติ โดยโปรแกรม ANOVA, Schffe's test. ที่ระดับ $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ