รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ผลของเบตา-กลูแคนชนิดละลายจากเซรั่มน้ำยางพารา (*Hb*-SBG) ที่มีต่อกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ออสติโอบลาสต์

Effect of soluble *β*-glucan from *Hevea brasiliensis* latex (*Hb*-SBG) on osteoblast differentiation

ดร. ฐณะวัฒน์ พิทักษ์พรปรีชา
ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภทจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ SCI570530S

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภทดรุณาจารย์ ปีงบประมาณ 2557

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ผลของเบตา-กลูแคนชนิดละลายจากเซรั่มน้ำยางพารา (*Hb*-SBG) ที่มีต่อกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ออสติโอบลาสต์

(ภาษาอังกฤษ) Effect of soluble β-glucan from *Hevea brasiliensis* latex (*Hb*-SBG) on osteoblast differentiation

รายชื่อคณะผู้ดำเนินการวิจัย และ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย (%)

หัวหน้าโครงการวิจัย : ดร.ฐณะวัฒน์ พิทักษ์พรปรีชา

ตำแหน่ง พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)

คุณวุฒิ ปรด. (ชีวเคมี)

สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-288267 โทรสาร 074-446656

E-mail thanawat.psu@gmail.com

หน้าที่หรือความรับผิดชอบในโครงการ 100%

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย ตั้งแต่ สิงหาคม 2557-สิงหาคม 2559

ที่ปรึกษาโครงการ: ศาสตราจารย์ ดร. รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล

คุณวุฒิ Ph.D. (Biochemistry)

สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

ตำแหน่ง ศาสตราจารย์ระดับ 10

โทรศัพท์ 074-288266 โทรสาร 074-446656

E-mail rapepun.w@psu.ac.th

บทคัดย่อ

โรคกระดูกพรุนจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญเนื่องจากพบว่าอุบัติการณ์ (prevalence) และอัตราการเกิด (incidence) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามจำนวนประชากรผู้สูงอายุที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาและวิจัยเพื่อหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ออสติโอบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกระดูก ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาทดแทนยาที่มีผลข้างเคียงสูง และ เป็นทางเลือกในการรักษาหรือป้องกันโรคดังกล่าวต่อไป จากการศึกษาสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เช่น เบตา-กลูแคน (*β*-glucan) พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ออสติโอคลาสต์ซึ่งทำหน้าที่สลายกระดูก แต่ยังไม่มีรายงานถึงผลของสารดังกล่าวที่มีต่อเซลล์ออสติโอบลาสต์ ผู้ทำการวิจัยจึงได้ทำการทดสอบผลของสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เบตา-กลูแคนจากน้ำยางพารา *Hb*-SBG (*Hevea brasiliensis* soluble beta glucan) และน้ำตาลควิบราคคิทอลที่สกัดได้จากซีรั่มน้ำยางพารา ต่อเซลล์ดังกล่าว พบว่า *Hb*-SBG และ น้ำตาลควิบราค-คิทอล ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 µg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ออสติโอบลาสต์ ชนิด MC3T3-E1 อีกทั้งยังมีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการเจริญ (proliferation) ของเซลล์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อีกทั้งยังเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) จากการทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ดังกล่าวที่เวลา 7 วัน นอกจากนี้ *Hb*-SBG ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 µg/ml ยังสามารถเพิ่มปริมาณการเกิด mineralization ที่เวลา 14 วันเมื่อทดสอบด้วยการย้อมสี Alizarin red S (Alizarin red S staining) ส่วนน้ำตาลควิบราคคิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/ml สามารถเพิ่มปริมาณการเกิด mineralization ได้สูงสุด ทั้งที่เวลา 14 และ 21 วัน

ผลการทำ Quantitative RT-PCR เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ออสติโอบลาสต์ และ กระบวนการสร้างกระดูกได้แก่ ยีน osteocalcin, osteopontin, Runt-related transcription factor-2, alkaline phosphatase, Bone morphogenetic protein-2 และ collagen type 1 พบว่า *Hb*-SBG มีผลลดการแสดงออกของยีนเหล่านั้นในช่วงแรกที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น แต่จะกระตุ้นให้การแสดงออกของยีนกลับมาเป็นปกติที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 1 µg/ml ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน osteopontin ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่น้ำตาลควิบราคคิทอลสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน osteocalcin, osteopontin, Runt-related transcription factor-2 และ alkaline phosphatase อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24 ชั่วโมง และ เพิ่มการแสดงออกของยีน collagen type 1 อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ยังส่งผลเพิ่มการแสดงออกของยีน Bone morphogenetic protein-2 ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 3 เท่า และ 10 เท่าที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารทั้งสองสำหรับนำไปใช้เพื่อเสริมการรักษา ป้องกัน โรคกระดูกพรุน หรือประยุกต์ใช้สำหรับเหนี่ยวนำกระบวนการสร้างกระดูกในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

Abstract

The aim of this study is to investigate the effect of carbohydrates, soluble β-glucan (*Hb*-SBG) and quebrachitol, extracted from *Hevea brasiliensis* latex to osteoblastic proliferation and differentiation. The result obtained from MTT assay at 24 and 48 hour indicated that *Hb*-SBG and quebrachitol are not only no cytotoxic to osteoblastic MC3T3-E1 cells, but also increase the proliferation of the cells in the concentration ranging from 0.0001 to 1,000 μg/ml. In addition, there also increase a biochemical marker of osteoblastic differentiation, alkaline phosphatase activity, at 24 hour. Mineralization was assessed by visualized Alizarin red S staining of calcium deposit after incubated cells with *Hb*-SBG and quebrachitol for 14 and 21 days. The result shown that calcium deposit are markedly increase at both 14 and 21 day after treatment with 0.1 and 1 μg/ml of quebrachitol and significantly increase at 14 day after treatment with 0.001, 0.01, 0.1 and 1 μg/ml of *Hb*-SBG.

Furthermore, effect of *Hb*-SBG and quebrachitol to osteoblastic cell differentiation were also evaluated the expression of early stage (collagen type 1 and alkaline phosphatase), middle stage (osteopontin), late stage (osteocalcin) and key regulator (Bone morphogenetic protein-2 and Runt-related transcription factor-2) gene with quantitative RT-PCR. The analysis revealed that *Hb*-SBG transient suppressed the early expression of those genes at 24 hours and then turn to normal level at 72 hours. However, 1 μg/ml of *Hb*-SBG substantially increased the expression of osteopontin gene. On the other hand, quebrachitol has no suppressive activity to those gene expressions but significantly increase the expression of osteocalcin, osteopontin, Runt-related transcription factor-2 and alkaline phosphatase genes at 24 hours and collagen type 1 gene at 72 hours. Moreover, quebrachitol was especially increase the expression of Bone morphogenetic protein-2, which plays a crucial role in the transduction of osteoblastic differentiation and bone formation, with the expression level about 3 and 10 times higher than control at 24 and 72 hours, respectively.

These results demonstrate that both *Hb*-SBG and quebrachitol have a potential to promote osteoblastic cell proliferation and differentiation, thereby possibly further use as an agent promoting bone-forming osteoblastogenesis for bone tissue engineering or as a nutraceutical agent against osteoporosis.