Thesis Title Effects of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Gene Deletion and Phytochemicals on Cartilage Development and Deterioration

Author Miss Kanyamas Choocheep

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Advisor
Prof. Dr. Hideto Watanabe	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai	Co-advisor
Dr. Peraphan Pothacharoen	Co-advisor

ABSTRACT

Versican/PG-M is a large chondroitin sulfate proteoglycan in the extracellular matrix, which is transiently expressed in mesenchymal condensation areas during tissue morphogenesis. Here, versican conditional knockout mice *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$, in which *Vcan* was pruned out by site-specific Cre recombinase driven by *Prx1* promoter were generated. Although *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ mice were viable and fertile, they developed distorted digits. Histological analysis of newborn mice revealed hypertrophic chondrocytic nodules in cartilage, tilting of the joint and a slight delay of chondrocyte differentiation in digits. By immunostaining, whereas the joint interzone of *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{+/+}$ showed an accumulation of TGF-β, concomitant with versican, that of *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ without versican expression exhibited a decreased incorporation of TGF-β. In a micromass culture system of mesenchymal

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cells from limb bud, whereas TGF-β and versican were co-localized in the perinodular regions of developing cartilage in *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{+/+}$, TGF-β was widely distributed in *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$. These results suggested that versican facilitates chondrogenesis and joint morphogenesis, by localizing TGF-β in the extracellular matrix and regulating its signaling. The failure of joint morphogenesis which found in conditional deletion of versican might later make mice suffer from joint anomaly as seen in human joint diseases.

Taking into consideration, rheumatoid arthritis (RA) is one of the common joint diseases that primarily affects the joints and results in the progressive destruction of articular structures, particularly cartilage and bone. Synovial fibroblasts (SFs) in the most superficial lining layer of the hyperplastic RA synovium have been indicated to play an important role in the pathogenesis of RA. During the pathological events in RA, the activated synovial fibroblasts in the lining layer of the synovial membrane invade deeply into the articular cartilage and bone, and release several cytokines or matrix metalloproteinases (MMPs) that in turn contribute to cartilage deterioration and joint destruction. Reportedly, several studies have indicated that *A. galanga* has a potential anti-rheumatic activities, however, the precise action of the extract on arthritic diseases is not yet fully understood. Hence, the inflammatory model was independently established as a clinical study for investigation the effects of *A. galanga* extracts on the expression of genes involved in catabolic activities in an IL-1β-induced human SFs. In this model, primary human synovial fibroblasts were treated for 24 h with *A. galanga* hexane extracts in the presence of recombinant human IL-1β. MMPs in the culture medium were monitored by gelatin zymography. Total RNA was isolated from the cell lysate and analyzed by semi-quantitative RT-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

PCR. After treatment with *A. galanga* extract fraction 4, MMP-2 activity in the culture medium was significantly decreased. In addition, MMP-1, MMP-3, MMP-13, and Cox-2 expression were down-regulated by 10 μg/ml that of the fraction. These data suggested that the decrease of gene expression and production of MMPs in synovial fibroblasts against inflammatory stimuli could be due to the effects of the *A. galanga* extract fraction 4. Therefore, fraction 4 of *A. galanga* extracts may contain some active compounds which could be worth as anti-arthritic agent.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของการขาดหายไปของยีนคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลแคนและผลของสารพฤกษเคมีต่อการเจริญและการเสื่อมของกระดูกอ่อน

ผู้เขียน นางสาวกันยามาส ชูชีพ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Hideto Watanabe	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. พีรพรรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เวอร์ซิแคนหรือ พีจี-เอ็ม เป็นคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลแคน ซึ่งพบได้ในองค์ประกอบภายนอกเซลล์ และพบว่ามีการแสดงออกเพียงชั่วคราวในบริเวณที่มีการกระชับของกลุ่มเซลล์ mesenchymal ในระหว่างการพัฒนาโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาหน้าที่ของเวอร์ซิแคนในช่วงเวลาดังกล่าวจึงได้ทำการตัดยีนเวอร์ซิแคนออกด้วยเทคนิค Cre/*LoxP* recombination ภายใต้พีอาร์เอ็กซ์วัน (*Prx-1*) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่จำเพาะ ส่งผลให้มีการตัดยีนเวอร์ซิแคนออกไปตามสภาวะและเนื้อเยื่อที่จำเพาะได้ หนูที่ถูกตัดยีนเวอร์ซิแคนออกไปเรียกว่าหนู*Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ แม้หนู *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ มีชีวิตรอดและสืบพันธุ์ได้ตามปกติแต่พบพัฒนาการนิ้วเท้าที่มีลักษณะคดผิดปกติ เมื่อวิเคราะห์ชิ้นเนื้อของหนู *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ แรกเกิดทำให้ทราบว่าการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คดของนิ้วในบริเวณดังกล่าวเกิดจากการรวมกลุ่มของคอนโดรซัยต์ชนิดไฮเปอร์โทรฟิคในกระดูกอ่อนและส่งผลให้มีการเอียงของข้อต่อรวมถึงเซลล์ในบริเวณนั้นมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์คอนโดรซัยต์ได้ช้าลง เมื่อทำการย้อมด้วยวิธีทางอิมมิวโนพบว่าบริเวณที่จะกลายเป็นข้อต่อของหนูกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกเวอร์ซิแคนร่วมกับทีจีเอฟเบต้า (TGF-β) แต่ไม่พบการแสดงออกดังกล่าวในหนู *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ นอกจากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ mesenchymal จากระยางค์อ่อนในระบบขนาดเล็กและมีจำนวนมาก (micromass) พบว่าทีจีเอฟเบต้าและเวอร์ซิแคนในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกในบริเวณ perinodular เดียวกัน แต่ในหนู *Prx1*-Cre/*Vcan*$^{flox/flox}$ พบการแสดงออกของทีจีเอฟเบต้าเป็นบริเวณกว้าง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เวอร์ซิแคนช่วยให้เซลล์ mesenchymal พัฒนาไปเป็นเซลล์คอนโดรซัยต์และช่วยในการพัฒนาของข้อต่อโดยจับกับทีจีเอฟเบต้าไว้ในองค์ประกอบนอกเซลล์ รวมทั้งควบคุมการส่งสัญญาณของทีจีเอฟเบต้าเข้าสู่ภายในเซลล์ ในหนูที่ถูกตัดยีนเวอร์ซิแคนออกไปทำให้ไม่สามารถพัฒนาข้อต่อได้ตามปกติจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มันได้รับผลกระทบจากความผิดปกตินี้ในภายหลังเช่นเดียวกับที่พบในโรคข้อของมนุษย์

ข้ออักเสบรูมาตอยด์เป็นโรคข้อที่มีอุบัติการณ์สูง พยาธิสภาพของโรคเริ่มจากการอักเสบของข้อต่อจนส่งผลให้มีการทำลายกระดูกอ่อนหุ้มข้อและกระดูกได้ในภายหลัง เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อซึ่งพบในชั้นผิวนอกของเยื่อหุ้มข้อ ถูกชี้บ่งว่าเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินไปของโรค โดยเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อที่ถูกกระตุ้นในบริเวณเยื่อหุ้มข้อจะลุกลามไปทำลายกระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อและกระดูก โดยการปล่อยไซโตไคน์และเอนไซม์ metrix metalloproteinases (MMPs) ประกอบกับมีรายงานถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของข้อรูมาตอยด์จากสารสกัดของข่า (*A. galanga*) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดในฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังนั้นจึงสนใจที่จะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ศึกษาในลักษณะที่เป็นแบบจำลองทางคลินิก โดยศึกษาผลของสารสกัดพฤกษเคมีที่ได้จากข่าต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกอ่อน ในรูปแบบการทดลองครั้งนี้ เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์จะถูกเลี้ยงในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า (IL-1β) ร่วมกับการใส่สารพฤกษเคมีที่ได้จากข่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ MMPs ซึ่งหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี gelatin zymography ส่วนอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองด้วยข่า fraction 4 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 μg/ml พบว่าทำให้กัมมันตภาพของเอนไซม์ MMP-2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ลดลง และยังพบการแสดงออกของยีน MMP-1, MMP-3, MMP-13 และ Cox-2 ลดลงอีกด้วย จึงสรุปได้ว่าการลดลงของเอนไซม์เหล่านี้น่าจะเป็นผลมาจากฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีในข่า fraction 4 ดังนั้นสารพฤกษเคมีจากข่าดังกล่าวจึงอาจมีสารออกฤทธิ์ซึ่งสามารถใช้เป็นสารต้านโรคข้ออักเสบได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved