

**Thesis Title** Effect of Transforming Growth Factor Beta-1 on Hyaluronan Synthase -2 Gene Expression and Hyaluronan Synthesis in Equine Chondrocyte Culture

**Author** Miss Oraphan Somnoo

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai

Advisor

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelet

Co-advisor

Dr. Peraphan Pothacharoen

Co-advisor

Dr. Siriporn Peansukmanee

Co-advisor

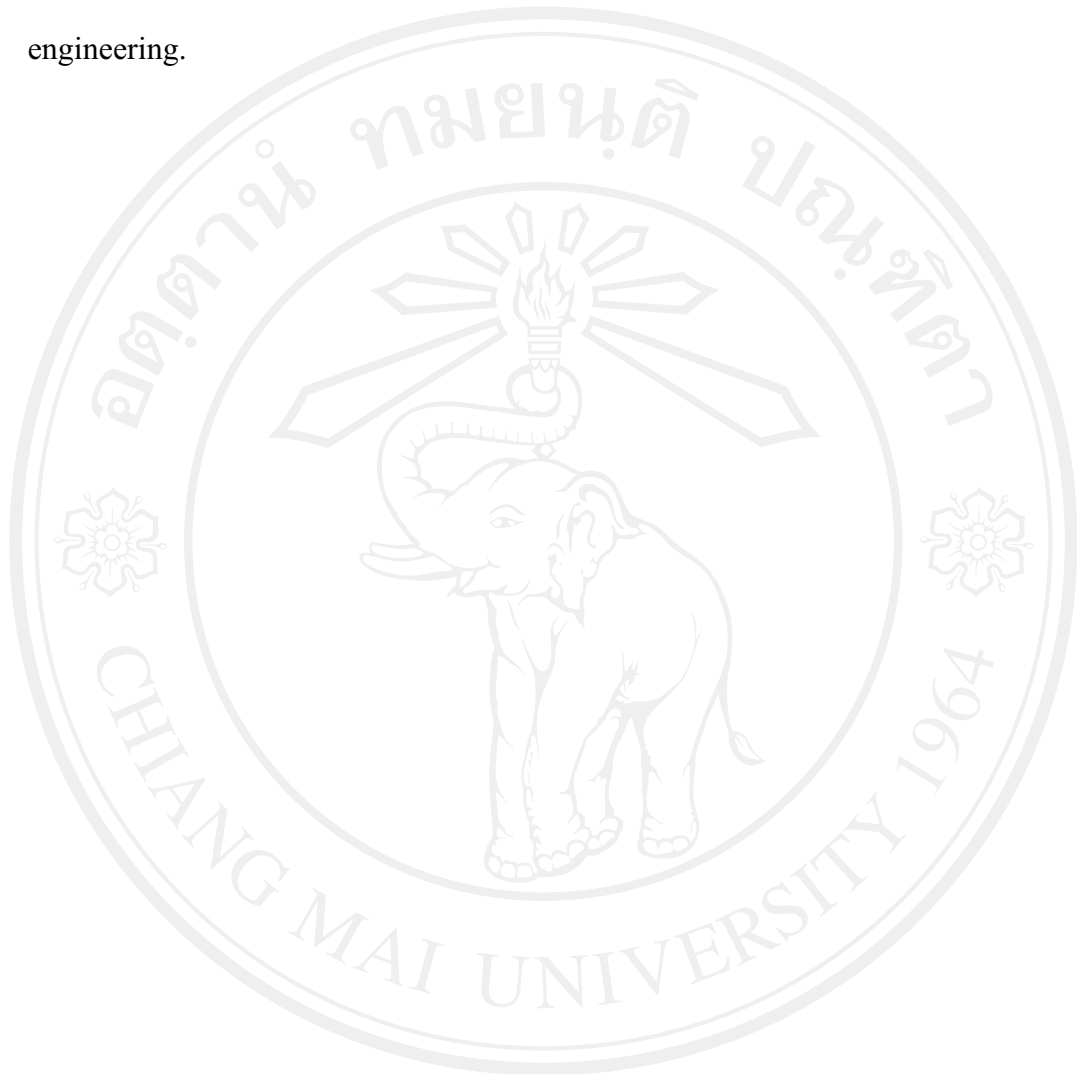
**ABSTRACT**

Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) is a growth factor that commonly used in cartilage tissue engineering to stimulate synthesis of cartilage matrix biomolecules in chondrocytes such as aggrecan and type II collagen. Hyaluronan (HA) is one of cartilage molecule which plays the important role in tissue formation and growth. Nevertheless, effect of TGF- $\beta$ 1 on hyaluronan synthase-2 (HAS-2) dependent HA synthesis in equine chondrocytes has not been reported. Therefore, we are interested in studying the effects of TGF- $\beta$ 1 on the HAS-2 mRNA expression and HA synthesis in monolayer culture and 3-dimensional culture of equine chondrocyte.

The primary equine chondrocytes were prepared from cartilage of fetlock joints with no degenerative lesion. They were cultivated as monolayer system in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% FCS and TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml). They were also cultivated as 3-dimensional system using gelatin based scaffold (Spongostan standard, Johnson & Johnson) in chondrogenic media with or without TGF- $\beta$ 1 (10.0 ng/ml). Cell proliferation was evaluated using the Alamar blue assays. HA level in the medium and the constructs were analyzed by ELISA based technique. The expression level of HAS-2 mRNA induced by TGF- $\beta$ 1 was evaluated using semi-quantitative RT-PCR. HA and proteoglycans formation of chondrocytes embedded scaffolds were examined by immunohistochemistry for HA and alcian blue staining, respectively. The result showed that TGF- $\beta$ 1 significantly enhanced HA synthesis and HAS-2 mRNA expression in equine monolayer culture in dose-dependent manner. HAS-2 mRNA expression was highest enhanced at the third hour of stimulation, when concentrations of TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) did not significantly affected to cell proliferation in monolayer cultured equine chondrocytes. In 3-dimensional cultures, TGF- $\beta$ 1 significantly enhanced HA and proteoglycans synthesis investigated in condition media and cultured construct. After 14 and 21 days of cell culture, cell proliferation was significantly lower in chondrocytes treated with TGF- $\beta$ 1 when compared to the untreated control. The histological and immunohistochemical analysis clearly demonstrated the layer of ECM at the surface of the scaffold in the construct cultured with TGF- $\beta$ 1.

The molecular analysis results suggested that TGF- $\beta$ 1 stimulated HAS-2 mRNA expression and promoted HA synthesis in monolayer equine chondrocytes culture. In addition, it also promoted HA and glycosaminoglycans synthesis in 3-D

cultures using gelatin based scaffold, which may involve in the development of cartilage tissue. Thus, these data are useful for the application in cartilage tissue engineering.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** ผลของทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ บีตา-1 ต่อการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส-2 และการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนนในเซลล์กระดูกอ่อนม้าเพาะเลี้ยง

**ผู้เขียน** นางสาวอรพรรณ สมหนู

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

สัตวแพทย์หญิง ดร. ศิริพร เพียรสุขมณี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

**บทคัดย่อ**

ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ บีตา-1 (TGF- $\beta$ ) เป็นโกรทแฟกเตอร์ ที่ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อนเพื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนให้สังเคราะห์สารชีวโมเลกุลของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เช่น aggrecan และ type II collagen ไฮยาลูโรแนน (Hyaluronan : HA) เป็นสารชีวโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งของกระดูกอ่อนที่มีความสำคัญต่อการสร้างและพัฒนาของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการสังเคราะห์ HA ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส-2 (HAS-2) ในเซลล์กระดูกอ่อนของม้า จึงสนใจศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการแสดงออก

ของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส-2 และการสังเคราะห์ HA ในเซลล์กระดูกอ่อนม้าเพาะเลี้ยงแบบโมโนเลเยอร์และแบบสามมิติ โดยแยกเซลล์กระดูกอ่อนของม้าจากชิ้นกระดูกอ่อนบริเวณข้อของม้าซึ่งไม่มีร่องรอยของการเป็นโรคข้อเสื่อม จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของม้าแบบโมโนเลเยอร์ในอาหารเซลล์ที่มี FCS อยู่ 10% และ TGF- $\beta$ 1 อยู่ในความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) นอกจากนี้ เซลล์กระดูกอ่อนยังถูกเพาะเลี้ยงแบบสามมิติในโครงร่างค้ำจุนเจลาตินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มี TGF- $\beta$ 1 (10.0 ng/ml) วัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธี alamar blue วัดปริมาณของ HA ในอาหารเลี้ยงเซลล์และชิ้นกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงด้วยวิธี ELISA technique วัดการแสดงออกของยีน HAS-2 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR การสังเคราะห์ HA และโปรตีนโอกลัยแคน ในชิ้นกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงถูกทดสอบโดยการย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry และ ย้อมด้วย alcian blue ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 เพิ่มการสังเคราะห์ HA และการแสดงออกของยีน HAS-2 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนแบบโมโนเลเยอร์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และการกระตุ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 ที่ใช้ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน HAS-2 สูงสุดหลังจากถูกกระตุ้นแล้วสามชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 (0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml) ที่ใช้ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงแบบโมโนเลเยอร์ ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบสามมิตินั้นพบว่า TGF- $\beta$ 1 เพิ่มการสังเคราะห์ HA และโปรตีนโอกลัยแคน ทั้งในอาหารเซลล์และในชิ้นกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงร่างค้ำจุนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TGF- $\beta$ 1 เมื่อครบ 14 และ 21 วันของการเพาะเลี้ยง พบว่าต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งไม่มี TGF- $\beta$ 1 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผลจากการทดสอบด้วยการย้อมสีในโครงร่าง

ค้ำจุนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TGF- $\beta$ 1 ยังแสดงให้เห็นชั้นของ ECM ซึ่งอยู่รอบๆ โครงร่างค้ำจุนได้อย่างชัดเจน

จากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 กระตุ้นการแสดงออกของยีน HAS-2 และสนับสนุนการสังเคราะห์ HA ในเซลล์กระดูกอ่อนม้าที่เลี้ยงแบบโมโนเลเยอร์ และเช่นเดียวกันในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในโครงร่างค้ำจุนเจลาตินสามมิตินั้น TGF- $\beta$ 1 ยังช่วยในการสังเคราะห์ HA และโปรตีนโอกลัยแคน ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนให้สมบูรณ์ ข้อมูลจากการทดลองนี้จึงเป็นประโยชน์พื้นฐานสำคัญสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนต่อไป