

บทบาทของฟิบูลิน-3 ต่อการสร้างสารประกอบภายนอกเซลล์

ธนิตา พิทักษ์อรณพ^{1*}, บุรินทร์ บุณศรี¹, วารณี ประดิษฐ์², กิตติศักดิ์ พุทธชาติ², กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์¹

¹ห้องปฏิบัติการวิจัยกระดูกและข้อในสัตว์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ เซลล์กระดูกอ่อนจัดเป็นส่วนประกอบสำคัญของกระดูกอ่อน ซึ่งในสภาวะปกติการสร้างและการสลายของเซลล์กระดูกอ่อนจะถูกควบคุมด้วยโปรตีน และฮอร์โมน โดยโปรตีนจะเป็นตัวควบคุมให้เกิดการสร้างและการสลายของเซลล์ | แต่หากเกิดความผิดปกติในการสร้างและการสลายของเซลล์ ก็จะส่งผลให้เกิดโรค เช่น โรคข้อเสื่อมที่มักพบในมนุษย์ และสัตว์ที่มีอายุมาก บทความนี้จึงให้ความสนใจโปรตีนฟิบูลิน-3 (Fibulin-3) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อน เมื่อมีการหลั่งของโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งของกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงสามารถนำโปรตีนฟิบูลิน-3 มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงอัตราของการเกิดโรคข้อเสื่อมที่จะเกิดขึ้นได้ เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2557; 12(3): 201-207

คำสำคัญ : ฟิบูลิน3 เซลล์กระดูกอ่อน กระดูกอ่อน

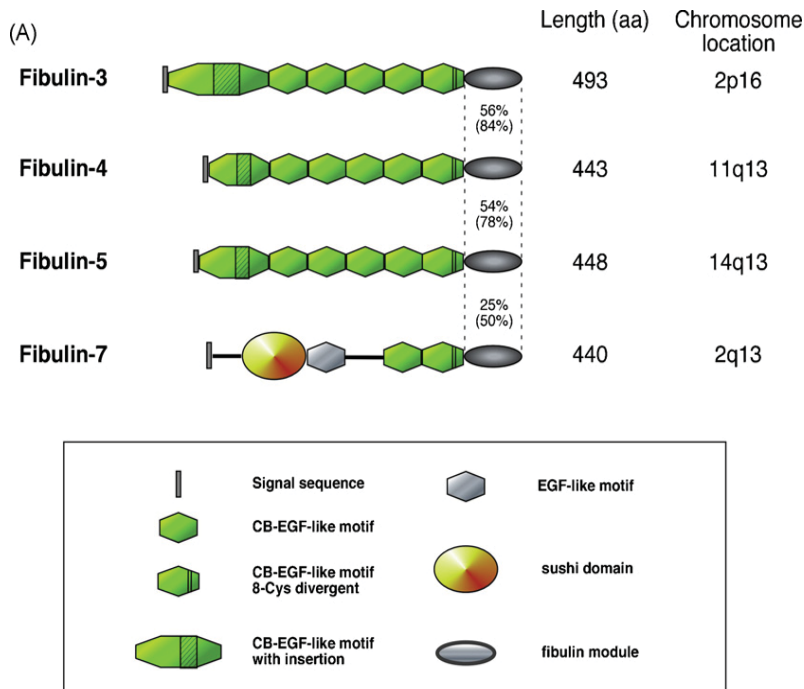
ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : ธนิตา พิทักษ์อรณพ, ห้องปฏิบัติการวิจัยกระดูกและข้อในสัตว์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหิยะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100, E-mail address: pitakarnnop.t@gmail.com ได้รับบทความ วันที่ 5 ธันวาคม 2556

บทนำ

จากการศึกษาค้นคว้ามาจนถึงปัจจุบันพบว่า โปรตีนฟิบูลินมีสมาชิกด้วยกันทั้งหมด 7 ตัว และถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม (class) โดยใช้ความยาวของโครงสร้างเป็นตัวจัดแบ่ง (Yanagisawa, Schluterman, & Brekken, 2009) และกลุ่มที่จะทำการกล่าวถึงในครั้งนี้ ได้แก่ ฟิบูลินสายสั้น ซึ่งประกอบไปด้วยฟิบูลิน-3 (fibulin-3), ฟิบูลิน-4, ฟิบูลิน-5 และฟิบูลิน-7 (รูปที่ 1) ฟิบูลิน-3 ถูกพบว่ามีารแสดงออกของยีนที่มากผิดปกติ ครั้งแรกในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ของมนุษย์ที่เป็นโรค Werner syndrome (Lecka-Czernik, Lumpkin, & Goldstein, 1995) ในขณะที่ฟิบูลิน-4 พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับภาวะการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ การเพิ่ม

จำนวนเซลล์ รวมทั้งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง (oncogenic activity) (Gallagher et al., 1999., Giltay, Timpl, & Kostka, 1999; Heine, Delude, Monks, Espevik, & Golenbock, 1999) ส่วนฟิบูลิน-5 พบว่าการหลั่งของโมเลกุลมีความเกี่ยวข้องกับการที่หลอดเลือดหัวใจมีการพัฒนา และการสร้างตัวใหม่ (remodeling) ของหลอดเลือด (Kowal, Richardson, Miano, and Olson 1999; Nakamura et al., 1999) และ ฟิบูลิน-7 ซึ่งเป็นสมาชิกใหม่ของกลุ่ม แต่มีลักษณะของโครงสร้างหลักที่ค่อนข้างแตกต่างออกไปจากฟิบูลินสายสั้นตัวอื่นๆ ซึ่งโครงสร้างหลักของ ฟิบูลิน-7 นี้ จะประกอบไปด้วยซูชิโดเมน (Sushi domain) ในปลายด้านเอ็น (N-terminal) และบางครั้งสามารถพบได้ในโปรตีน

ที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดลิ้มเลือด ซึ่งมีรูปแบบ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิบูลินตัวอื่นๆ (Susana de Vega คล้ายกับโปรตีนที่จับกับแคลเซียม (calcium binding et al., 2007) EGF; cbEGF) ที่มีระดับของแคลเซียมที่มากเกินไปกว่าปกติ



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของฟิบูลินสายสั้นในมนุษย์ ซึ่งประกอบไปด้วย ฟิบูลิน-3, ฟิบูลิน-4, ฟิบูลิน-5 และฟิบูลิน-7 ที่แสดงลักษณะโครงสร้างจำเพาะของฟิบูลินแต่ละตัวที่จับกับปลายด้าน C (C-terminal)(Yanagisawa & Davis, 2010)

บทบาทหน้าที่ของฟิบูลินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เส้นใยอีลาสติก (Elastic fiber; EF) เป็นส่วนประกอบที่พบมากในสารประกอบที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix; ECM) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีคุณสมบัติเกี่ยวกับการยืดและหดตัวของเนื้อเยื่อเส้นใยอีลาสติกประกอบด้วยสองส่วน คือโครงสร้างของฟิบริลลาร์ (fibrillar) ที่รู้จักกันในชื่อ ไมโครไฟบริล (microfibril; MF) ซึ่งเกิดจากการต่อสายของกลัยโคโปรตีน (glycoprotein)

ฟิบูลินรวมตัวกับแกนของอีลาสติน (elastin) ที่มีรูปร่างที่ไม่แน่นอนส่วนที่สองคือโทรโปอีลาสติน (tropoelastin) โดยไมโครไฟบริลจะมีการเชื่อมกับโพลีเมอร์ของโทรโปอีลาสติน (Wagenseil & Mecham, 2007) ทำให้การรวมตัวกัน และเพื่อให้เกิดโครงสร้างที่ซับซ้อน จึงมีความจำเป็นต้องใช้โปรตีนภายใน (integral proteins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ในชั้นไขมัน เนื่องจากโมเลกุลมีความยืดหยุ่น จึงทำให้น้ำ และไอออนของสารสามารถผ่านได้ ถือได้ว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ นอกจากนี้

ยังมีโปรตีนร่วม (associated proteins) อื่นๆ ที่มีความเกี่ยวข้องอีกเป็นจำนวนมาก โดยมีจำนวนมากกว่า 35 องค์ประกอบ (Kielty, Sherratt, & Shuttleworth, 2002) ในที่นี้รวมถึงฟิบูลิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (Kielty et al., 2002)

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ในกลุ่มเมตาโซน (Metazoans)(Putnam et al., 2007; Reber-Müller, Spissinger, Schuchert, Spring, & Schmid, 1995) พบว่ามีโปรตีนฟิบูลินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญส่วนหนึ่งของไมโครไฟบริล โดยที่ไมโครไฟบริลจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการหดตัวของเนื้อเยื่อถือเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่งของการมีวิวัฒนาการจากสัตว์ที่แต่เดิมยึดเกาะอยู่กับโขดหิน ไม่มีการเคลื่อนที่ เช่น ฟองน้ำ (sessile animals) จนกระทั่งกลายเป็นสัตว์ที่สามารถว่ายน้ำได้ (Reber-Müller et al., 1995) เช่น สัตว์ในกลุ่มแมงกะพรุน (Reber-Müller et al., 1995) แมลง (Bussiere, Wright, & DeMont, 2006) และสัตว์ในกลุ่มหอยหมีก (Shadwick, 1999)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจากจะพบว่ามีส่วนประกอบของโปรตีนฟิบูลินในไมโครไฟบริลที่เป็นส่วนช่วยในการหดตัวของเนื้อเยื่อแล้ว ยังมีส่วนช่วยในระบบไหลเวียนโลหิตที่เป็นระบบปิด และการทำงานของหัวใจ (Faury, 2001) โดยมีหัวใจที่เต้นเป็นจังหวะได้จากการที่เส้นใยอีลาสติกที่ทำให้เกิดการยืดหยุ่นของหลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าฟิบูลินเป็นโปรตีนในกลุ่มของ secreted glycoproteins ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 50–200 กิโลดาลตัน และมีรูปร่างถึงเจ็ดแบบด้วยกัน (Argraves, Greene, Cooley, & Gallagher, 2003; S de Vega, Iwamoto, & Yamada, 2009; Timpl, Sasaki, Kostka, & Chu, 2003) โดยโครงสร้างของฟิบูลิน (FBLNs) ประกอบไปด้วย 3 โดเมน ได้แก่ บริเวณปลายด้าน N หรือโดเมนที่ 1 (domain I) อยู่ด้านหน้า และมีการเรียงตัวของลำดับเบสที่ซ้ำกันของโปรตีนตัวที่จับกับแคลเซียม (tandem array of calcium-binding EGF; cbEGF) ที่มีจำนวนที่ผันแปรได้หรือโดเมนที่ 2 (domain II)

นอกจากนี้ยังมีส่วนปลายด้าน C (C-terminal) เรียกว่า ฟิบูลินไลค์ (fibulin-like) หรือ FC domain เป็นโดเมนที่ 3 (domain III)(Argraves et al., 2003; S de Vega et al., 2009; Timpl et al., 2003)

การศึกษาบทบาท และหน้าที่ของฟิบูลิน-3 ต่อเซลล์กระดูกอ่อน

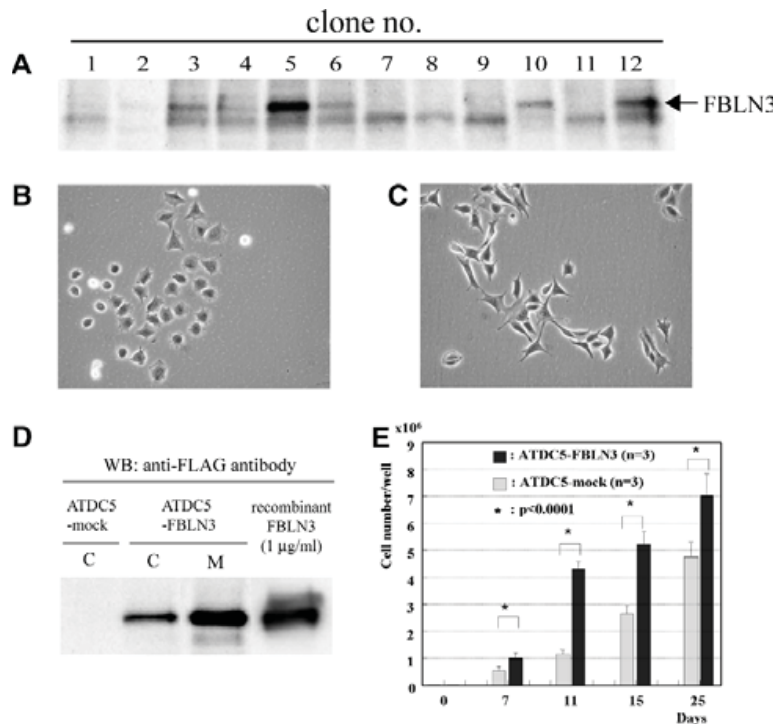
มีการศึกษาผลในเชิงลบของโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อน (Wakabayashi et al., 2010) โดยการเลี้ยงเซลล์ ATDC5 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีอินซูลิน (insulin) เป็นส่วนประกอบ โดยที่อินซูลินนี้จะไปมีผลทำให้เซลล์ ATDC5 ที่แต่เดิมเป็นเซลล์คอนโดโรเจนิค (chondrogenic cell) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (Shukunami et al., 1996) เมื่อได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อนตามที่ต้องการแล้ว จึงทำการ transfection โดยใช้เวกเตอร์ (vector) เป็นตัวช่วยเพื่อให้ฟิบูลิน-3 สามารถจับกับตัวเซลล์ได้ สำหรับตัวควบคุม (control) ที่ใช้ในการเปรียบเทียบครั้งนี้ ทำการ transfection เวกเตอร์เข้าไปเช่นกัน เพียงแต่ไม่มีการใส่ฟิบูลิน-3 เข้าไปด้วย ตัวควบคุมดังกล่าว จะอยู่ในรูปของสับโคลน (subclone) ATDC5-mock สับโคลนที่ได้รับการ transfection เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต (Western blot) และทำการย้อมสีด้วยอัลเซียนบลู (Alcian blue) เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเซลล์

ผลที่ได้หลังจากการนำสับโคลนจำนวนทั้งหมด 12 สับโคลน พบว่ามีสับโคลน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 5, 10 และ 12 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มากกว่าปกติ (ATDC5-FBLN3) (รูปที่ 2A) และเมื่อนำ ATDC5-mock มาเปรียบเทียบกับสับโคลน ATDC5-FBLN3 ที่ได้จาก 3 ตำแหน่งข้างต้น เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ATDC5-FBLN3 มีการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมาก

เมื่อเทียบกับ เซลล์ ATDC5-mock (รูปที่2B และ2C) โดยเซลล์ ATDC5-mock จะมีลักษณะของรูปร่างเซลล์ที่ค่อนข้างกลม ขณะที่เซลล์ ATDC5-FBLN3 มีรูปร่างคล้ายกระสวยและยังพบว่ามีการหลั่งโปรตีนฟิบูลิน-3 ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่2D) และยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ ATDC5-FBLN3 เร็วกว่าเมื่อเทียบกับ ATDC5-mock (รูปที่2E)

นอกจากนี้ยังพบว่า การที่มีโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มากเกินไปในเซลล์ จะไปมีผลต่อกับยับยั้งการสร้าง

ของโปรตีโอไกลัยแคน (proteoglycan) ซึ่งโปรตีโอไกลัยแคนจัดเป็นสารตัวหนึ่งที่สำคัญซึ่งพบอยู่ในกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยปกติแล้วการเกิดโรคข้อเสื่อมจะมีผลมาจากปริมาณของสารเหล่านี้ที่ลดลง มักพบในผู้ที่มีอายุมาก เช่น ผู้สูงอายุ แต่จากการผลการศึกษาของวาคาบายาชิ และคณะ (2010) ในครั้งนี้พบว่า เมื่อในเซลล์กระดูกอ่อนมีปริมาณของโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มากกว่าปกติ จะไปส่งผลให้เกิดการยับยั้งไม่ให้เกิดการสร้างโปรตีโอไกลัยแคน ซึ่งหากปริมาณของโปรตีโอไกลัยแคนลดลงอาจส่งผลทำให้เกิดโรคข้อเสื่อมได้



รูปที่ 2 การวิเคราะห์โดยเวสเทิร์นบลอตพบว่า มี 3 สับโคลน ได้แก่ สับโคลนตำแหน่งที่ 5, 10 และ 12 มีการแสดงออกของโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มากกว่าปกติ (A) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ATDC5-mock มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม (B) เซลล์ ATDC5-FBLN3 มีลักษณะรูปร่างเป็นแบบกระสวย (C) การหลั่งโปรตีนฟิบูลิน-3 ในอาหารเลี้ยงเปรียบเทียบกับระหว่าง ATDC5-mock กับ ATDC5-FBLN3 โดย C คือ cell lysate และ M คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ (D) อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ATDC5-mock (แท่งกราฟสีเทา) เปรียบเทียบกับ ATDC5-FBLN3 (แท่งกราฟสีดำ) (E) (Wakabayashi et al., 2010)

สรุป

บทความนี้ได้ทำการศึกษา และรวบรวมข้อมูลของโปรตีนในกลุ่มฟิบูลิน โดยมุ่งเน้นในเรื่องของโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อมีปริมาณ และการแสดงออกที่มากกว่าปกติ จึงทำให้ไปยับยั้งกระบวนการสร้างสารต่างๆ เช่น โปรตีนโอกลัยแคน ที่เป็นสารที่มีความสำคัญมากต่อเซลล์กระดูกอ่อน แต่ในการศึกษาและรวบรวมข้อมูลของโปรตีนฟิบูลิน-3 ในครั้งนี้ ยังเป็นเพียงผลกระทบในระดับเซลล์ จึงยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่า หากพบว่ามีโปรตีนฟิบูลิน-3 ที่มากกว่าปกติ จะส่งผลให้เกิดโรคข้อเสื่อมหรือไม่ สำหรับการพบโปรตีนฟิบูลิน-3 ในร่างกาย จึงอาจใช้เป็นเพียงแค่ข้อบ่งชี้ หรือการเฝ้าระวังว่าอาจมีการเกิดโรคข้อเสื่อมทั้งในมนุษย์และสัตว์เท่านั้น

References

- Argraves, W. S., Greene, L. M., Cooley, M. A., & Gallagher, W. M. (2003). Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Reports*, 4(12), 1127-1131.
- Bussiere, C. T., Wright, G. M., & DeMont, M. E. (2006). The mechanical function and structure of aortic microfibrils in the lobster *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 143(4), 417-428.
- de Vega, S., Iwamoto, T., Nakamura, T., Hozumi, K., McKnight, D. A., Fisher, L. W., . . . Yamada, Y. (2007). TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30878-30888.
- de Vega, S., Iwamoto, T., & Yamada, Y. (2009). Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(11-12), 1890-1902.
- Faury, G. (2001). Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathologic Biologie (Paris)*, 49(4), 310-325.
- Gallagher, W. M., Argentini, M., Sierra, V., Bracco, L., Debussche, L., & Conseiller, E. (1999). MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties. *Oncogene*, 18(24), 3608-3616.
- Giltay, R., Timpl, R., & Kostka, G. (1999). Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biology*, 18(5), 469-480.
- Heine, H., Delude, R. L., Monks, B. G., Espevik, T., & Golenbock, D. T. (1999). Bacterial lipopolysaccharide induces expression of the stress response genes hop and H411. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 21049-21055.
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., & Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 14), 2817-2828.
- Kowal, R. C., Richardson, J. A., Miano, J. M., & Olson, E. N. (1999). EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature. *Circulation Research*, 84(10), 1166-1176.
- Lecka-Czernik, B., Lumpkin, C. K., & Goldstein, S. (1995). An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), 120-128.
- Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniwaki, M., Furukawa, Y., . . . Honjo, T. (1999). DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-

- injured arteries. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22476-22483.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., . . . Rokhsar, D. S. (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*, 317(5834), 86-94.
- Reber-Müller, S., Spissinger, T., Schuchert, P., Spring, J., & Schmid, V. (1995). An extracellular matrix protein of jellyfish homologous to mammalian fibrillins forms different fibrils depending on the life stage of the animal. *Developmental Biology*, 169(2), 662-672.
- Shadwick, R. E. (1999). Mechanical design in arteries. *J Exp Biol*, 202(Pt 23), 3305-3313.
- Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Suzuki, F., & Hiraki, Y. (1996). Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH) /PTH-related peptide receptor. *Journal of Cell Biology*, 133(2), 457-468.
- Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G., & Chu, M.-L. (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6), 479-489.
- Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P. (2007). New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: reviews*, 81(4), 229-240.
- Wakabayashi, T., Matsumine, A., Nakazora, S., Hasegawa, M., Iino, T., Ota, H., . . . Uchida, A. (2010). Fibulin-3 negatively regulates chondrocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 1116-1121.
- Yanagisawa, H., & Davis, E. C. (2010). Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(7), 1084-1093.
- Yanagisawa, H., Schluterman, M. K., & Brekken, R. A. (2009). Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), 337-347.

Role of Fibulin-3 in Extracellular Matrix Production

Tanita Pitakarnnop^{1,*}, Burin Boonsri¹, Waranee Pradit², Kittisak Buddhachat², Korakot Nganvongpanit¹

¹*Bone and Joint Research Laboratory, Department of Veterinary Biosciences and Public Health,
Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University*

²*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University*

Abstract Chondrocyte is the only cell type in cartilage bone. Normally, anabolic and catabolic activities of chondrocytes are regulated by hormones and proteins. In addition to the serve change in the extracellular matrix, chondrocyte cells also display abnormalities such as osteoarthritic cartilage. In review paper, focuses on fibulin-3 which is a protein that hasan important role in regulation about differentiation of chondrocyte. When the overexpression of fibulin-3, it affect to inhibit chondrocyte differentiation. Therefore, fibulin-3 can be used to biomarker in osteoarthritic cartilage.

Keywords: fibulin3, chondrocyte, cartilage
