การเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปันพอลีคาโปรแลคโตนด้วยบางส่วนของไฟโบรเนคตินและลามินิน

Enhancement of Cell Adhesion on Electrospun Polycaprolactone Scaffold with Partial Fibronectin and Laminin

พัชราภรณ์ ไชยศรี[1] และ สินีนาฏ ศิริ[2*]

Patcharaporn Chaisri and Sineenat Siri

[1] นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น

[2] รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

In this research, cell adhesion property of electrospun polycaprolactone (PCL) scaffold was enhanced by immobilization with partial fibronectin and laminin sequences for tissue engineering application. The rFL peptide, composed of repetitive RGD-YIGSR amino acid sequence derived from cell binding motif of fibronectin and laminin proteins, was regenerated in bacterial expression system. The rFL peptide could promote cell adhesion at 24 h approximately 1.7 folds greater than the commercial RGD peptide. The peptide was grafted onto the electrospun PCL scaffold via a covalent bond formation, making the PCL-rFL scaffold. The PCL-rFL scaffold significantly increased cell adhesion as compared to the as-spun scaffold, suggesting its potential application as biologically active substratum for cell growth.

Keyword: *Electrospinning, Polycaprolactone, Fibronectin, Laminin*

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ คุณสมบัติในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปันพอลีคาโปร-แลคโตน (PCL) ด้วยการตรึงบางส่วนของไฟโบรเนคตินและลามินินสำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เปปไทด์ rFL ที่ประกอบด้วยจำนวนซ้ำของลำดับกรดอะมิโน RGD-YIGSR ซึ่งเป็นโมทีฟทำหน้าที่ยึดเกาะเซลล์ของโปรตีนไฟโบรเนคตินและลามินิน ได้ถูกผลิตขึ้นในระบบผลิตโปรตีนในแบคทีเรีย เปปไทด์ rFL นี้สามารถส่งเสริมการยึดเกาะกับเซลล์ที่ 24 ชั่วโมงได้สูงกว่าเปปไทด์ RGD ที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ได้ถึง 1.7 เท่า และได้ถูกนำไปตรึงบนพื้นผิวของแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PCL ได้เป็นแผ่นเส้นใย PCL-rFL แผ่นเส้นใยดังกล่าวสามารถส่งเสริมการยึดเกาะกับเซลล์ได้สูงกว่าแผ่นเส้นใย PCL อย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงศักยภาพในการนำไปใช้เป็นแผ่นรองรับที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์

คำสำคัญ: *อิเล็กโตรสปินนิง, พอลิคาโปรแลคโตน, ไฟโบรเนคติน, ลามินิน*

บทนำ

เทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจในการผลิตและพัฒนาแผ่นรองรับสำหรับใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และวัสดุปิดแผล เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ผลิตแผ่นเส้นใยได้ง่าย มีคุณภาพสม่ำเสมอ และสามารถควบคุมขนาดของเส้นใยได้ตั้งแต่ระดับไมโครเมตรถึงนาโนเมตร นอกจากนี้แผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปันยังมีสมบัติที่เหมาะสมในการส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์ ได้แก่ มีพื้นที่ผิวสัมผัสต่อปริมาตรสูง มีความเป็นรูพรุนสูง การกระจายของรูพรุนทั่วแผ่นเส้นใย มีปริมาตรในการดูดซับของเหลวที่ดี และมีรูพรุนที่มีขนาดเล็ก ทำให้มีการถ่ายเทของสารระหว่างเซลล์ได้ดี (Ma et al., 2005)

พอลิเมอร์หลากหลายชนิด ทั้งพอลิเมอร์สังเคราะห์และชีวพอลิเมอร์ธรรมชาติได้ถูกใช้เพื่อผลิตแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปันสำหรับใช้เป็นแผ่นรองรับเซลล์ ตัวอย่างของชีวพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีการศึกษามาก ได้แก่ คอลลาเจน ไฟโบรอิน และไคติน เป็นต้น การใช้ชีวพอลิเมอร์ธรรมชาติในการผลิตแผ่นรองรับเซลล์มีข้อดีคือ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ สามารถสลายได้เองทางชีวภาพ และบางชนิดอาจมีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ แต่มีข้อกำจัดคือ คุณภาพของชีวพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณต่ำ และคุณภาพไม่แน่นอน สำหรับพอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้รับความสนใจเชิงอุตสาหกรรมมากกว่า เนื่องจากมีข้อดีในด้านปริมาณ คุณภาพ และมาตรฐานในการผลิตซ้ำ แต่อย่างไรก็ดีพอลิเมอร์สังเคราะห์เหล่านี้ขาดสมบัติทางชีวภาพที่กระตุ้นการยึดเกาะ การเจริญ และการตอบสนองระดับโมเลกุลของเซลล์ (Bhattarai et al., 2004; Liao et al., 2006; Nisbet et al., 2008) ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการเพิ่มสารชีวภาพชนิดต่างๆ เพื่อส่งเสริมให้แผ่นเส้นใยที่ผลิตจากพลิเมอร์สังเคราะห์มีสมบัติดังกล่าวดีขึ้น ซึ่งสารชีวภาพเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีในเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix, ECM) ได้แก่ คอลลาเจน ไฟโบรเนคติน และลามินิน

ไฟโบรเนคตินและลามินินเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลักในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการใช้ไฟโบรเนคตินและลามินินในการส่งเสริมให้แผ่นเส้นใยที่ผลิตจาก พอลิเมอร์สังเคราะห์ (พอลีคาโปรแลคโตน) ให้มีสมบัติในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ นอกจากนี้เนื่องจากพบว่าในโครงสร้างของโปรตีนไฟโบรเนคตินและลามินินนั้นมีบริเวณกระตุ้นการจับกับเซลล์และกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ผ่านอินทีกรินรีเซบเตอร์ (integrin receptor) ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนสั้นๆ คือ RGD สำหรับไฟโบรเนคติน และ YIGSR สำหรับลามินิน (Linh, 2010)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการสังเคราะห์เปปไทด์ที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD-YIGSR จำนวนหลายซ้ำ เพื่อให้ได้เปปไทด์ชนิดใหม่ที่มีสมบัติในการส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์ (เรียกว่าเปปไทด์ rFL) และใช้เปปไทด์ดังกล่าวในการผลิตแผ่นเส้นใย PCL-rFL เพื่อใช้เป็นแผ่นรองรับเซลล์ที่มีสมบัติส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์

วิธีวิจัย

การโคลนยีนและผลิตเปปไทด์ rFL

สังเคราะห์ดีเอ็นเอ rFL ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยออกแบบไพรเมอร์ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการถอดรหัสลำดับกรดอะมิโน RGD-YIGSR และออกแบบให้คู่ไพร์เมอร์

สามารถจับกันเองได้ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Holton และ Graham (Holton and Graham, 1991) สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1x พีซีอาร์บัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิ-โมลาร์ ไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (Taq DNA polymerase) 0.25 ยูนิต สภาวะที่ทำพีซีอาร์ประกอบด้วยปฏิกิริยา 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pPP-30 UA (5 PRIME, USA) ด้วยเทคนิค TA cloning เพื่อให้ได้พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pPP-rFL และนำเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* M13 (pREP4) จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดรีคอมบิแนนท์บนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิ- ซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกานาไมซิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากตรวจสอบลำดับเบสของ พลาสมิดรีคอมบิแนนท์แล้ว ได้กระตุ้นการผลิตเปปไทด์ rFL ด้วย isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วแยกบริสุทธิ์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ดังกล่าวด้วยวิธีของ Singh และ Panda (Singh and Panda, 2005) ศึกษาแบบแผนของโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้บน 15% sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การทดสอบกิจกรรมของเปปไทด์ rFL ในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์

ตรึงเปปไทด์ rFL ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของเพลทแบบ 96 ช่อง (Protein-Maxibinding 96-Well Culture Plate; Nunc, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการศึกษาใช้เปปไทด์ RGD เชิงพาณิชย์ และโปรตีนโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) เป็นตัวเปรียบเทียบ หลังจากนั้นล้างด้วย 1x phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง ก่อนที่จะบ่มกับเซลล์ NIH 3T3 ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนได้ออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัดเซลล์ไม่ยึดเกาะออก วัดปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะด้วยวิธี MTT assay (Sigma, USA)

การผลิตแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PCL-rFL

ผลิตแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PCL โดยใช้สารละลาย PCL ความเข้มข้น 10% (ละลายใน methylene chloride : dimethylformamide ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร) และใช้สภาวะในการอิเล็ก- โตรสปินนิง คือ ศักย์ไฟฟ้า 19.2 กิโลโวลต์ อัตราการไหลของสารละลาย 0.4 มิลลิลิตร/ชั่วโมง และระยะห่างระหว่างปลายเข็มและวัสดุรองรับ 13 เซนติเมตร

เมื่อได้แผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PCL ทำการตรึงเปปไทด์ rFL บนแผ่นเส้นใย โดยนำแผ่นเส้นใยมาผ่านการทำ cold plasma treatment ที่ความถี่ 50 วัตต์ ใช้ก๊าซอาร์กอนและออกซิเจน เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นบ่มกับกรดอะคริลิค 10% (acrylic acid) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำปราศจากอิออน จากนั้นแช่แผ่นเส้นใยในสารละลาย ethyl (dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) : N-hydroxysuccinimide (NHS)ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำปราศจากอิออน แล้วแช่ในสารละลายเปปไทด์ rFL ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำให้ได้แผ่นเส้นใย PCL-rFL

การศึกษาสมบัติของแผ่นเส้นใย

ลักษณะและขนาดของแผ่นเส้นใย ศึกษาจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope (SEM); Hitashi5-3000, Japan) วิเคราะห์องค์ประกอบของแผ่นเส้นใยด้วยเทคนิค attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy และวิเคราะห์สมบัติความชอบน้ำด้วยการวัดมุมสัมผัสของน้ำ (FTA1000 contact angle analyzer; FTA, USA)

ตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษของแผ่นเส้นใย PCL-rFL ตามวิธีมาตรฐาน ISO10993-5 เตรียมสารสกัดจากแผ่นเส้นใย โดยบ่มแผ่นเส้นใยขนาด 2 เซนติเมตร x 3 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ 200 ไมโครลิตร มาบ่มกับเซลล์ NIH 3T3 ปริมาณ $1x10^4$ เซลล์ ในช่องของเพลทชนิด 96 ช่อง ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และความชื้น 85 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณเซลล์ด้วย MTT assay

การยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นเส้นใย PCL-rFL ทำได้โดยใช้แผ่นเส้นใยที่ตัดเป็นวงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วางลงในหลุมของเพลทชนิด 96 ช่อง แบบที่พื้นผิวไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ได้ จากนั้นเติมเซลล์ NIH T3T ปริมาณ $5x10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และความชื้น 85 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ที่ไม่เกาะบนแผ่นเส้นใยออกด้วย 1× PBS 2 ครั้ง และวัดปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนแผ่นเส้นใยด้วย MTT assay

ผลการวิจัย

เปปไทด์รีคอมบิแนนท์ rFL

ในการศึกษานี้ได้สังเคราะห์ดีเอ็นเอของ rFL ซึ่งพบว่าได้ดีเอ็นเอขนาด 515 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสได้เปปไทด์ที่ประกอบด้วย 18 ซ้ำของลำดับกรดอะมิโน RGD-YIGSR และมีขนาด ที่ได้จากการคำนวณ 16.3 กิโลดาลตัน ผลการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ rFL พบว่ามีขนาดประมาณ 17 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ (รูปที่ 1)

เมื่อนำเปปไทด์ rFL ไปวิเคราะห์กิจกรรมในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ NIH 3T3 โดยเปรียบเทียบกับเปปไทด์ RGD ที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ (Sigma, USA) ที่มีสมบัติในการส่งเสริมการยึดเกาะกับเซลล์ และโปรตีนโบไวน์ซีรั่มอัลบูมินที่ไม่มีสมบัติในการส่งเสริมการยึดเกาะกับเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าเปปไทด์ rFL สามารถส่งเสริมให้มีการยึดเกาะกับเซลล์ได้มากกว่าเปปไทด์ RGD ถึง 1.7 เท่า (รูปที่ 2) ซึ่งสามารถสังเกตการส่งเสริมการยึดเกาะกับเซลล์ได้สูงกว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง (รูปที่ 3) โดยเซลล์ในวัสดุรองรับที่เคลือบด้วยเปปไทด์ rFL มีการยึดเกาะกับเซลล์ได้เร็วกว่าและมีปริมาณมากกว่าเปปไทด์ RGD เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกัน

แผ่นเส้นใยเล็กโตรสปัน PCL และ PCL-rFL

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PCL คือ สารละลาย PCL ความเข้มข้น10% อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ศักย์ไฟฟ้า 19.2 กิโลโวลต์ และระยะห่างระหว่างปลายเข็มโลหะถึงวัสดุรองรับ 13 เซนติเมตร จากการวัดขนาดเฉลี่ยของเส้นใยจากภาพถ่าย SEM พบว่ามีขนาด552.39$\pm$38.55 นาโนเมตร (รูปที่ 4A) ในการเปรียบเทียบระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาพลาสมา พบว่าระยะเวลาที่ 1 และ 2 นาที ไม่มีผลต่อขนาดเส้นใย แต่ที่ 4 นาที มีผลเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4B-4D) ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาที่ 2 นาทีในการทำ

ปฏิกิริยาพลาสมา จากนั้นเติมกรดอะคริลิกและโมเลกุล linkers แล้วจึงเติมเปปไทด์ rFL ผลการศึกษาพบว่าเส้นใยที่ถูกตรึงด้วยเปปไทด์ rFL มีขนาดเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4E) ซึ่งเกิดจากการหลอมของเส้นใยในระหว่างที่แช่ในกรดอะคริลิก

ผลการวิเคราะห์ด้วย ATR-FTIR (ไม่ได้แสดงรูป) พบว่าหลังจากที่ตรึงเปปไทด์ลงบนแผ่นเส้นใย PCL พบสเปคตรัมของ ATR-FTIR มีพีคของหมู่เอไมด์ II ที่ 1527 เซนติเมตร$^{-1}$ และพีคในช่วง 3000-3600 เซนติเมตร$^{-1}$ ของ N-H stretching ของหมู่เอไมด์ ซึ่งไม่ปรากฏในแผ่นโครงร่างเส้นใย PCL ทำให้สรุปได้ว่าสามารถตรึงเปปไทด์ลงบนแผ่นเส้นใย PCL ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากการตรึงเปปไทด์ลงบนแผ่นเส้นใย PCL มีผลทำให้แผ่นเส้นใย PCL มีสมบัติความชอบน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งวิเคราะห์จากค่ามุมสัมผัสของน้ำที่เปลี่ยนแปลงจาก 115.26$\pm$6.77 องศา เป็น 0 องศา

การยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นเส้นใยเล็กโตรสปัน PCL และ PCL-rFL

ในการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ พบว่าแผ่นใย PCL-rFL สามารถส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยอีก 3 ชนิด คือ แผ่นเส้นใย PCL แผ่นเส้นใย PCL ที่ตรึงกับโปรตีนโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (PCL-BSA) และแผ่นเส้นใย PCL ที่ตรึงกับเปปไทด์ RGD (PCL-RGD) ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยเซลล์ที่เกาะบนแผ่นเส้นใยมีการตอบสนองต่อเปปไทด์ rFL คือ มีการแผ่กว้างออกของเซลล์ และขอบเซลล์มีการยืดขยายเพื่อเกาะกับแผ่นเส้นใย

ในทำนองเดียวกัน พบว่าแผ่นใย PCL-rFL สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยทั้งสามชนิด (รูปที่ 6) โดยจากผลการศึกษาจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นเส้นใย PCL-rFL พบว่ามีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 1-7 วันของการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่านอกจากเปปไทด์ rFL จะส่งเสริมให้เซลล์ยึดเกาะกับแผ่นเส้นใยแล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการตอบสนองในด้านการเจริญอีกด้วย

การอภิปรายผล

ในการสังเคราะห์เปปไทด์ rFL ที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD-YIGSR จำนวน 18 ซ้ำ พบว่าสามารถส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้สูงกว่าเปปไทด์ RGD เชิงพาณิชย์ เกิดจากการที่เปปไทด์ rFL ประกอบด้วยส่วนที่สามารถส่งเสริมการยึดของเซลล์จากทั้งไฟโบนเนคติน (RGD) และลามินิน (YIGSR) และการที่มีจำนวนซ้ำของลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวจำนวนมาก จึงมีส่วนในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ให้มากขึ้น โดยทำงานผ่านการกระตุ้นที่อินทีกรินรีเซบเตอร์และ transmembrane proteoglycans ชนิดต่างๆ และส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ดังกล่าว (Healy et al., 1999; Marchand-Brynaert et al., 1999)

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่ประกอบด้วยบางส่วนของไฟโบรเนคตินและลามินิน คือ ลำดับกรดมิโน RGD และ YIGSR สามารถส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี ซึ่งเมื่อนำไปตรึงบนแผ่นเส้นใย PCL พบว่าสามารถทำให้แผ่นเส้นใยดังกล่าวมีสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะต่อการการยึดเกาะ การเจริญ และการตอบสนองของเซลล์ได้ดีมากขึ้น ทำให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นวัสดุรองรับเซลล์ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

Bhattarai, S.R., Bhattarai, N., Yi, H.K., Hwang, P.H., Cha, D.I., and Kim, H.Y. 2004. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. Biomaterials 25: 2595-2602.

Healy, K.E., Rezania, A., and Stile, R.A. 1999. Designing biomaterials to direct biological responses. Annals of the New York Academy of Sciences 875: 24-35.

Holton, T.A., and Graham, M.W. 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucleic Acids Research 19: 1156.

Liao, S., Li, B., Ma, Z., Wei, H., Chan, C., and Ramakrishna, S. 2006. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. Biomedical Matererial 1: 45-53.

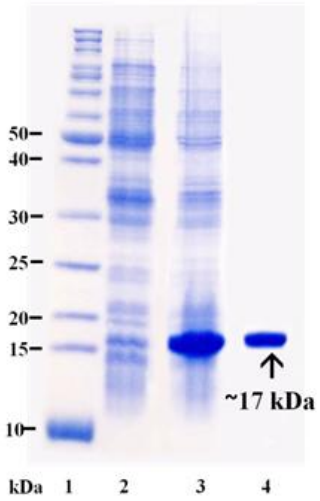
Linh, N.T., Min, Y.K., Song, H.Y., and Lee, B.T. 2010. Fabrication of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and evaluation of their material properties. Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials 95: 184-191.

Ma, Z., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K. 2005. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. Tissue Engineering 11: 101-109.

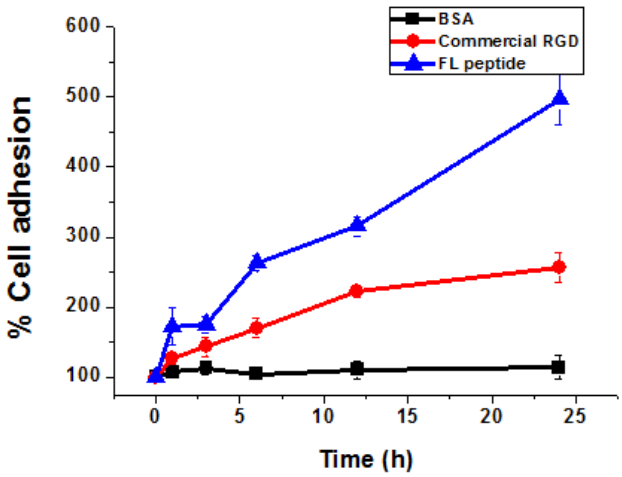
Marchand-Brynaert, J., Detrait, E., Noiset, O., Boxus, T., Scheneider, Y.J., and Remacle, C. 1999. Biological evaluation of RGD peptidomimetics, designed for the covalent derivatization of cell culture substrata, as potential promotors of cellular adhesion. Biomaterials 20: 1773-1782.

Nisbet, D.R., Yu, L.M., Zahir, T., Forsythe, J.S., and Shoichet, M.S. 2008. Characterization of neural stem cells on electrospun poly(epsilon-caprolactone) submicron scaffolds: evaluating their potential in neural tissue engineering. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 19: 623-634.

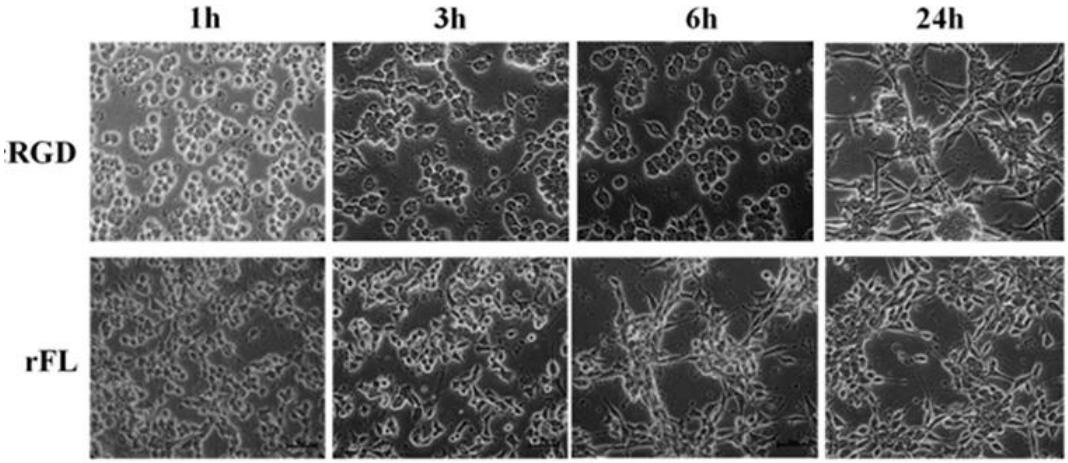
Singh, S.M., and Panda, A.K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. Journal of Bioscience and Bioengineering. 99: 303-310.



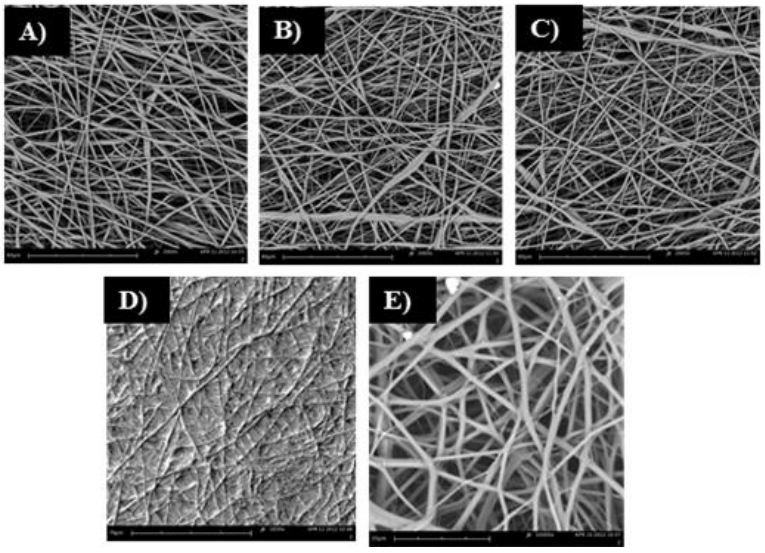
รูปที่ 1. เปปไทด์ rFL บน SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดประมาณ 17 กิโลดาลตัน โดยช่องที่ 1 คือ โปรตีนเครื่องหมายโมเลกุลมาตรฐาน ช่องที่ 2 คือ โปรตีนของเซลล์แบคทีเรียก่อนการกระตุ้นด้วย IPTG ช่องที่ 3 คือ โปรตีนของเซลล์แบคทีเรียหลังการกระตุ้นด้วย IPTG และช่องที่ 4 คือ โปรตีน rFL ที่แยกบริสุทธิ์



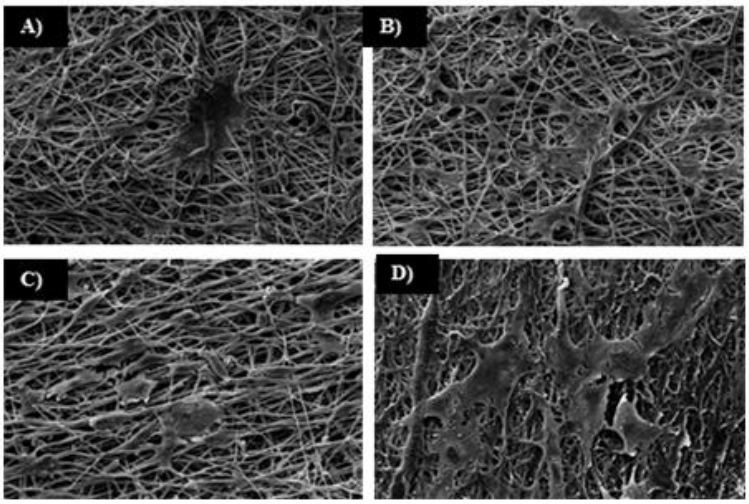
รูปที่ 2. การยึดเกาะของเซลล์ NIH 3T3 ที่ตอบสนองต่อเปปไทด์ rFL เปปไทด์ RGD เชิงพาณิชย์ และโปรตีน โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (BSA) ในช่วง 24 ชั่วโมง (n=5, $p<0.05$)



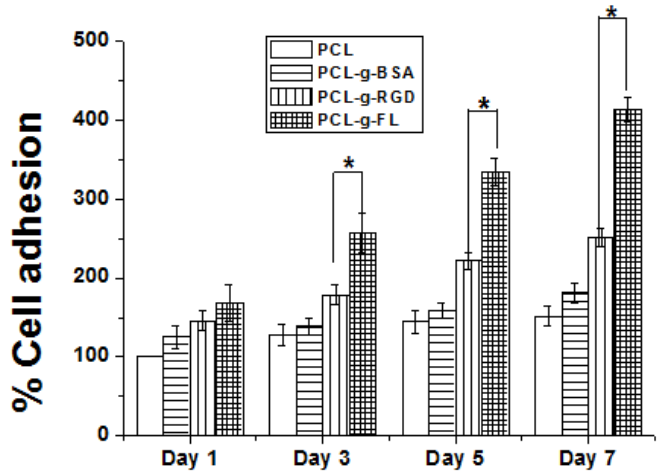
รูปที่ 3. การยึดเกาะของเซลล์ NIH 3T3 บนวัสดุรองรับที่เคลือบด้วยเปปไทด์ rFL และเปปไทด์ RGD เชิงพาณิชย์ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลา 1-24 ชั่วโมง



รูปที่ 4. ภาพ SEM ของแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PCL ที่ (A) หลังจากสปินได้ (B) หลังทำปฏิกิริยาพลาสมา 1 นาที (C) หลังทำปฏิกิริยาพลาสมา 2 นาที (D) หลังทำปฏิกิริยาพลาสมา 4 นาที และ (E) หลังตรึงด้วยเปปไทด์ rFL



รูปที่ 5. การยึดเกาะของเซลล์ NIH 3T3 บนแผ่นเส้นใยเล็กโตรสปัน (A) PCL, (B) PCL-BSA, (C) PCL-RGD และ PCL-rFL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 6. การเจริญของเซลล์ NIH 3T3 บนแผ่นเส้นใยเล็กโตรสปัน (A) PCL, (B) PCL-BSA, (C) PCL-RGD และ PCL-rFL เป็นเวลา 1-7 วัน (n=5, $p<0.05$)