ผลของเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

ปริญญานิพนธ์
ของ
ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ธันวาคม 2555

ผลของเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

ปริญญานิพนธ์
ของ
ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ธันวาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลของเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

บทคัดย่อ

ของ

ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ธันวาคม 2555

ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร. (2555). *ผลของเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการหลั่งทูเมอร์ เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในเซลล์ ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ปริทันตวิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตาจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน.

เอชเอ็มจีบี1 เป็นโปรตีนที่พบในนิวเคลียส เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์จะสามารถทำหน้าที่เสมือนไซโตไคน์ได้ ถูกพบในรอยโรคหลายชนิด เช่น รูมาตอยด์ และพบในน้ำเหลืองเหงือกและเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ และยังพบการแสดงออกของยีน และการหลั่ง เอชเอ็มจีบี1 หลังกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 จึงอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาบทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อการแสดงออกของยีนและการหลั่ง ทูเมอร์ เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เมื่อกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วยสารตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว

วิธีดำเนินการวิจัย เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจากเนื้อเยื่อของฟันที่ไม่แสดงรอยโรคของการอักเสบจากผู้ป่วย 2 ราย กระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และสภาวะไม่ได้กระตุ้น ตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ที่ 4 ชั่วโมง และนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นเซลล์ 48 ชั่วโมง มาตรวจสอบหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ด้วยเทคนิคอีไลซ่า และวิเคราะห์ ความแตกต่างทางสถิติของความเข้มข้นทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1 เบต้า และเมทิกเมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวและเปรียบเทียบรายคู่ด้วยสถิติแบบที และวิเคราะห์การแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอด้วยสถิติพรรณา

ผลการวิจัย เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน มากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้น ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสจะมีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดออกมามากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มเอชเอ็มจีบี1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ส่วนการแสดงออกของยีนทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าพบว่าเซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีการแสดงออกที่ไม่สัมพันธ์กับการหลั่งโปรตีน อย่างไรก็ตาม พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และกระตุ้นร่วม กันด้วยสารทั้ง 2 ชนิด

สรุปผลการทดลอง เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1-เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิสและมีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดออกมามากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับการกระตุ้น ร่วมกัน

THE EFFECT OF COMBINATION OF HMGB1 AND PORPHYROMONAS GINGIVALIS LIPOPOLYSACCHARIDE ON TUMOR NECROSIS FACTOR α INTERLEUKIN 1β AND MATRIX METALLOPROTEINASE-I RELEASING FROM HUMAN GINGIVAL AND PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS

AN ABSTRACT

BY

PRAPAT PRADERMDUTSADEEPORN

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Periodontology

at Srinakharinwirot University

December 2012

Prapat Pradermdutsadeeporn. (2012). *The Effect of Combination of HMGB1 and Porphyromoans Gingivalis Lipopolysaccharide on Tumor Necrosis Factor α Interleukin 1β and Matrix Metalloproteinase-I Releasing from Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts*. Master thesis, M.S. (Periodontology). Bangkok: Graduate School,Srinakharinwirot University. Advisor Commitee: Assoc. Prof. DR. Narongsak Laosrisin

HMGB1 was first characterized as a nuclear protein, extracellularly act as a cytokine. HMGB1 has been found in Rheumatoid Arthritis, gingival crevicular fluid and periodontium of periodontitis patients. The gene expression and secretion of HMGB1 also has been exhibited in gingival and periodontal ligament (PDL) fibroblasts by activated with lipopolysaccharide of Porphyromaonas gingivalis.

Objectives: To study effect of HMGB1 on tumor necrosis factor alpha (TNF-α) Interleukin -1 beta (IL-1β) and Metrix metalloprotienase-1 (MMP-1) gene expression and protein secretion by activated Human gingival and periodontal ligament fibroblasts with combination of HMGB1 and LPS of P. gingivalis compare with HMGB1, P.gingivalis LPS and control

Materials and Methods: Human gingival and periodontal fibroblasts were derived from explants obtained from 2 healthy individuals with non-inflamed periodontal supporting tissue. Cells were co-cultured with combination of HMGB1 and P. gingivalis LPS, HMGB1 and P.gingivalis LPS alone, and no any stimulant as control. After 48 hours, TNF-α, IL-1β and MMP-1 level in supernatants was measured by ELISA. TNF-α, IL-1β and MMP-1 mRNA expression was investigated by Realtime PCR after 4 hours activation. TNF-α, IL-1β and MMP-1 levels were compared by using One-way analysis of variance (One-way ANOVA) and T test and mRNA expressions were analyzed descriptively.

Results: Both cells secreted TNF-α, IL-1β and MMP-1 in combine group more than control, HMGB1 and LPS group and we found TNF-α, IL-1β and MMP-1 level in LPS group more than control and HMGB1 group.($P<0.01$). TNF-α, IL-1β secretion on both cells weren't correlated with mRNA expression. However, clearly mRNA expression of MMP-1 was exhibited in only PDL fibroblasts after HMGB1, LPS and combine activations than control.

Conclusion: The Combination of HMGB1 and LPS of P. gingivalis could activate human gingival and PDL fibroblasts to release more TNFα, IL1β and MMP-1 after 48 hours of stimulation

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ผลของเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการหลั่งทูเมอร์ เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

ของ

ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาปริทันตวิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2555

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน .....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.นีรชา สารชวนะกิจ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง ข้อมูลข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร รอศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นีรชาสารชวนะกิจ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆของการวิจัยรวมทั้งให้ความกรุณาในการตรวจแก้ไขปริญญษนิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ตลอดจนให้คำแนะนำในการทดลองต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณทันตแพทย์หญิง ดร.ปรมาภรณ์ จิ๋วพัฒนกุลในคำแนะนำทางสถิติ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ทันตแพทย์หญิงอรุณวรรณ หล่ำอุบล อาจารย์ทันตแพทย์หญิงรุ่งทิวา ปันป่า ในคำแนะนำในการทดลองต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโอษฐ์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้การช่วยเหลือและให้คำแนะนำอย่างดี

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้เป็นที่รักยิ่ง ที่ให้การสนับสนุน และตอยให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	นิยามคำศัพท์เฉพาะ	3
	กรอบแนวคิดของการวิจัย	4
	สมมุติฐานในการวิจัย	4
2	**เอกสารที่เกี่ยวข้อง**	5
	เอชเอ็มจีบี1	5
	โครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1	5
	การหลั่งและบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1	6
	ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา	9
	อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า	11
	เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 (Matrix metalloproteinase-I)	12
3	**วิธีดำเนินงานวิจัย**	14
	สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	14
	การเตรียมเอชเอ็มจีบี1	14
	การเตรียมไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาวิส	14
	การเตรียมไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -1 และแกปดีเอช (glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	14
	การจัดกระทำและรวบรวมข้อมูล	15
	สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลอง	21
5	**อภิปรายผลและบทสรุป**	29
	อภิปรายผล	29
	บทสรุป	32
บรรณานุกรม		33
ภาคผนวก		41
	ภาคผนวก ก.	42
ประวัติย่อผู้วิจัย		46

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 บทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ[16] 7

2 แสดงสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นและยับยั้งการสร้างเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส[50] 13

3 แสดงผลการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในสภาวะปกติและเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นพร้อมกันทั้ง 2 ชนิด 27

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 แสดงโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1[11] 5

2 แผนผังแสดงการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ด้วยวิธีแอกทีฟซิคริชั่นและแพสซีฟซิคริชั่น[11] 6

3 แผนผังแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียโดยมีการหลั่งไซโตไคน์ ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูก[21] 9

4 แสดงบทบาทของไซโตไคน์ต่อการเปลี่ยนแปลงของพรีออสทิโอคลาสไปสู่เซลล์สลายกระดูก[47] 12

5 แสดงขั้นตอนการสกัดเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป 16

6 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบจากเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป 17

7 แสดงการเตรียมพื้นผิวหลุมทดลองด้วยการเคลือบแอนติบอดี้ 18

8 แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1 บต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ด้วยเทคนิคอีไลซ่า 19

9 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟเตอร์ แอลฟาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เหงือกเมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย 21

10 แผนภูมิแสดงการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกัน ทั้ง 2 ชนิด 22

11 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเออินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย 23

12 แผนภูมิแสดงการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกัน 24

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

13 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย 25

14 แผนภูมิแสดงการหลั่งเมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกัน 26

15 แผนผังแสดงบทบาทหน้าที่ของเอชเอ็มจีบี1เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และการทำงานที่ต้องร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์[57] 29

16 แสดงการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอที่ 4 ชั่วโมงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร A) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ B) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนแกปดีเอช ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ C) แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา 43

17 แสดงการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอที่ 4 ชั่วโมงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และเอชเอ็มจีบี1 A) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ B) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนแกปดีเอช ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ C) แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา 44

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

เอชเอ็มจีบี1 (High mobility group box 1, HMGB1) เป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส มีขนาดเล็กน้ำหนักโมเลกุล 25 KDa ลักษณะโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1 แบ่งเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วยส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domain) 2 ส่วน มีรูปร่างคล้ายตัวแอล เรียกว่า เอชเอ็มจีบอกซ์ (HMGBoxes) และส่วนปลายด้านคาร์บอกซี (C-Terminal) ซึ่งมีส่วนปลายที่เป็นกรด (Acidic tail) ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสปาติก (Aspartic acid) และกรดอะมิโนกลูตามิก (Glutamic acid) เรียงตัวซ้ำกันของกรดอะมิโน 35 – 40 หน่วย แต่เดิมเอชเอ็มจีบี1 ถูกค้นพบ เป็นส่วนประกอบหนึ่งของนิวเคลียส[1] มีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ เช่น กระบวนการทรานสคริปชั่น (Transcription) วี(ดี)เจ รีคอมบิเนชั่น (V(D)J recombination) สามารถจับกับดีเอ็นเอ ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอมีเสถียรภาพ

การศึกษาต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี1มีบทบาทภายนอกเซลล์ด้วย[2,3] โดยถูกหลั่งออกจากเซลล์ในร่างกายหลายได้ชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้น เช่น แมกโครฟาจ (Macrophage) โมโนไซต์ (Monocyte) เซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial cell) เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell) และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cell) นอกจากนี้เซลล์ภายในช่องปาก เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ก็สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1ได้เช่นกัน[4,5]

บทบาทของเอชเอ็มจีบี1 เมื่อถูกขับออกนอกเซลล์จะทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบโดยจะหลั่งออกมาได้ช้ากว่าไซโตไคน์ชนิดอื่น เช่น ตรวจพบการหลั่ง เอชเอ็มจีบี1 ภายหลังกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 6 – 8 ชั่วโมง[2] และพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในเซรั่มหนูมากขึ้น ภายหลังกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 16 ถึง 36 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการหลั่งทูมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาเมื่อกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1[6]

เอชเอ็มจีบี1 ยังมีบทบาทต่อการเกิดโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ไม่ว่าจะเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง เช่น โรคไขข้ออักเสบ (Arthritis)[7,8] โดยพบ เอชเอ็มจีบี1 ในบริเวณรอยโรค เช่น พบ เอชเอ็มจีบี1 ในบริเวณเยื่อหุ้มข้อต่ออักเสบ (Synovial tissue) และของเหลวภายในข้อต่อ (Synovial fluid) ของผู้ป่วยโรคไขข้ออักเสบ หรือพบเอชเอ็มจีบี1 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Sepsis)

เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบที่สำคัญของโรคในช่องปาก จึงเป็นที่ได้รับความสนใจว่าเอชเอ็มจีบี 1 น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับเซลล์ในช่องปาก และขบวนการอักเสบของโรคปริทันต์อักเสบด้วย จากการวิจัยของกนิษฐ์และคณะในปี 2006[3] สามารถตรวจพบ เอชเอ็มจีบี1 ในไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ (Gingival and Periodontal ligament fibroblasts) ใน

สภาวะปกติ และพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในระดับแมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของอีโคไล (E.coli) และจากการศึกษาของรุ่งทิวาและคณะในปี 2008[4] พบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ทั้งในระดับแมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน เมื่อกระตุ้นไฟโบรบลาสต์เหงือกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส (P gingivalis Lipopolysaccharide) ซึ่งจัดว่า เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของโรคปริทันต์อักเสบอีกด้วย

นอกจากการศึกษาดังกล่าวยังพบว่า มีการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 กับโรคในช่องปากอยู่บ้าง เช่น พบเอชเอ็มจีบี1 ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและพบ เอชเอ็มจีบี1 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[9] และพบการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแอกริเกตริแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเต็มโคมิแทนส์ (Aggregatibactor Actinomycetemcomitans)[10] พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส[5]

สืบเนื่องจากประเด็นเอชเอ็มจีบี1เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และทำงานร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นเสมือนไซโตไคน์ ทำให้มีประเด็นที่เป็นเรื่องน่าสนใจว่า เมื่อเอชเอ็มจีบี1 ทำงานร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสแล้วจะไปมีผล กระตุ้นเซลล์ในช่องปากให้เกิดผลอื่นๆ เกิดขึ้นบ้างหรือไม่ เช่น กระตุ้นการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาได้หรือไม่ หรือแม้แต่ไปกระตุ้นเซลล์ในช่องปากให้หลั่ง เอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสออกมาทำลายเนื้อเยื่อด้วยหรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลการตอบสนองในระดับยีนและโปรตีนของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 เปรียบเทียบกับสภาวะปกติ หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิด มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ การศึกษาการทำงานร่วมกันของเอชอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสน่าจะช่วยอธิบายกลไกการเกิดโรคปริทันต์อักเสบรวมถึงพัฒนาวิธีการรักษาโรคปริทันต์อักเสบต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

การวิจัยนี้ มีความมุ่งหมายเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิสเปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วยสารเพียงตัวใดตัวหนึ่งหรือไม่ได้กระตุ้นสารใดๆ

ความสำคัญของการวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะปริทันต์ทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง อันเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการทำลายเหงือกเอ็นยึด

ปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุดปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์คือแบคทีเรียก่อโรคและความสมดุลระหว่างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกับแบคทีเรีย ก่อโรคโดยเมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียทำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายต่อแบคทีเรียในรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบต่างๆ รวมถึงเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ก่อให้เกิดการอักเสบและทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมาได้

เอชเอ็มจีบี1 จัดเป็นนิวเคลียสโปรตีน ซึ่งจะพบอยู่ในนิวเคลียสในสภาวะปกติมีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ การศึกษาระยะต่อมาพบว่า เอชเอ็มจีบี1ไม่ได้จำกัดหรือมีบทบาทเฉพาะในเซลล์ พบว่า เอชเอ็มจีบี1 สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยพบการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟาในระดับยีนและโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1[6] ส่วนงานวิจัยภายในช่องปาก พบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก และเอ็นยึดปริทันต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์[5,10] นอกจากนี้ยังพบเอชเอ็มจีบี1 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[9]

จากผลการวิจัยดังกล่าวเอชเอ็มจีบี1อาจมีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมของบทบาทของเอ็มจีบี-1 ที่มีผลต่อเซลล์ไฟรโบรบาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาและเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในระดับยีนและโปรตีนในสภาวะปกติและเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และกระตุ้นร่วมกันด้วยสาร ทั้ง 2 ชนิด

นิยามคำศัพท์เฉพาะ

1. **HMGB 1** : เอชเอ็มจีบี1
2. **Periodontitis** : โรคปริทันต์อักเสบ
3. **Human gingival fibroblast** : เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์
4. **Human periodontal ligament fibroblast** : เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์
5. **Interleukin-1-β** : อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า
6. **Tumor necrosis factor α** : ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา
7. **Matrix metalloproteinase–1** : เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

สาเหตุหลักของโรคปริทันต์อักเสบ คือ แบคทีเรีย ก่อโรคและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียก่อโรคและปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียในรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandin) จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น โมโนไซต์ แมกโครฟาจ เป็นต้น นอกจากนี้ เซลล์ไฟโบรบลาสต์เองก็ยังเป็นเซลล์ที่สามารถหลั่งไซโตไคน์ในขบวนการของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน

สืบเนื่องจากพบว่า เอชเอ็มจีบี1 มีคุณสมบัติที่ทำหน้าที่ได้หลายชนิดงานวิจัยบางส่วน พบว่า เอชเอ็มจีบี1 สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาภายหลังไซโตไคน์ชนิดอื่น[5] และพบว่า เอชเอ็มจีบี1 สามารถทำงานร่วมกับตัวกระตุ้นอื่นๆ ในการกระตุ้นให้เซลล์มีการหลั่งไซโตไคน์ออกมามากขึ้น การวิจัยก่อนหน้านี้พบเอชเอ็มจีบี1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด เช่น โรคไขข้ออักเสบ สภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดส่วนงานวิจัยเอชเอ็มจีบี1 ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบพบว่ามีบ้าง เช่น สามารถตรวจพบเอชเอ็มจีบี1 ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วย โรคปริทันต์ อักเสบ[9] และพบการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ออกภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรคปริทันต์ เช่น พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส แอกริเกตริเบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเต็มโคมิแทนส์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาข้างต้นทำให้ผู้วิจัยจึงคิดว่าเอชเอ็มจีบี1อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยเอชเอ็มจีบี1 อาจทำงานร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิสไปกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ ให้มีการหลั่งไซโตไคน์ และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในปริมาณที่สูงขึ้น หรือเป็นลักษณะที่เสริมการกระตุ้นของตัวกระตุ้นอื่นก็ยังเป็นได้ ซึ่งผลที่คาดหวังจากการวิจัยนี้ น่าจะอธิบายกลไกพยาธิกำเนิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบได้ดียิ่งขึ้นเพื่อเป็นข้อพิจารณาสำหรับเลือกแนวทางในการรักษาโรคปริทันต์ต่อไป

สมมติฐานการวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส มากกว่ากระตุ้นด้วยสารเพียงตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. เอชเอ็มจีบี1
2. การหลั่งเอชเอ็มจีบี1และบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1
3. ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา
4. อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า
5. เมริกเมทัลโลโปรตีเนส-1

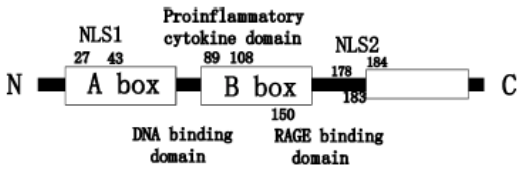
เอชเอ็มจีบี1

โครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1

เอชเอ็มจีบี1 (High mobility group box 1; HMGB1) เป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อประมาณ 39 ปี มีขนาดหน่วยอะมิโน 215 ยูนิต เป็นสมาชิกในกลุ่มเอชเอ็มจีโปรตีน (High- mobility group protein family) ซึ่งประกอบด้วย เอชเอ็มจีบี (HMGB) เอชเอ็มจีเอ็น (HMGN) และ เอชเอ็มจีเอ (HMGA) แต่ละกลุ่มสมาชิกต่างกันที่ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ (Functional sequence motif) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ เรียกว่า เอทีฮุค (AT-hook) ส่วนลำดับหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ็น เรียกว่า ส่วนจับของนิวคลิโอโซม (Nucleosomal binding protein) ส่วนลำดับหน้าที่ของเอชเอ็มจีบี เรียกว่า เอชเอ็มจีบ็อกซ์ (HMG boxes)

โครงสร้างของเอชเอ็มจีบี (HMGBs) ประกอบด้วย 3 ส่วน (Domain) ได้แก่ เอชเอ็มจีบอกซ์ (HMG boxes) ซึ่งเป็นส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domains) มีลักษณะเป็นรูปตัวแอล ซึ่ง เอชเอ็มจีบีบ็อกซ์ แบ่งเป็น เอชเอ็มจีบอกซ์เอ (HMG box A) และ เอชเอ็มจีบอกซ์บี (HMG box B) แต่ละส่วนของเอชเอ็มจีบอกซ์มีขนาดหน่วยอะมิโนประมาณ 75 ยูนิต และส่วนปลายด้านซี (C-terminal) ที่มีฤทธิ์เป็นกรด (Acidic tail) มีขนาดหน่วยอะมิโนประมาณ 30 ยูนิต

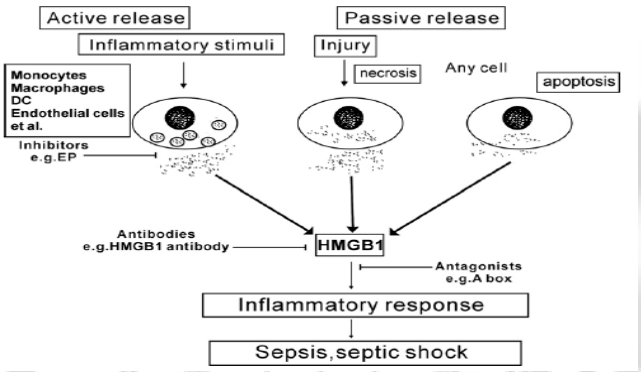
ยีนเอชเอ็มจีบี1 ในมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 13q12 เอชเอ็มจีบี1 สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding domains) และมีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ ทำหน้าที่คงสภาพนิวคลิโอโซม (Nucleosomes) และควบคุมแสดงออกของยีน (Gene transcription)



ภาพประกอบ 1 แสดงโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1[11]

การหลั่งและบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1

เซลล์สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ได้ 2 วิธี คือ แอกทีฟซิคริชั่นซึ่งเป็นการหลั่งเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นเช่นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ เอชเอ็มจีบี1 ถูกขับออกจากนิวเคลียสด้วยขบวนการอะซิติวเลชั่น (Acetylation) และถูกบรรจุขับออกนอกเซลล์ด้วยกระบวนการเอ็กโซไซโตซิส (exocytosis) ในสภาวะปกติตรวจไม่พบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในพลาสมา แต่เมื่อมีการอักเสบจะพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1ได้ถึง 83.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[5] เอชเอ็มจีบี1 ถูกหลั่งในอีกรูปแบบหนึ่งเรียกว่า แพสซีฟซิคริชั่น ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเกิดการตายของเซลล์แบบเนคโครซิสและอะพอพโตซิส[10] เซลล์ที่สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ได้แก่ โมโนไซต์ แมกโครฟาจ เด็นไดรติกเซลล์ (Dendritic cell) นิวโทรฟิล (Neutrophil) เซลล์บุผิว (Epithelial cell) เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial cell) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cell)[9,12-14] นอกจากนี้เซลล์ภายในช่องปากที่สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1ได้ ได้แก่ ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์



ภาพประกอบ 2 แผนผังแสดงการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ด้วยวิธีแอกทีฟซิคริชั่นและแพสซีฟซิคริชั่น[11]

เป็นที่น่าสงสัยในบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ โดยพบการหลั่งไซโตไคน์ภายหลังกระตุ้นเซลล์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 หรือพบการทำงานของเอชเอ็มจีบี1 ในลักษณะการเสริมฤทธิ์สารกระตุ้นอื่นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ออกมามากขึ้น Andersson และคณะในปี 2000[6] ได้ทำการทดลองกระตุ้นโมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ด้วยความเข้มข้นถึง 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบการหลั่งทูเมอร์-เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา เมื่อกระตุ้นโมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไป โดยมีการแสดงออกเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 ที่ใช้กระตุ้น นอกจากนี้ยังพบไซโตไคน์ชนิดอื่นอีกได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-1แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6, อินเตอร์ลิวคิน-8 การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย Wang และคณะในปี 1999[2] ได้ค้นพบบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1 โดยพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากกระตุ้นโมโนไซต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และจากการทดลองในสัตว์ทดลอง ได้

มีการฉีดแอนติเอชเอ็มจีบี1 (Anti-HMGB1) พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลองได้ เอชเอ็มจีบี1 ยังสามารถทำงานเสมือนโปรตีนช่วยจับ(Binding Protein) โดยสามารจับกับไลปิด เอ ของไลโปโพลีแซคคาไรค์ของแบคทีเรียต่างๆ เช่น ซาโมเนลล่า(Salmonella) และ อีโคไล (E. Coli)[15] ทำให้เกิดการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่ทำให้เชื่อได้ว่า เอชเอ็มจีบี1 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่มีลักษณะการอักเสบ โดยพบเอชเอ็มจีบี1 มากขึ้นในรอยโรคไขข้ออักเสบ (Arthritis)[7,8] ภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด (Sepsis)[16] ภาวะความเสียหายของปอด (Acute lung injury)[17] งานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า เอชเอ็มจีบี1 ส่งสัญญาณผ่านตัวรับสัญญาณ คือ ตัวรับสัญญาณแอดวานซ์ไกลเคชั่น (Receptor for advanced glycation end product: RAGE) และตัวรับสัญญาณโทล-ไลค์ 2, 4 (Toll-like receptor 2,4)[13,18] และเกิดการส่งสัญญาณผ่านไมโตเจนแอกติเวทเต็ท โปรตีน ไคเนส (mitogen-activated protein (MAP) kinase) พลาสมิโนเจน แอกติเวชั่น (Plasminogen activation) กวาโนซีน ไตรฟอสฟาเทส (Guanosine triphosphatases) Cdc42 และ นิวเคลียแฟกเตอร์ แคปป้า บี (Nuclear factor KB ;NF-kB)[19,20] ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ดังตาราง 1

ตาราง 1 บทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ[16]

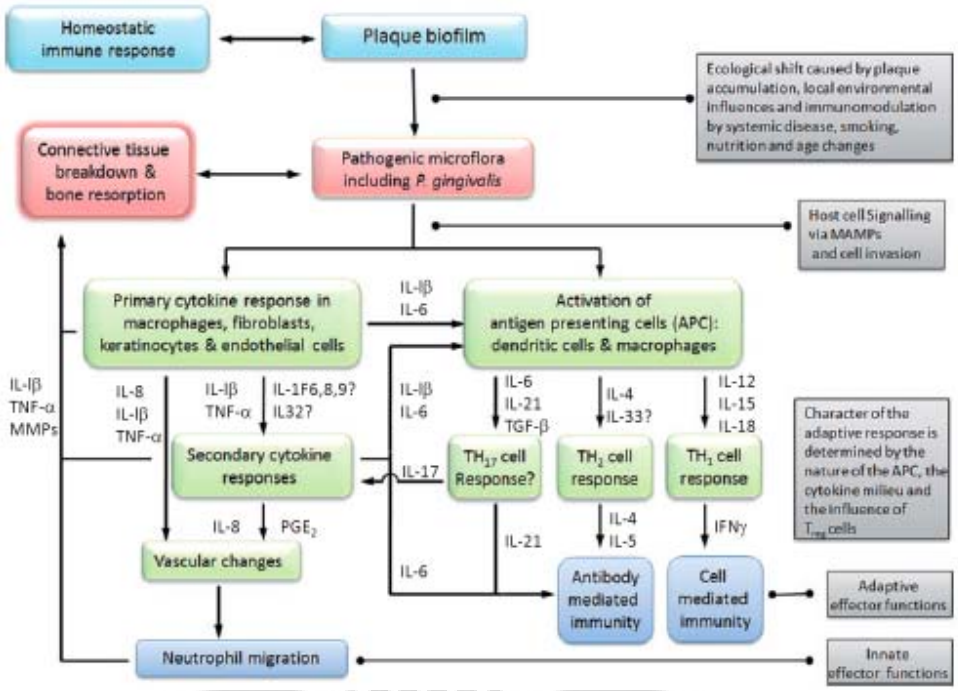
Cells	HMGB1	Effects
macrophages/monocytes	1. Increase TNF mRNA and protein release; increase iL-1〈, ®, IL-RA, IL-6, IL-8, MIP-1〈 and Ⓡ release 1. Release after LPS stimulation	Inflammation
Endothelial cells	Induces expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and RAGE; induces cytokine release (TNF and IL-8) and expression of MCP-1, tPA, and PAI-1	Increase neutrophil adhesion, inflammation, regulation of fibrinolysis
Neutrophils	Increase TNF,IL-1Ⓡ and IL-8 gene expression	Inflammation
Epithelial cells	Increase enterocyte permeability	Increase bacterial translocation

ตาราง 1(ต่อ)

Cells	HMGB1	Effects
Dendritic cells	1. Increase TNF, IL-1Ⓡ, IL-6, IL-8, and IL-12 release 2. Increase CD-40, CD54, CD58, CD80 and CD83 expression	Dendritic cell maturation
Smooth muscle cells	Cause cell migration and cytoskeleton reorganization	Chemotaxis
Tissue	Effects	
Brain	Induces fever, anorexia, taste aversion, and weight loss; induces brain cytokine expression (TNF, IL-1 and IL-6)	
Lung	Cause acute lung injury, increased pulmonary levels of TNF, IL-1Ⓡ and MIP-2, lung edema and neutrophil accumulation.	
Intestine	Cause intestinal barrier of dysfunction and bacterial translocation	
Joints	Induces arthritis and inflammation	
Heart	Arrhythmia	
Others	Bactericidal activity	

เป็นที่ทราบดีว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเป็นปัจจัยความรุนแรงของแบคทีเรียที่กระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ได้ โดยเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ส่วนนอก

ของแบคทีเรีย ประกอบด้วยไลปิด เอ (Lipid A) คอร์ โพลีแซคคาไรค์ (Core Polysaccharide) และโอแอนติเจน (O Antigen) ในทางทันตแพทยศาสตร์พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิสสามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิด รวมถึงไซโตไคน์ที่ผู้วิจัยต้องการศึกษาคือ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมานี้จะไปกระตุ้นเซลล์ต่างๆ ให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ออกมาเพิ่มขึ้น และทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองโดยมีการหลั่งเอนไซม์ต่างๆออกมา เช่น ไลโซไซม์ คอลลาจิเนส ทำให้เกิดการอักเสบและนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบได้ดังแสดงใน ภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 แผนผังแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียโดยมีการหลั่งไซโตไคน์ ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูก[21]

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

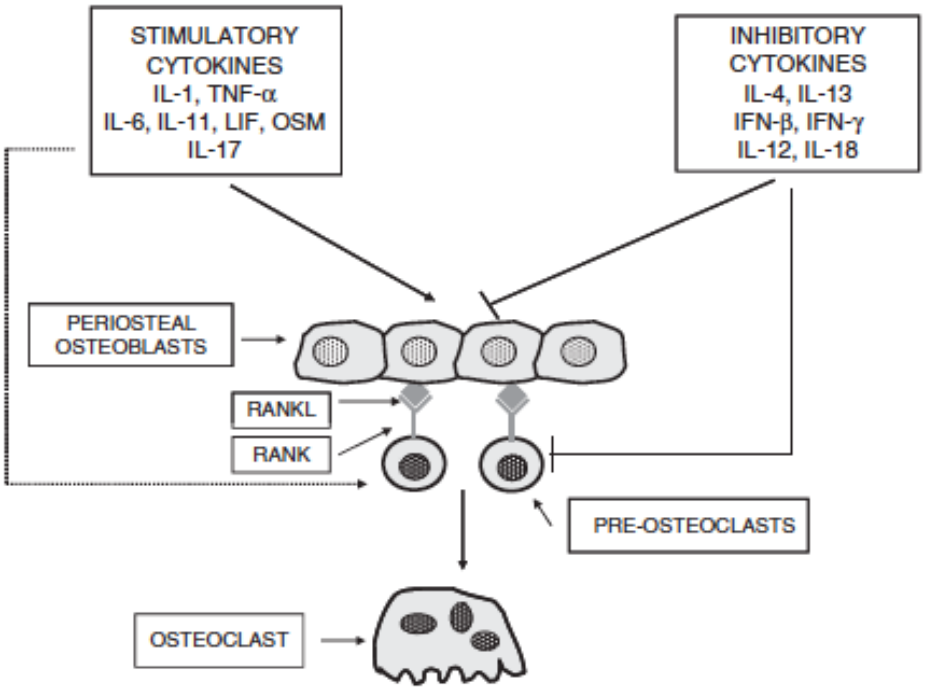
ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha; TNFα) มียีนอยู่บนโครโมโซมมนุษย์ที่ 6p21.3 มีขนาดโมเลกุลกรดอะมิโน 233 ยูนิต ในปี 1969 Granger และคณะ[22] ได้ค้นพบลิมโพท็อกซิน (lymphotoxin) ซึ่งถูกหลั่งจากลิมโพไซต์ (Lymphocyte) ทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ ปี 1975 Carswell และคณะ[23] พบไซโตไคน์อีกชนิดหนึ่งซึ่งถูกหลั่งโดยแมคโครฟาจสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบเนคโครซิสเรียกว่า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ พบว่าทั้งลิมโพท็อกซิน

และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ มีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกันจึงมีการเปลี่ยนชื่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์และลิมโพทอกซินเป็น ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และทูเมอร์เนคโคร ซิสแฟกเตอร์ เบต้า (Tumor necrosis factor- β;TNF- β) การศึกษาต่อมาได้มีการค้นพบไซโตไคน์อีกมากที่มีความคล้ายคลึงกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ จึงมีการจัดหมวดหมู่ขึ้นเรียกว่า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ ซูปเปอร์แฟมิลี่ (Tumor necrosis factor superfamily) โดยในปี 2008 ได้มีการประชุมนานาชาติเกี่ยวกับทีเอ็นเอฟ (International TNF Conference)[24] โดยทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์อยู่ในซูปเปอร์แฟมิลี่ที่ 2 มีบทบาทและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์มากมาย ทั้งในด้านการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์หรือเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยหนูทดลองที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมเอายีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ออก จะได้รับการติดเชื้อจากโปรโตซัวชนิด Leishmania ได้ง่าย[25] นอกจากนี้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา ยังมีบทบาทต่อการควบคุมการนอนหลับ[26] พัฒนาการของตัวอ่อน[27] ควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ (Differentiation) มีส่วนในการสร้างอวัยวะ (Organogenesis) และการเจริญใหม่ (Organogenesis and regeneration) มีการส่งสัญญาณร่วมในกระบวนการโฮมิโอสะแตซิส (Homeostasis) และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immune response) เกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบและอะพอพโตซิส (Mechanisms of inflammation and apoptosis)

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟามีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยพบปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์เพิ่มขึ้นในรอยโรคปริทันต์อักเสบ[28] และตรวจพบทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาความเข้มข้นสูงในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[29] Roberts และคณะในปี 1997[30] พบปริมาณของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์เอ็มอาร์เอ็นเอ (Tumor necrosis factor alpha mRNA) ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมากกว่ากลุ่มที่ปราศจากโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟากระตุ้นให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ ลิมโพไซค์ แมกโครฟาจ หลั่งไซโตไคน์ชนิดอื่นออกมาอีก เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-11 อินเตอร์ลิวคิน-8 พลอสตาแกลนดิน นอกจากนี้ ยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอดฮีชั่นโมเลกุล (Adhesion molecules) เช่น ICAM-1[31] มากขึ้นและกระตุ้นให้เพิ่มการสร้างเอนไซม์ในการย่อยเหงือก เช่น เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสชนิดต่างๆ ได้แก่ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1[32] คอลลาจิเนส2 (Collagenase 2)[33] และคอลลาจิเนส3 (Collagenase 3) (MMP-13)[34,35] นอกจากนี้ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟายังมีส่วนในการควบคุมต่อการละลายของกระดูก โดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ออสทิโอคลาส (Osteoclast) ได้แก่ เอ็ม-ซีเอสเอฟ (M-CSF) และ รีเซบเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟ นิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปป้า บี (Receptor activator of nuclear factor kappa-B)[36,37] ทำให้ออสทิโอคลาสพรีเคอเซอร์เซลล์ (Osteoclast precursor) เจริญเป็นเซลล์สลายกระดูก (Adult osteoclast)

อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า

อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า (Interleukin-1 β; IL-1 β) เป็นไซโตไคน์อยู่ในกลุ่มอินเตอร์ลิวคิน-1 แฟมิลี (Interleukin family) ซึ่งประกอบด้วย อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา (Interleukin-1 α; IL-1 α) อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า (Interleukin-1 β; IL-1 β) อินเตอร์ลิวคิน-1รีเซปเตอร์แอนทาโกนิส (Interleukin-1 receptor antagonist; IL-1ra) ยีนอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ในมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 2q14 เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทหลากหลาย ทำหน้าที่ร่วมกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ถูกหลั่งออกมาในรูปโปรโปรตีน (Proprotein) และจะถูกเปลี่ยนเป็นรูปแบบที่สามารถทำงานได้ด้วยเอ็นไซม์แคสเปส-1 (Caspase 1; CASP1/ICE) เมื่อเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ ไลโปโพลีแซคาไรด์ จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับสัญญาณโทล-ไลค์ 4 (TLR 4)[38] ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองโดยเพิ่มการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1[39] ทำให้เพิ่มการสร้างแอดฮีชั่นโมเลกุล ได้แก่ เอ็นโดธีเลียล ลิวโคไซค์ แอดฮีชั่น โมเลกุล (Endothelial leukocyte adhesion molecule) อินเตอร์เซลลูลาร์ แอดฮีชั่นโมเลกุล (Intercellular adhesion molecule) และวาสคูล่าแอดฮีชั่นโมเลกุล (Vascular adhesion molecule)[40] ทำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบ สามารถเข้าสู่บริเวณที่มีพยาธิสภาพได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ยังมีผลให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องเกิดการตอบสนอง ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อและการทำลายกระดูกเบ้าฟันโดยเพิ่มการหลั่งโพรสตาแกลนดินอี2[41] (Prostaglandin E2; PGE2) และเมื่อใช้หน่วยรับสัญญาณชนิดไม่ติดกับเซลล์ (Soluble receptor) พบว่า สามารถลดการทำลายกระดูกเบ้าฟันได้ 60% ลดการสร้างออสซิโอคลาสได้67%[39] นอกจากนี้พบว่า รอยโรคปริทันต์จะพบปริมาณอินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้าเพิ่มขึ้น[42] อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า สามารถกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ มีการแสดงออกของเอนไซม์คอลลาจิเนส[43-45] และลดการผลิตคอลลาเจน[46] นอกจากนี้อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และทูเมอร์-เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา ยังมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการละลายของกระดูก โดยมีผลต่อการแสดงออกของรีเซบเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟ นิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปป้า บี ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ออสทิโอบลาสต์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพรีออสทิโอคลาสเป็นออสทิโอคลาสดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 แสดงบทบาทของไซโตไคน์ต่อการเปลี่ยนแปลงของพรีออสทิโอคลาสไปสู่เซลล์สลายกระดูก[47]

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 (Matrix metalloproteinase-I)

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เป็นเอนไซม์ในร่างกาย ชนิดคอลลาจิเนส (Collagenases) ยีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 11q22.3 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 มีบทบาทต่อการเคลื่อนย้ายของเซลล์สภาวะปกติและเมื่อมีพยาธิสภาพ[45] จะมีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสมากขึ้น เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทได้แก่คอลลาเจนชนิดที่ 1, 3 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโปรตีนเมทริกนอกเซลล์ (Extracellular Matrix : ECM)

โครงสร้างของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสประกอบด้วย 2 ส่วนหลักๆ ประกอบด้วยส่วนโปรโดเมน (Pro-domain) เป็นส่วนควบคุมการทำงานของเอนไซม์โดยมกรดอะมิโนซีสเตอีนจับกับสังกะสี ทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน เรียกตำแหน่งนี้ว่า ซิสเตอีนสวิทซ์ (Cysteine switch) โครงสร้างอีกส่วนของเมทริกซ์-เมทัลโลโปรตีเนสคือแคตตาไลติก โดเมน (Catalytic Domain) ซึ่งเป็นส่วนที่เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทำให้เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสับเสตรทต่างกัน ได้มีการแบ่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสเป็น 4 กลุ่มย่อยได้แก่ คอลลาจิเนส (Collagenases : MMPs-1, 8, 13) เจลลาติเนส (Gelatinase : MMPs-2, 9) สโตรมีไลซิน (Stromelysin: MMPs-3, 10, 11, 19) และเมมเบรนบาวนไทป์(Membrane bound-types MMP : MMPs-14, 15, 16, 17, 24, 25)[45]

เซลล์ที่สามารถหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ได้แก่ ไฟโบรบลาสต์ เคราติโนไซต์ เซลล์เยื่อบุผิว ออสทิโอบลาสต์ คอนโดไซต์ โมโนไซต์หรือแมกโครฟาจ[48,49] ซึ่งจะถูกหลั่งออกมาในรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำงานได้เรียกว่า ไซโมเจน (Zymogen) และจะทำงานเมื่อได้รับการกระตุ้น ทำให้มี

การตัดพันธะระหว่างกรดอะมิโนซีสเตอีนกับสังกะสี ทำให้เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสสามารถทำงานได้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไซโตไคน์ ฮอร์โมน และชีวเคมีสารในร่างกายที่สามารถกระตุ้น หรือยับยั้งการสร้างเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสดังที่ได้สรุปใน ตาราง 2

ตาราง 2 แสดงสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นและยับยั้งการสร้างเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส[50]

Induction		Repression
growth factor	other	
IL-1 α,β	TGA	Glucocorticoids
TNFα	Okadaic acid	Progesterone
TGFα	Bacterial LPS	TGFβ
EGF	PGE_2	Retinoids
PDGF	Con A	cAMP
bFGF	cAMP	IFN-γ
NGF	PTH	
TGF β		

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ ในการวิจัยครั้งนี้ ได้เตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จากฟันผู้ป่วย 2 ราย ที่ได้รับการถอนฟันจากการผ่าฟันคุดหรือจัดฟัน โดยฟันซี่นั้นและเนื้อเยื่อโดยรอบไม่พบพยาธิสภาพใดๆ นำฟันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (Phosphate Buffer Saline; PBS) หลายๆ ครั้ง จนปราศจากเลือดและสิ่งเจือปน ใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 11 ตัดชิ้นเหงือกที่ติดกับฟันออกเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อเหงือก และใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 11 ขูดเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บริเวณผิวรากฟันส่วนกลาง เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ แยกเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco Modified Eagle's Medium:DMEM) ที่เติม10% Fetal calf serum, 2 mM L-Glutamine,100 units/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomysin) เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รอจนเซลล์เจริญออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง ทำการขยายจำนวนเซลล์โดยการถ่าย (Subculture) เซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1 : 3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอ็นไซม์ Trypsin-EDTA เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3 – 8

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

การเตรียมสารที่ใช้กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์และไพรเมอร์ เพื่อใช้ในขั้นตอนโพลีเมอเรสเชนรีแอ็กชั่น

การเตรียมเอชเอ็มจีบี1

เตรียมรีคอมบิแนนท์เอชเอ็มจีบี1จากบริษัท SIGMA-ALDRISH®, St. Louis, MO, USA นำมาเตรียมความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในน้ำปราศจากเชื้อ (Sterile dH_2O) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาวิส

เตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาวิส จากบริษัท Invivogen California, USA นำมาเตรียมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในน้ำปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -1 และแกปดีเอช (glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า, เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 และแกปดีเอช จากบริษัท SIGMA-ALDRISH® มีลำดับเบส ดังนี้

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา[51]

Forward 5’ GAG CAC TGA AAG CAT GAT 3’

Reverse 5’ ATC AGG AAG GAG AAG AGG 3’ ขนาด 208 bp

แกปดีเอช[52]

Forward 5’ ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG 3’

Reverse 5’ CCA TCA CGC CAC AGT TTC C 3’ ขนาด 383 bp

อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า[53]

Forward 5’ ACA GAT GAA GTG CTC CTT CCA 3’

Reverse 5’ GTC GGA GAT TCG TAG CTG GAT 3‘ ขนาด 73 bp

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1[54]

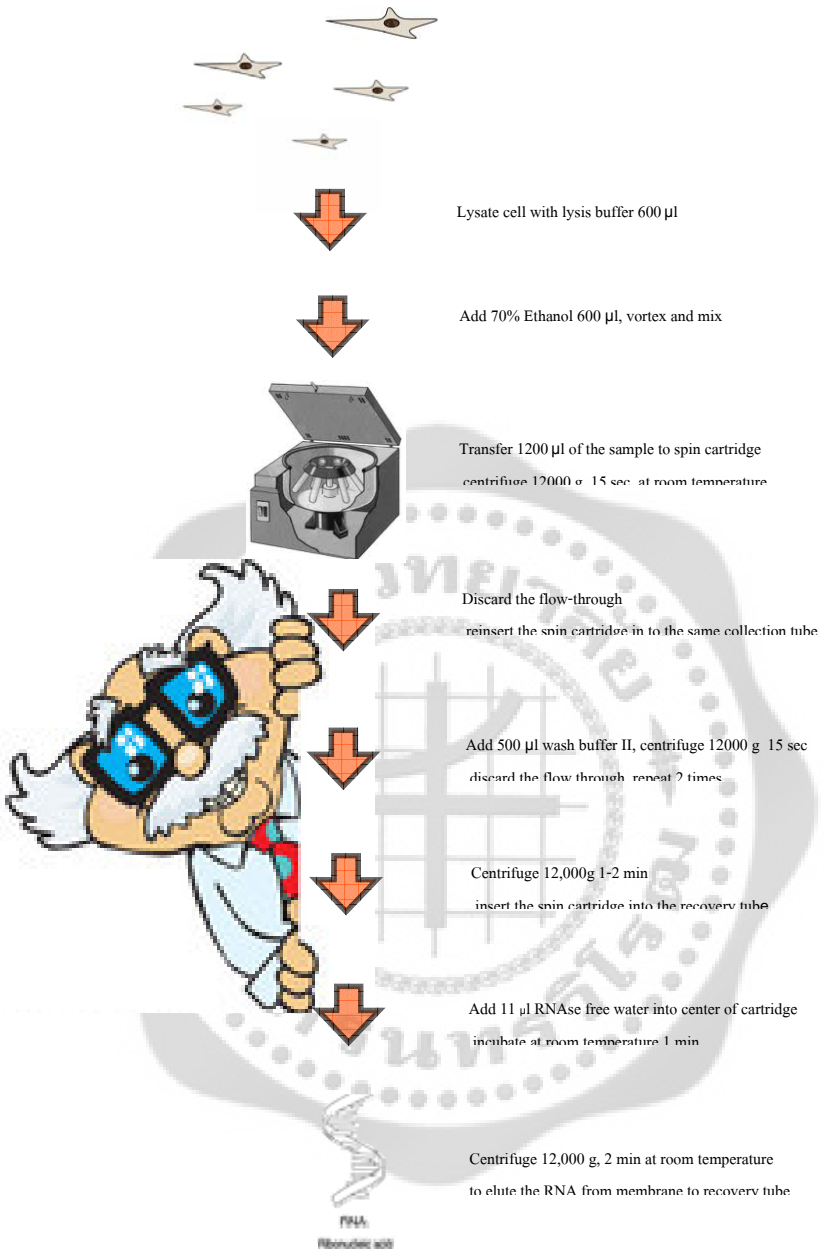
Forward 5’ CAC AGC TTT CCT CCA CTG CTG CTG C 3’

Reverse 5’ GGC ATG GTC CAC ATC TGC TCT TGG C 3’ ขนาด 396 bp

การจัดกระทำและรวบรวมข้อมูล

การกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

การวิจัยนี้ ทำการทดลองนำร่องเพื่อหาความเข้มข้นเมื่อทราบความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและเอชเอ็มจีบี1 ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้น (รายละเอียดในภาคผนวก) ทำการถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม ให้มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซรั่มของวัวร้อยละ 10 ปล่อยให้เซลล์มายึดที่จานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีซีรัมจากฟีตัสของวัว 1 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง ทำการกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วย 4 สภาวะ คือ 1) น้ำปราศจากเชื้อ 2) ไลโป-โพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3) เอชเอ็มจีบี1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 4) เอชเอ็มจีบี1ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการสกัดเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอ ภายหลังกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดแล้ว 4 ชั่วโมง ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Purelink mini RNA kit) โดยมีขั้นตอนดังแสดงใน ภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 แสดงขั้นตอนการสกัดเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (RevertAid TM first strand cDNA synthesis kit: Fermentas, Life sciences, california, USA) โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังแสดงในภาพประกอบ 6

RNA + Oligo(d)t 1µl

Ribonucleic acid

denature 65 •C 5 min, place on ice

buffer 4 µl,

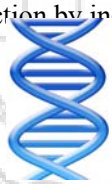
RNAse inhibitor 1µl,

dNTPs 2 µl,

RevertAids™ 1 µl

Incubate 60 min at 4 •C

stop reaction by incubating 5 min 70•C



cDNA

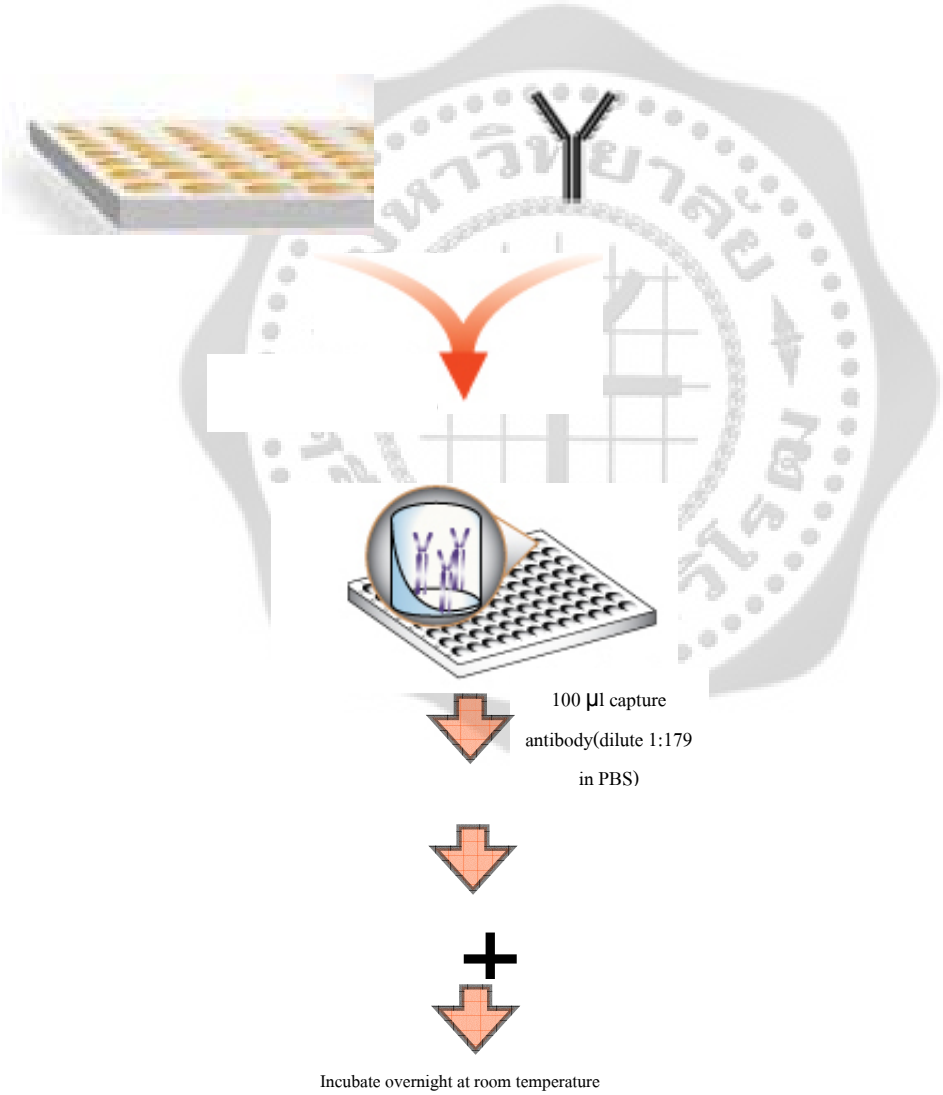
ภาพประกอบ 6 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบจากเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

วิเคราะห์การแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทั้ง 3 ด้วยเทคนิคเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น แต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบทำซ้ำ 3 ครั้ง การวิเคราะห์การแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค เรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น มีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร, สารละลายสำเร็จรูป (LightCycler 480 system; Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ สายละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำปราศจากเชื้อ 7 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น เมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหมุนเวียนอยู่ ณ อุณหภูมิ 3 ระดับ โดยใช้อุณหภูมิ Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ Annealing 58 องศาเซลเซียส

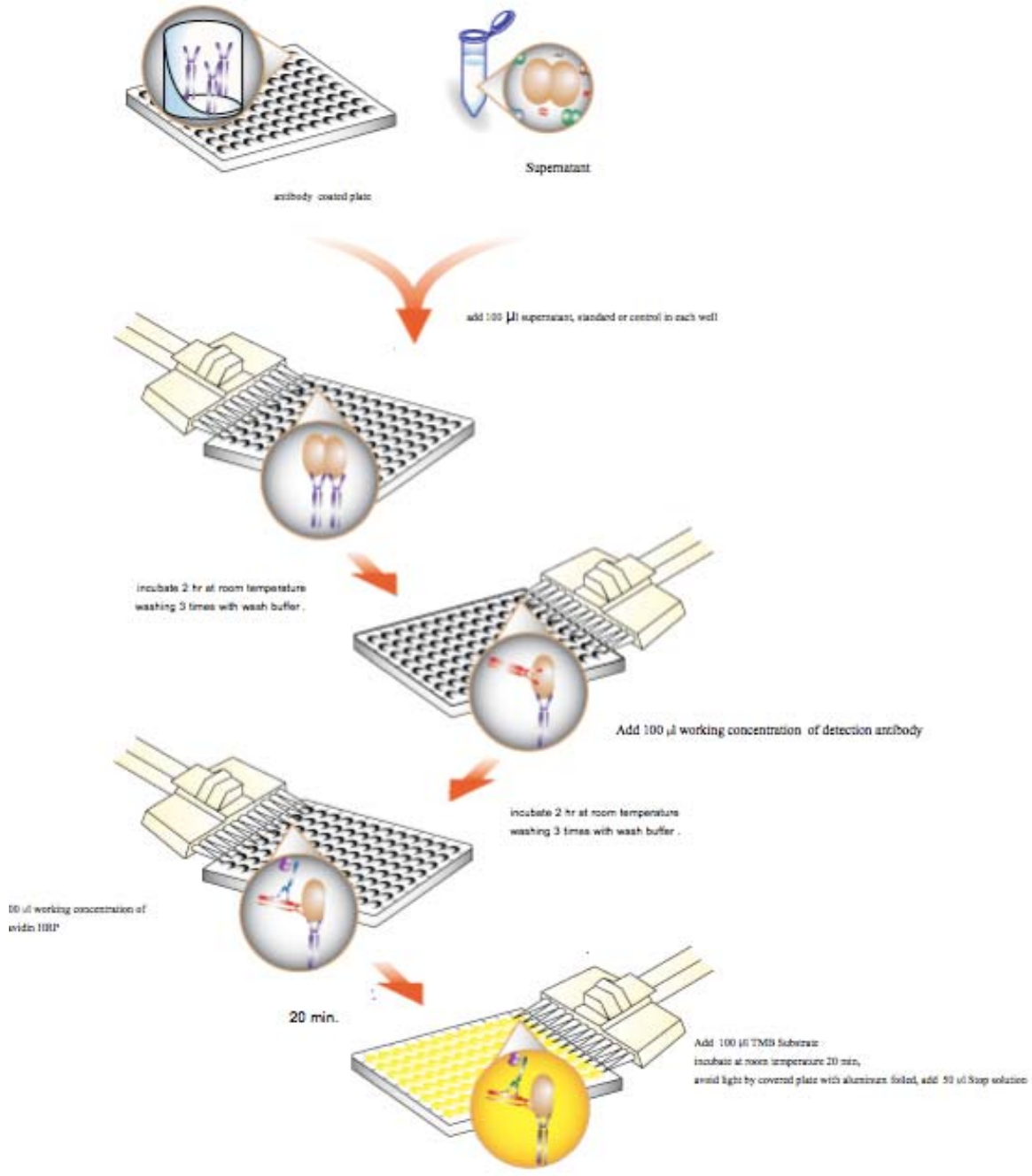
15 วินาที อุณหภูมิ Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Light Cycler® 480)

การตรวจหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยวิธีอีไลซ่า (ELISA) โดยใช้ชุดทดสอบอีไลซ่าสำเร็จรูป

วิเคราะห์การหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดแล้ว 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคอีไลซ่า ผู้ป่วย แต่ละรายทำซ้ำ 2 ครั้ง และแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยชุดทดสอบอีไลซ่าสำเร็จรูป (ELISA DuoSet, R&D systems, Minneapolis, USA) โดยจะต้องทำการเตรียมพื้นผิวหลุมทดลองด้วยการเคลือบแอนติบอดี้ตามขั้นตอนดัง ภาพประกอบ 7 และวัดปริมาณสารที่ต้องการทดสอบขั้นตอนการทดลองดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 7 แสดงการเตรียมพื้นผิวหลุมทดลองด้วยการเคลือบแอนติบอดี้



ภาพประกอบ 8 แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ด้วยเทคนิคอีไลซ่า

การตรวจหาปริมาณเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 30 : 70 ส่วนการตรวจปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นเซลล์ในอัตราส่วน 50 : 50 ส่วนการตรวจหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ไม่ทำการเจือจาง นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาแปรผลเป็นความเข้มข้นด้วยการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงจากหลุมทดสอบมาตราฐานโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Microsoft Excel for Mac 2011)

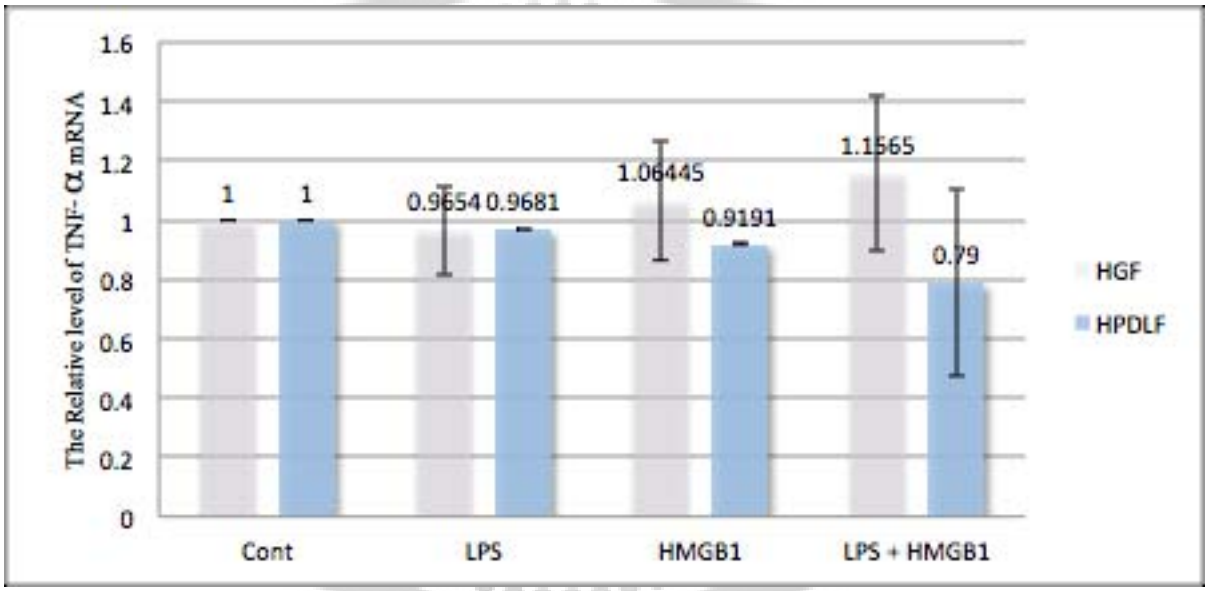
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยสถิติพรรณา เปรียบเทียบความแตกต่างของการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มด้วยสถิติการวิเคราะห์การแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และสถิติ Bonferroni ที่นัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส 20.0 (SPSS 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

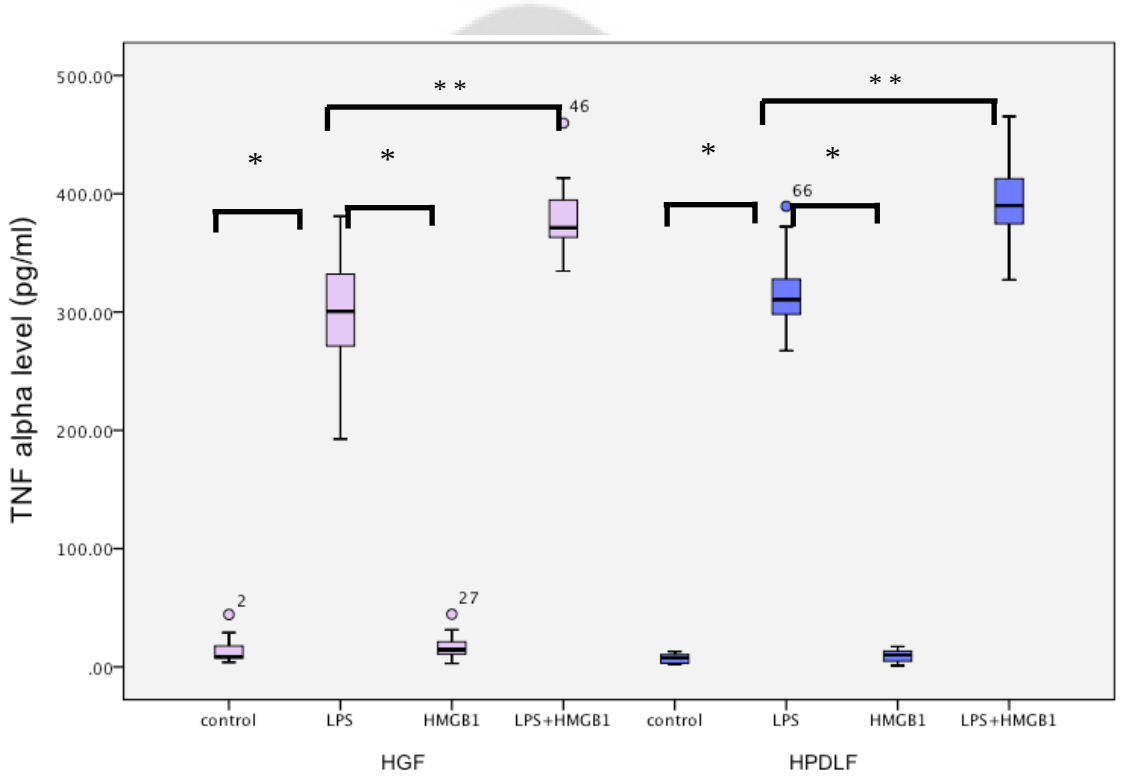
ผลของเอชเอ็มจีบี1 และ/หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอและการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

จากการตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ด้วยเทคนิค เรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น พบว่า เซลล์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและกระตุ้นร่วมกัน พบว่า ไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างชัดเจนดังแสดงใน ภาพประกอบ 9



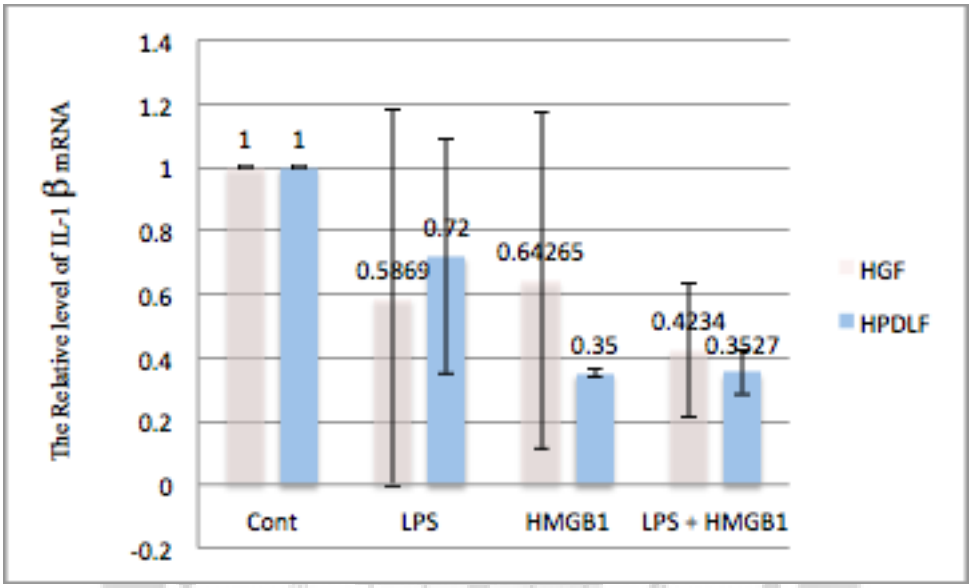
ภาพประกอบ 9 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟเตอร์ แอลฟา ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เหงือกเมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย

เมื่อตรวจสอบการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ออกมามากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว หรือเมื่อกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และพบการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิด มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในภาพประกอบ 10 และตาราง 3



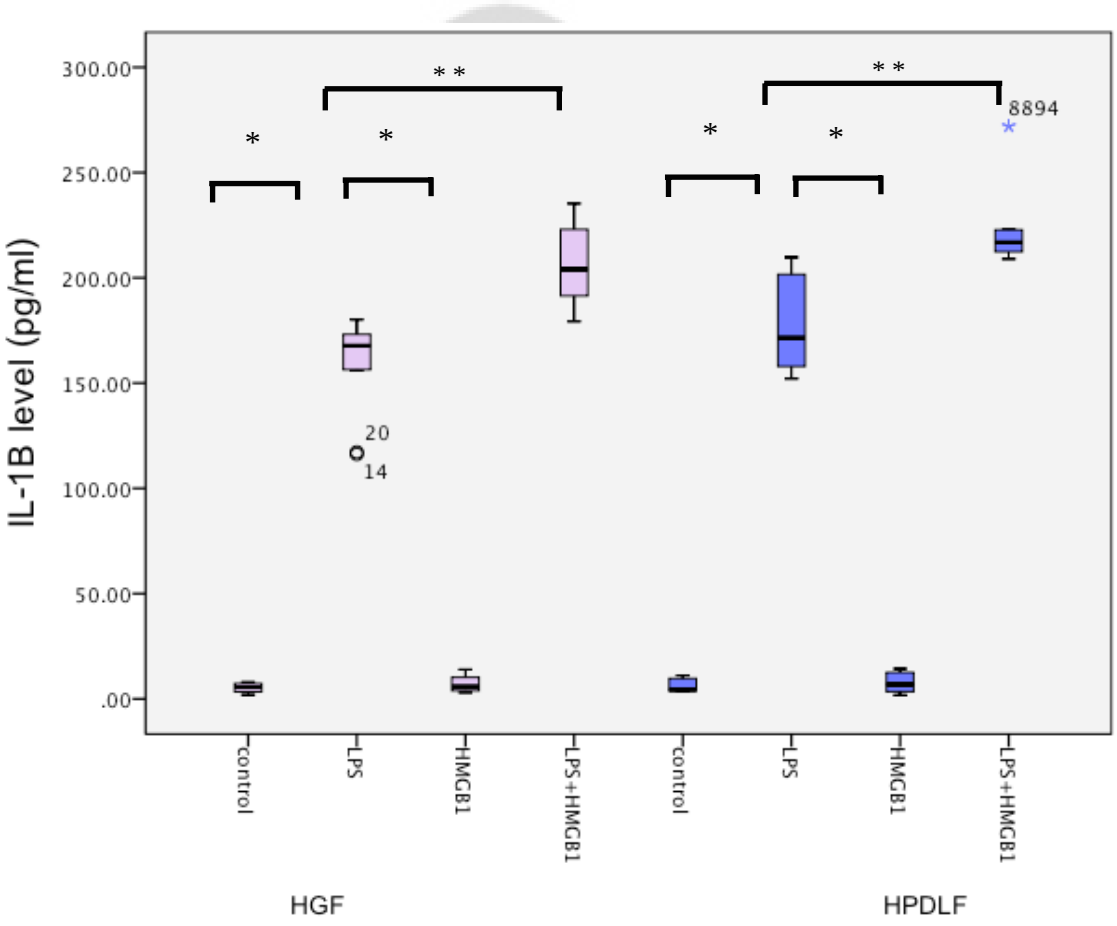
ภาพประกอบ 10 แผนภูมิแสดงการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกันทั้ง 2 ชนิด

ผลของเอชเอ็มจีบี1 และ/หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอและการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เซลล์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อได้รับการกระตุ้นมีการตอบสนองโดยมีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเออินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย

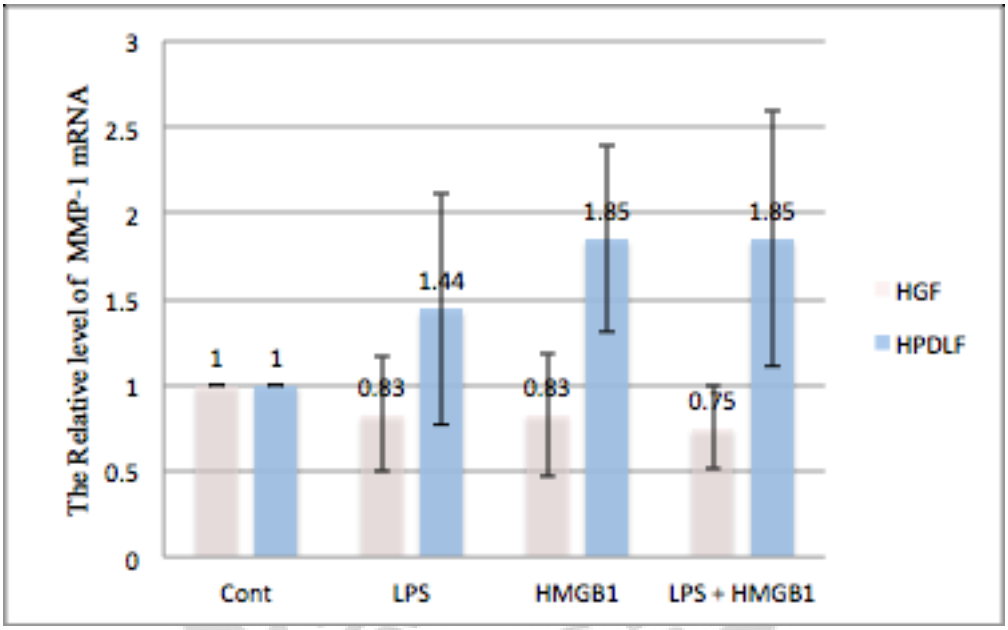
เมื่อตรวจสอบการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ออกมามากขึ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว หรือเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และพบการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิด มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในภาพประกอบ 12 และตาราง 3



ภาพประกอบ 12 แผนภูมิแสดงการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี**1** และกร

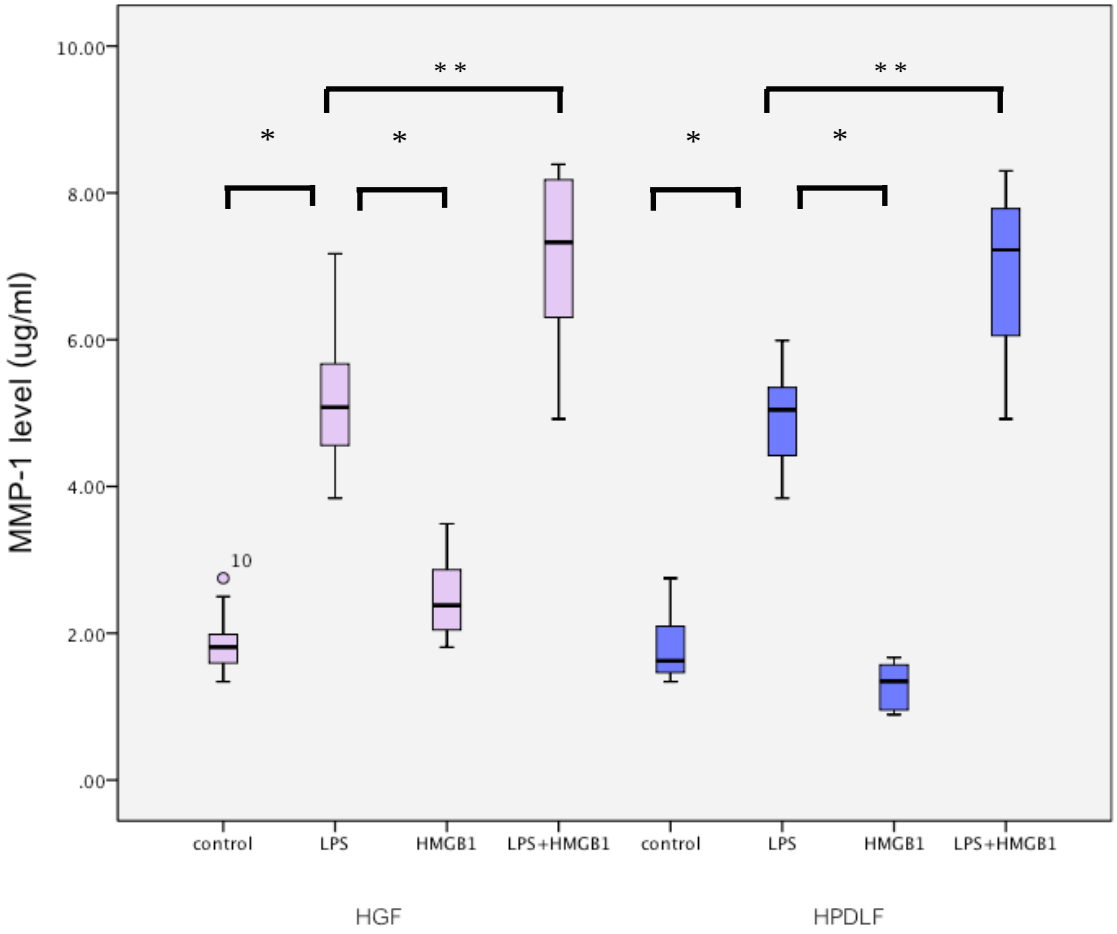
ผลของเอชเอ็มจีบี1 และ/หรือไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอและการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิส เป็น 1.44 เท่า เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 จะมีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ เป็น 1.85 เท่า และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน จะมีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอ 1.85 เท่า ส่วนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก พบว่า มีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอไมปรากฏความแตกต่างที่ชัดเจนดังแสดงใน ภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย

จากการตรวจสอบการหลั่งเมทริกเมทัลโลโปรตีเนส-1พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ออกมามากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และพบการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิด มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส



ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงการหลั่งเมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกัน

ตาราง 3 แสดงผลการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในสภาวะปกติและเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นพร้อมกันทั้ง 2 ชนิด

	Gingival Fibroblast	Periodontal ligament Fibroblast
TNF- α level (pg/ml)		
Control	13.87 ± 3.55	7.42 ± 1.14
LPS	297.89 ±16.29	318.02 ± 9.7
HMGB1	17.53 ± 3.26	9.34 ± 1.56
LPS + HMGB1	380.36 ± 9.29	390.37 ± 10.77
IL1- β level (pg/ml)		
Control	5.18 ± 0.63	6.09 + 0.92
LPS	160.16 ± 6.23	177.47 + 6.53
HMGB1	6.99 ± 1.09	7.53 + 1.36
LPS + HMGB1	206.90 ± 5.38	225.20 + 6.47
MMP1 level (ng/ml)		
Control	1.88 ± 0.12	1.80 + 0.14
LPS	5.18 ± 0.26	4.94 + 0.18
HMGB1	2.47 ± 0.15	1.29 + 0.90
LPS + HMGB1	7.12 + 0.33	6.92 + 0.32

Control กลุ่มควบคุมลบ

LPS กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

HMGB1 กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1

LPS+HMGB1 กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ร่วมกับเอชเอ็มจีบี1

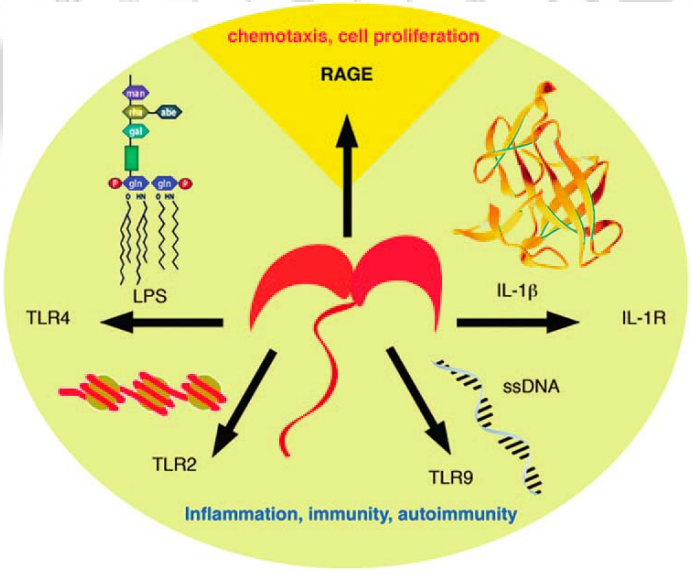
กล่าวโดยสรุปได้ว่า การกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เซลล์ทั้ง 2 ชนิดการตอบสนองโดยมีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในรูปแบบเดียวกันคือ มีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ออกมาแตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของ

พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกัน เซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ออกมาแตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มเอชเอ็มจีบี1 และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) แต่เมื่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1เพียงอย่างเดียว จะมีการหลั่งไซโตไคน์และเมทริกเมทัลโลโปรตีเนส-1 ออกมา ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ผลการแสดงออกในระดับเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอ ไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจน เมื่อกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 หรือ ไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และเมื่อกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

บทที่ 5
อภิปรายผลและบทสรุป

อภิปรายผล

เอชเอ็มจีบี1 เป็นโปรตีนที่พบในนิวเคลียสและสามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ มีการศึกษาว่าเอชเอ็มจีบี1 จะทำหน้าที่เสมือนเป็นไซโตไคน์ได้[2] โดยไปมีส่วนร่วมในพยาธิสภาพของการเกิดการอักเสบหรือการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้ เช่น พบมีการหลั่งสารทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ภายหลังทำการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ด้วยเอชเอ็มจีบี1[6] เป็นต้น อย่างไรก็ดี การศึกษาในระยะหลังยังพบอีกว่า ปริมาณสารไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาภายหลังกระตุ้นเซลล์ต่างๆ ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ดูเหมือนจะมีปริมาณที่น้อยมาก[55] อีกทั้งยังตรวจพบว่ามีเอชเอ็มจีบี1 หลงเหลืออยู่ในรอยโรคที่แม้ว่าจะได้รับการรักษาให้ดีขึ้น เช่น พบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในพลาสมาในผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่ได้รับการรักษาแล้วถึง 176 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[56] และไม่สามารถตรวจหาปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในพลาสมาได้ในภาวะปกติ จึงทำให้เห็นว่าบทบาทของของเอชเอ็มจีบี1 ในการเป็นไซโตไคน์ยังไม่เด่นชัดนัก การศึกษาในระยะต่อมาพบว่า เอชเอ็มจีบี1 จะทำหน้าที่เสมือนเป็นไซโตไคน์ได้ เมื่อมีการทำงานร่วมกับสารอื่นๆ เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ดีเอ็นเอสายเดี่ยว[57] ซึ่งสามารถสรุปได้ ดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 แผนผังแสดงบทบาทหน้าที่ของเอชเอ็มจีบี1เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และการทำงานที่ต้องร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์[57]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอชเอ็มจีบี1 ยังสามารถทำหน้าที่เสมือนโปรตีนช่วยจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ และทำให้เกิดการส่งสัญญาณต่อไปยังเซลล์ผ่านทางตัวรับโทล-ไลค์ 2, 4 ตัวรับสัญญาณแอดวานซ์ไกลเคชั่น[58] กระตุ้นให้เซลล์เกิดการหลั่งไซโตไคน์ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เอชเอ็มจีบี1 สามารถทำหน้าที่แย่งจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ บายดิ้ง โปรตีนในการส่งสัญญาณให้กับเซลล์ ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทดลองกระตุ้นเซลล์โดยมีเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลี-แซคคาไรด์ก็จริง จึงอาจถือว่า มีการปนเปื้อนของบายดิ้งโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโบวาย เซรั่ม อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้ ไม่ได้ทำการตรวจสอบการแย่งจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ระหว่างโปรตีน ทั้ง 2 ชนิด เพียงแต่ได้ทดลองนำร่องความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์และเอชเอ็มจีบี1 ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เท่านั้น ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในช่องปาก มีการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นที่ไม่แน่นอนของไลโปโพลีแซคคาไรด์ บายดิ้ง โปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในโบวายเซรั่ม อย่างไรก็ตาม พบว่าการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้นที่สูงจะสามารถยับยั้งผลในด้านลบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ บายดิ้งโปรตีนได้[59]

ในทางทันตแพทยศาสตร์ ได้มีการวิจัยเกี่ยวกับบทบาทและความสำคัญของเอชเอ็มจีบี1 อยู่บ้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ การวิจัยส่วนใหญ่มุ่งที่จะศึกษากับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เนื่องจากเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในอวัยวะปริทันต์ ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างเส้นใยคอลลาเจน อันเป็นองค์ประกอบหลักของอวัยวะปริทันต์ นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหล่านี้ก็สามารถหลั่งไซโตไคน์หรือเอ็นไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย[60-62] ซึ่งเซลล์สามารถตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค เช่น พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส โดยมีการหลั่ง ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ได้[63,64] ซึ่งสนับสนุนว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จะเป็นเซลล์ที่สำคัญในขบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์เช่นเดียวกับเซลล์ชนิดอื่นๆ[65]

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส หรือเมื่อเกิดมีการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อ ไม่ว่าจะในรูปแบบเนคโครซิส หรือแบบอะพอพโตซิสก็ตาม[5,10] จึงเป็นที่น่าสงสัยว่า เอชเอ็มจีบี1 ที่ถูกหลั่งออกมานั้น จะมีผลอย่างไรต่อเซลล์ที่อยู่ในบริเวณรอยโรคนั้นๆ อีก และทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ให้รุนแรงขึ้นด้วยหรือไม่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของการใช้เอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคที่มีความรุนแรงที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ให้เกิดการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 โดยเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้การกระตุ้นด้วยสารอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการวัดปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยมีผลการวิจัย

นำร่องที่แสดงการตรวจวัดปริมาณที่เวลาดังกล่าวที่ได้ผลดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการวัดภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไปเพียง 24 ชั่วโมง

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาและอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า มีส่วนสำคัญต่อการการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยพบปริมาณไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้นในรอยโรคปริทันต์[28] น้ำเหลืองเหงือก[29] ซึ่งในการทดลองนี้พบปริมาณไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 มากกว่ากระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานการวิจัยข้างต้น และสอดคล้องกับการวิจัยของ Qin และคณะในปี 2009 ทำศึกษาในเซลล์แมกโครฟาจของหนู พบทั้งการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ และการหลั่ง อินเตอร์ลิวคิน 6 ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และพบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเออินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของอีโคไลและเอชเอ็มจีบี1 แตกต่างจากกระตุ้นด้วยสารเพียงชนิดเดียว[58] ไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งเพิ่มขึ้นนั้น ก็จะมีผลต่อเซลล์ในร่างกาย มีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอินเนท ทำให้เซลล์มีการตอบสนองโดยมีการหลั่งไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบต่างๆ ออกมา ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตาม นอกจากไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดที่ได้ทำการศึกษาแล้ว ยังมีไซโตไคน์หรือเอนไซม์ตัวอื่นที่น่าสนใจศึกษาและมีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 รีเซบเตอร์ แอกติเวเตอร์ออฟ นิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปป้า บี (Receptor activator of nuclear factor kappa-B) โอพีจี (OPG) หรือตัวรับโทล-ไลค์ 1, 2, 4

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เป็นเอ็มไซม์ที่มีศักยภาพสูงในการทำลายเนื้อเยื่อ และเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยสามารถพบมีการสร้างและหลั่งออกจากเซลล์บ้างอยู่แล้วในสภาวะปกติ[66,67] ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ โดยพบมีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เพียงเล็กน้อยในกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้กระตุ้นเซลล์ด้วยสารใดๆ เลย รวมถึงการที่พบมีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เพียงอย่างเดียวด้วย ในขณะที่พบมีการหลั่งของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ที่สูงมากขึ้น เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั้ง 2 ชนิดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว และยิ่งสูงมากขึ้นกว่าอีกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อกระตุ้นด้วยทั้ง 2 อย่างร่วมกัน

ซึ่งผลการวิจัยนี้ น่าจะเป็นการสนับสนุนถึงการที่มีการตรวจพบ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเอ็นไซม์ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 นี้ได้ในรอยโรคปริทันต์อักเสบในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ปกติ[28.29,67] และยังเป็นการสนับสนุนผลการวิจัยที่ผ่านมาที่แม้จะศึกษากับเซลล์ของร่างกายชนิดอื่นๆ ก็ทำให้เชื่อได้มากขึ้นว่า เอชเอ็มจีบี1 จะสามารถทำหน้าที่เสมือนไซโตไคน์ได้ดี แม้กับเซลล์ในช่องปาก ก็จะต้องมีกลไกการทำงานที่ต้องร่วมกับสารโมเลกุลอื่น

ในการวิจัยนี้ นอกจากจะทำการวัดปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยเทคนิคอีไลซ่าแล้ว ยังทำการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับยีนที่สร้างทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยวิธีเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น อีกด้วย ซึ่งในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอนี้ ทำภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง เนื่องจากมีการวิจัยก่อนหน้านี้ มีการศึกษาในเซลล์โมโนไซต์ พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอในเซลล์โมโนไซต์ในระดับที่สูง ภายหลังการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่เวลาผ่านไปแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง[7] อย่างไรก็ตาม ผลการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ไม่ได้มีทิศทางที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันและไม่สอดคล้องกับการหลั่งโปรตีน ทั้ง 3 ชนิดเท่าใดนัก ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชน-รีแอคชั่น และกระบวนการเก็บเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการทดลองนำร่องทำการศึกษาการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ที่ 4 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นสอดคล้องกับการหลั่งโปรตีน อนึ่งอาจเกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการตอบสนองที่แตกต่างกันโดยพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการเพิ่มการแสดงออกของแมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ที่ 6 ชั่วโมง ภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส[64]

จากผลการแสดงออกที่ไม่เป็นทิศทางเดียวกันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในครั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์ไฟโบรบลาส์ทั้งสองชนิดมีที่อยู่ในเนื้อเยื่อ มีหน้าที่และมีคุณลักษณะธรรมชาติของเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น เซลล์ทั้งสองนี้ มีการแสดงออกของออสติโอแคลซินหรือโบนไซอะโลโปรตีน รวมถึงอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแตกต่างกัน[68] โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ มีการแสดงออกของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณที่สูง[69] ทำให้สามารถผลิตสารคล้ายโปรตีนเมทริกซ์ของกระดูก และสามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (mineralized nodules) ได้ดีกว่า ในขณะที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมีการแสดง ออกของตัวรับซีดี 14 ที่สูงกว่า จึงอาจทำให้เซลล์ทั้งสองนี้มีการแสดงออกเพื่อตอบสนองการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ได้แตกต่างกัน อนึ่งในการวิจัยนี้ ใช้เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ผู้ป่วยรายเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบ จะพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์จะมีการแสดงออกของแมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอที่ผลิตเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ได้มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก ทั้งในสภาวะปกติ และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นร่วมหรือกระตุ้นเพียงอย่างเดียว

บทสรุป

จากการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถเพิ่มการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ได้เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. Eur J Biochem 1973;21:14-19.
2. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 1999;285:248-251.
3. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression.Curr Opin Genet Dev 2003;13:170-8.
4. Nuntasenee K, Loasrisin N, Dhanesuan N. In Vitro effect of LPS on HMGB1 expression in Human Periodontal Ligament Fibroblast. Thai Pharm Health Sci J 2011; 6:175-81.
5. รุ่งทิวา ปันป่า, ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, นิรดา ธเนศวร. การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์. ปริญญานิพนธ์ ปริทันตวิทยา 2009.
6. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J Exp Med 2000;192:565-570.
7. Jiang W, Pisetsky DS. Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein 1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis. Nat Clin Pract Rheumatol 2007;3:52-58.
8. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. J Intern Med 2004;255:344-50.
9. Morimoto Y, Kawahara K-I, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. J Periodontal Res 2008;43:76-83.
10. Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y. Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. Oral Microbiol Immunol 2009;24:292-298.
11. Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. Cytokine 2010;51:119-126.
12. Charoonpatrapong K, Shah R, Robling AG, Alvarez M, Clapp DW, Chen S, et al. HMGB1 expression and release by bone cells. J Cell Physiol 2006;207:480-490.
13. Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. Eur J Immunol 2004;34:1503-1512.

14. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen J-X, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. J Biol Chem 1995;270:25752-25761.

15. Youn JH, OH YJ, Kim ES, Choi JE,Shin JS. High Mobility Group Box 1 Protein Binding to Lipopolysaccharide Facilitates Transfer of Lipopolysaccharide to CD14 and Enhances Lipopolysaccharide-Mediated TNF-α Production in Human Monocytes. J Immunuol 2008;180:5067–5074.

16. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. J Leukoc Biol 2005;78:1-8.

17. Lutz W, Stetkiewicz J. High mobility group box 1 protein as a late-acting mediator of acute lung inflammation. Int J Occup Med Environ Health 2004;17:245-254.

18. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. Scand J Immunol 2005;61:1-9.

19. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastases. Nature 2000; 405:354-360.

20. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. J Biol Chem 1991;266:16722-16729.

21. Taylor J. Cytokine regulation of immune response to Porphyromonas gingivalis. Periodontal 2000 2010;54:160-94.

22. Granger GA, Shacks, S.J., Williams, T.W., and Kolb, W.P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. Nature 1969;221:1155-1157.

23. Carswell EA, Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1975;72:3666-3670.

24. Ware CF. The TNF Superfamily-2008. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2008; 19:183-186.

25. Goldfeld A, Tsai E. TNF-alpha and genetic susceptibility toparasitic disease. Exp Parasitol 1996;84:300-303.

26. Krueger JM FJ, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. . Sleep.A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. Ann N Y Acad Sci 1998;856:148-159.

27. Wride MA SE. Potential roles for Tumour necrosis factor alpha during embryonic development. Anat Embryol 1995;191:1-10.

28. Rossomando EF KJ, Hadjimichael J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. Arch Oral Biol 1990;35:431-4.

29. Lee H, Kang I, Chung C, Choi S. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. J Clin Periodontol 1995;22:885-90.

30. Roberts FA MK, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adults periodontitis. J Dent Res 1997;76:1833-1839.

31. Vilcek J LT. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem 1991;266:7313-7316.

32. Hanemaaijer R KP, Le Clercq L, de Vree WJ, Van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. Biochem J 1993;296:803-809.

33. Hanemaaijer R ST, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. J Biol Chem 1997;272:31504-31509.

34. Johansson N WJ, Leppa S, Hakkinen L, Koivisto L,Lopez-Otin C, et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta. Cell Growth Differ 1997;8:243-50.

35. Uitto V, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins E, Firth J, et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. Am J Pathol 1998;152:1489-1499.

36. Hofbauer LC. Lacey D. L., Dunstan C. R., Spelsberg T. C., Riggs B. L., Khosla S. Interleukin-1b and tumor necrosis factor-a,but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone 1999;25:255-259.

37. Horwood NJ, Elliott, J., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. Endocrinology 1998;139:4743-4746.

38. Wang P, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:1161-1167.

39. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol 1998;160:403-409.

40. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1990;33:305-315.

41. Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. Arch Oral Biol 1988;33:237–243.

42. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M, Prostak L, Haffajee A, Socransky S. Levels of interleukin-1 β in tissue from sites of active periodontal disease. J Clin Periodontol 1991;18:548-554.

43. Ohshima M, Otsuka K, Suzuki K. Interleukin-l beta stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res 1994;29:421-429.

44. Harada. O, Suga T, Suzuki T, Nakamoto K, Kobayashi M, Nomiyama T, et al. The role of trophin in, an adhesion molecule unique to human trophoblasts, in progression of colorectal cancer. Int J Cancer 2007;121:1072-1078.

45. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993:474–484.

46. Irwin C, Schor S, Ferguson M. Effects of cytokines on gingival fibroblasts in vitro are modulated by the extracellular matrix. J Periodontal Res 1994;29:309-317.

47. Liu YC, Lerner UH, Teng YT.Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontol 2000 2010;54:163-206.

48. Westerlund U, Ingman T, P-L Lukinmaa. Human neutrophil gelatinase and associated lipokalin in adult and localized juvenile periodontitis. J Dent Res 1996;75:1553-1563.

49. Aiba T, NAkeno, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. Eur J Oral Sci 1996;104:562-569.

50. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix Metalloproteinases: A Review. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4:197-250.

51. CHEN DY, LAN JL, LIN FJ, HSIEH TY. Proinflammatory Cytokine Profiles in Sera and Pathological Tissues of Patients with Active Untreated Adult Onset Still's Disease. J Rheumatol 2004:11;2189-98.

52. Zhang Y, Ba Y, Liu C, Sun G, Ding L, Gao S, Hao J, Yu Z, Zhang J, Zen K, Tong Z, Xiang Y, Zhang C-H.PGC-1α induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARγ-dependent pathway. Cell Research 2007;17: 363–373.

53. Xu S, Lu H, Lin J, Chen Z, Jiang D.Regulation of TNFa and IL1b in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. Rheumatol Int 2010:30;1183–1189.

54. Takemura A, Nakagawa I, Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A. Inhibitory Effects of Tumor Necrosis Factor-Alpha on Migration of Human Periodontal Ligament Cells. J Periodontol 2006;77: 883-890.

55. Rouhiainen A., Tumova S, Valmu L,. Kalkkinen N, Rauvala H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). J Leukoc Biol 2007;81: 49–58.

56. Angus DC, Yang L, Kong L, Kellum JA, Delude RL, Tracey KJ, Weissfeld L. Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis. Crit Care Med 2007;35:1061-7.

57. Bianchi M.E. .HMGB1 loves company. J Leukoc Biol 2009;86:573-576.

58. Qin Y-H, Dai S-M, Tang G-S, Zhang J, Ren D, Wang Z-X, Shen Q.Hmgb1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through Receptor of Advance Glycation End Products.J Immunol 2009;183:6244-6250.

59. Ren L, Jiang ZQ, Fy Y, Leung WK, Lin L, J. The interplay of lipopolysaccharide binding protein and cytokine in periodontal health and disease. J Clin Periodontol 2009; 36:619–626.

60. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. Immunology 1992;76:42-47.

61. Takada H, Mihara JI, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-l and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides lipopolysaccharides. Infect Immun 1991;59:295-301.

62. Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi H. Stimulation by interleukin-l of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 1992;37:743-748.

63. Scheres N, Laine M.L., Sipos P.M., Bosch-Tijhof C.J., Crielaard W, De Vries T.J., Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with Porphyromonas gingivalis. J Periodont Res 2011;46: 407-416.

64. Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, Van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable Porphyromonas gingivalis. J Periodont Res 201045, 262–270.

65. Jonsson D. Nebel D. Bratthall G, Nilsson B-O. (2011). The human periodontal ligament cell: a fibroblastlike cell acting as an immune cell. J Periodont Res 2010;46:153–157.

66. Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. J Periodont Res 2009;44:125–132.

67. Cao Z, Li C, Xiang J. Effect of matrix metalloproteinase-1 promoter genotype on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-1 production in human periodontal ligament cells. J Periodont Res 2010;45: 109–1.

67. Ingman T,Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. J Clin Periodontol 1996;23:1127-1132.

68. Hatakeyama J,Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S and Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system.Oral Microbiol Immunol 2003;18: 14-23.

69. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M ,et al. Toll-like Receptor 4-Mediated Signal Pathway Induced by Porphyromoans gingivalis Lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:1161-1167.

ภาคผนวก

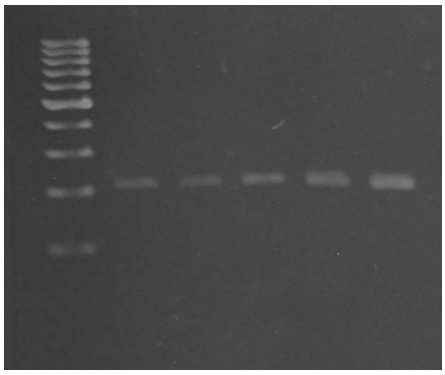
การทดลองนำร่องหาความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และเอชเอ็มจีบี1 ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม ให้มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมจากฟีตัสของวัวร้อยละ 10 ปล่อยให้เซลล์มายึดที่จานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมจากฟีตัสของวัว 1 เปอร์เซนต์ (1% FCS DMEM) เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส (InvivoGen, USA) ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1ที่เหมาะสม เมื่อกระตุ้นร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส โดยใช้เอชเอ็มจีบี1ความเข้มข้น 100, 200, 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการสกัดเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอหลังจากกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยไตรซอล (Trizol, Gibco, USA) ตามวิธีการแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ใส่ไตรซอลปริมาณ 1 มิลลิลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 5 นาที เติมคลอโรฟอร์มปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าหลอดพลาสติกแรงๆ 15 วินาที แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนสุดซึ่งเป็นชั้นที่มีน้ำอาร์เอ็นเอปนอยู่ จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับตวามเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนของเหลวใสออกให้เหลือแต่ตะกอนที่ก้นหลอดพลาสติกจากนั้นล้างด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เคาะเบาๆ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทของเหลวใสออกแล้วคว่ำหลอดพลาสติกทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที และละลายตะกอนที่อยู่ก้นหลอดซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ (RNAse-free water) ปริมาณ 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อ่างน้ำ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบทำโดยใช้ชุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สังเคราะห์ดีเอ็นเอสำเร็จรูปโดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และโอลิโก (Oligo(dt) 18) ในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปรับปริมาณรวมให้ได้ 12 ไมโครลิตร โดยมีวิธีดังแสดงในรูปที่ 6 ทำวิเคราะห์การแสดงออกของแมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA Polymerase) ใช้ปริมาณรวมพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นต้นแบบ ดีออกซีไรโบนิวคลิโอไทด์ ไตรฟอสเฟต ทั้ง 4 ชนิดคือ ดีเอทีพี (dATP) ดีจีทีพี (dGTP) ดีซีทีพี (dCTP) และดีทีทีพี (dTTP) อย่างละ 2.5 มิลลิโมลาร์ (2.5 mM of each dNTPs) ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ (10x Buffer) แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 - 4 มิลลิโมลาร์ (2-4 mM $MgCl_2$) เอ็นไซม์-แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (0.6 U of Taq DNA polymerase) โอลิโกนิวคลิโอไทด์ไพรเมอร์ ซึ่งได้แก่ แกปดีเอชไพร์เมอร์ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ไพรเมอร์

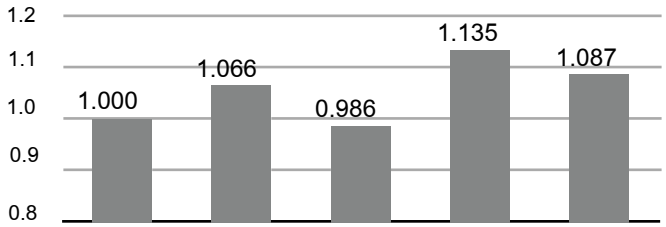
A)



TNFα

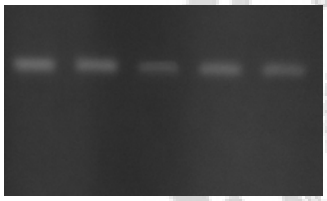
Pg.LPS(μg/ml - 1 5 10 20

The relative level of TNF α mRNA



Pg.LPS(μg/ml - 1 5 10 20

B)



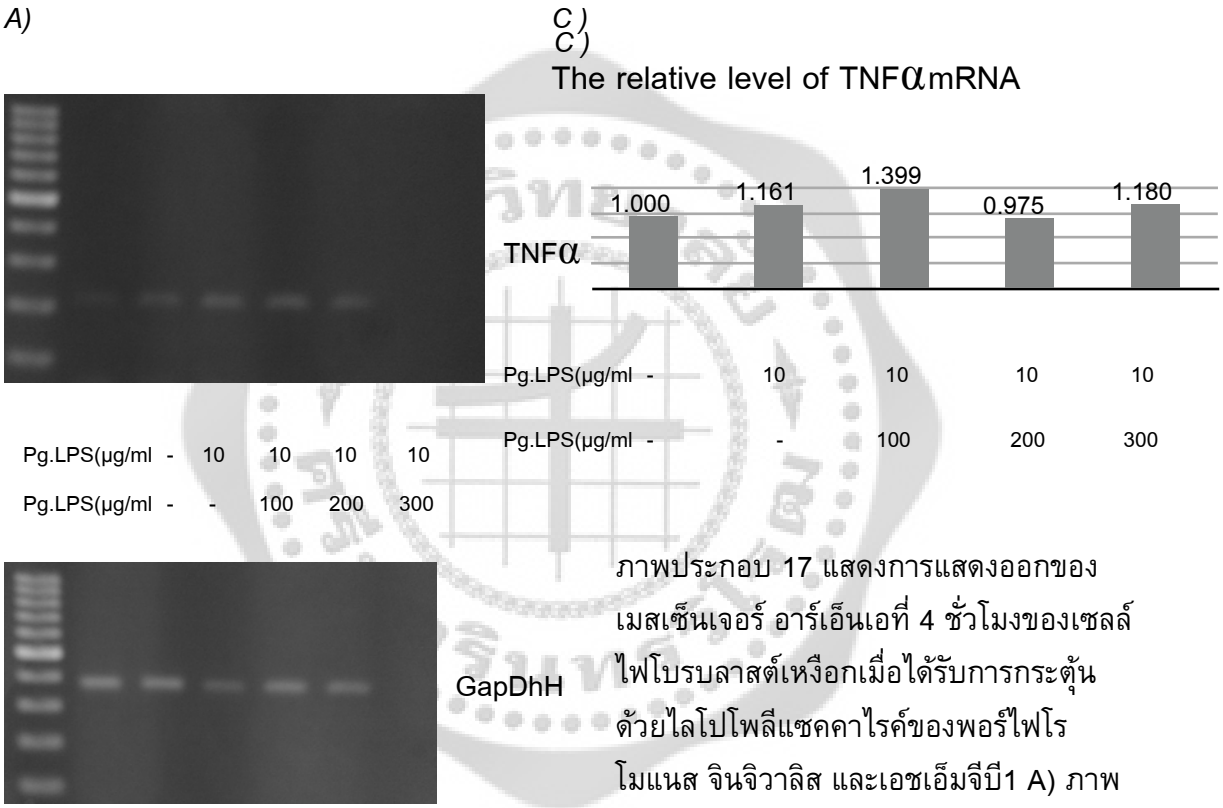
GapDhH

C)

ภาพประกอบ 16 แสดงการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอที่ 4 ชั่วโมงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร A) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ B) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนแกปดีเอช ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ C) แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส การแสดงออกทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก

เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและเอชเอ็มจีบี1 ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์การแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับเอชเอ็มจีบี 1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรสูงที่สุด



ภาพประกอบ 17 แสดงการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอที่ 4 ชั่วโมงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และเอชเอ็มจีบี1 A) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ B) ภาพแสดงการตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนแกปดีเอช ด้วยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ C) แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร
วัน เดือน ปีเกิด	7 ธันวาคม 2521
สถานที่เกิด	จังหวัดชลบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	โรงพยาบาล กรุงเทพ ภูเก็ต 2/1
	ถนน หงษ์หยกอุทิศ อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ทันตแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาล กรุงเทพ ภูเก็ต
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาตอนปลาย
	จาก โรงเรียนชลราษฎรอำรุง
	จังหวัดชลบุรี
พ.ศ. 2544	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต
	จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2552	ป.บัณฑิต สาขาปริทันตวิทยา
	จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
	จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ