ผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

ปริญญานิพนธ์

ของ

อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา

มิถุนายน 2555

ผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

ปริญญานิพนธ์

ของ

อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา

มิถุนายน 2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

บทคัดย่อ

ของ

อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
มิถุนายน 2555

อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์. (2555). *ผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์* ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(ปริทันตวิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร.

เอชเอ็มจีบี1 เป็นโปรตีนที่มีอยู่ภายในเซลล์หลายชนิดและถูกกระตุ้นให้หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ ในหลายสภาวะ เมื่ออยู่ภายนอกเซลล์เอชเอ็มจีบี1 มีบทบาทเป็นไซโตไคน์กระตุ้นกระบวนการอักเสบและมีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ด้วย

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาถึงผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย วิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีทีทั้งเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ ในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1ที่ความเข้มข้น 0 - 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ณ เวลา 1, 3 และ 6 วัน และวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ ในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้น 0 -100 นาโนกรัม/มิลลิลิตรโดยใช้ทรานสเวล อินเสิร์ท ณ เวลา 16 ชั่วโมง

ผลการวิจัย พบว่าเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้น 50, 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตรกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ สำหรับการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าเอชเอ็มจีบี1 กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

บทสรุป การเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์เป็นคุณสมบัติที่สำคัญต่อการเกิดการหายของแผล ในกรณีของโรคปริทันต์ นอกจากบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ในการกระตุ้นให้ร่างกายรับรู้กระบวนการอักเสบแล้ว ยังอาจมีส่วนช่วยในการซ่อมแซมอวัยวะปริทันต์ด้วย รายละเอียดเกี่ยวกับกลไกและรีเซพเตอร์ที่ใช้จะต้องมีการศึกษาต่อไป

EFFECT OF HMGB1 ON PROLIFERATION AND MIGRATION OF GINGIVAL AND PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS

AN ABSTRACT

BY

ATITHAN CHITANUWAT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Periodontology

at Srinakharinwirot University

June 2012

Atithan Chitanuwat. (2012). *Effect of HMGB1 on proliferation and migration of gingival and periodontal ligament fibroblasts.* Master thesis, M.S. (Periodontology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Narongsak Laosrisin, Asst. Prof. Dr. Nirada Dhanesuan.

High mobility group box-1 (HMGB1), originally discovered as an intracellular protein, is found in many cell types. It can also be secreted under various conditions. Once extracellularly, HMGB1 acts as an inflammatory cytokine and also affects cells behavior.

Objectives: To study the effect of HMGB1 on human gingival fibroblast (HGF) and human periodontal ligament fibroblast (HPDLF) proliferation and migration.

Materials and methods: Proliferation assay was performed by MTT method in HGF and HPDLF stimulated with 0 - 100 ng/ml HMGB1 for 1, 3 and 6 days. Cells migration was performed by transwell insert at 16 hours after stimulated with 0 -100 ng/ml HMGB1.

Results: HMGB1 at 50, 100 ng/ml stimulated proliferation of HGF significantly, but not HPDLF. For migration assay, HMGB1 at 100 ng/ml stimulated migration of both HGF and HPDLF significantly.

Conclusions: Proliferation and migration are important properties of cells to achieve wound healing. In periodontal disease, HMGB1 does not only act as an inflammatory cytokine but also participates in periodontal tissue repair. Details regarding mechanism and receptor used in this process requires further investigation.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

ของ

อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

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

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(อาจารย์ทพญ.ดร. ณปภา เอี่ยมจิรกุล)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร)

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

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา สอนและอบรม แนะนำข้อมูลและข้อคิดเห็นต่างๆ รวมถึงสละเวลาอันมีค่า เพื่อประโยชน์ในการทำวิจัยของข้าพเจ้าอย่างดียิ่งตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทพญ.ดร. ณปภา เอี่ยมจิรกุลที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครงและประธานสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.นีรชา สารชวนะกิจที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆของการวิจัยรวมทั้งให้ความกรุณาตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล, อาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ ที่กรุณาแนะนำและเอื้อเฟื้อวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัยและ อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.ปรมาภรณ์ จิ๋วพัฒนกุลที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบคุณอาจารย์ทันตแพทย์หญิงรุ่งทิวา ปันป่าที่ให้คำแนะนำ และปรึกษาในการทำวิจัย

และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ท้ายที่สุดนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา คุณเนาวรัตน์และคุณสมศักดิ์ บุญประสม ผู้เป็นที่รักยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและคอยให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา คุณณัฐกานต์และคุณบรรณวัชร วรกุล ที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาเป็นอย่างดี

อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	กรอบแนวคิดของการวิจัย	4
	สมมติฐานในการวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	บทบาททั่วไปของเอชเอ็มจีบี1	5
	เอชเอ็มจีบี1กับโรคปริทันต์อักเสบ	7
	ผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์	8
	ผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์	10
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	12
	การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์	12
	การเตรียมเอชเอ็มจีบี1	12
	การศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึด ปริทันต์ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1	13
	การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1	13
	วิเคราะห์ข้อมูล	15
4	**ผลการวิจัย**	16
	ผลของการศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1	16
	ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายผลและบทสรุป.....	20
อภิปรายผล.....	20
บทสรุป.....	22
บรรณานุกรม.....	23
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	30

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 แสดงโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1..... 5

2 แสดงกลไกการหลั่งเอชเอ็มจีบี1และบทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อเซลล์…….. 6

3 แสดงโครงสร้างของทรานสเวล อินเสิร์ท…….. 14

4 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี 1 ณ เวลา1, 3 และ 6 วัน …….. 16

5 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี 1 ณ เวลา 1, 3 และ6วัน……. 17

6 ภาพแสดงแผ่นเมมเบรน……. 18

7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวิร์ทแสดงตัวอย่างเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1…….. 18

8 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่มีการเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรน ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี 1……... 19

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

อวัยวะปริทันต์ (periodontium) ประกอบเนื้อเยื่อที่มีลักษณะแตกต่างกัน 4 ชนิด เป็นเนื้อเยื่ออ่อน 2 ชนิด ได้แก่ เหงือก (gingiva) และเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) ส่วนเนื้อเยื่อแข็งอีก 2 ชนิด ได้แก่ กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) และเคลือบรากฟัน (cementum) อวัยวะปริทันต์ทำหน้าที่ร่วมกันในการยึดฟันไว้กับกระดูกขากรรไกร เพื่อให้สามารถรองรับแรงบดเคี้ยว และทำหน้าที่ได้เป็นปกติ เหงือกประกอบด้วยแกนกลางที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและมีเยื่อบุผิวปกคลุม มีหน้าที่ในการยึดติดกับฟันเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างใต้ และยังมีหน้าที่ช่วยในการบดเคี้ยว เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่และทำหน้าที่ในการสร้างและสลายคอลลาเจน (collagen) นอกจากนี้ยังสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) อื่นๆ[1] เอ็นยึดปริทันต์เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีความเฉพาะ เป็นตัวยึดระหว่างเคลือบรากฟันกับกระดูกเบ้าฟัน และมีการตอบสนองต่อแรงที่มากระทำ เมื่อมีแรงมากระทำต่อฟันน้อยเอ็นยึดปริทันต์ก็จะหดตัวลง เมื่อมีแรงมากระทำต่อฟันมากจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของอวัยวะปริทันต์มีการขยายเพื่อรับแรง แต่ถ้ามีแรงกระทำต่อฟันมากกว่าปกติหรือเกิดการอักเสบจากโรคปริทันต์อักเสบก็จะเกิดการทำลายของเอ็นยึดปริทันต์[2]

เอชเอ็มจีบี1 (High mobility group box-1: HMGB1) เป็นโปรตีนขนาด 30 กิโลดาลตันที่ได้รับการค้นพบมานานกว่า 30 ปี พบได้เป็นปริมาณมากในเกือบทุกเซลล์ของยูคาริโอต[3] เอชเอ็มจีบี1 มีบทบาทต่อเซลล์ในหลายด้าน บทบาทภายในเซลล์ได้แก่ การควบคุมกระบวนการทรานสคริบชั่น (transcription)[4] การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair)[5] และบทบาทภายนอกเซลล์ทั้งในด้านที่เกี่ยวพันกับกระบวนการอักเสบ[6] และผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นต้น[7,8]

เอชเอ็มจีบี1 จะถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ในหลายสภาวะ ตัวอย่างเช่น เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบนีโครซิส (necrosis)[9] หรืออะพอพโทซิส (apoptosis)[10] หรือหลั่งออกมาจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับการถูกกระตุ้น[9] การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อกระตุ้นด้วย ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ (tumor necrosis factor: TNF) ชีวพิษภายในเซลล์ (endotoxin) หรืออินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1: IL –1) ส่งผลให้เซลล์โมโนไซต์ (monocyte) และแมคโครฟาจ (macrophage) หลั่งเอชเอ็มจีบี1ออกมานอกเซลล์[11,12,13,14] และหากมีการยับยั้งเอชเอ็มจีบี1 จะส่งผลลดความรุนแรงของ

การอักเสบลงได้[15] อาจกล่าวได้ว่าเอชเอ็มจีบี1 เป็นสื่อกลางในการเกิดการอักเสบ มีบทบาทในการกำจัดเซลล์ที่ตายแล้วและของเสียต่างๆ และยังเป็นกลไกที่สำคัญในการส่งสัญญาณไปยังเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บและเป็นจุดเริ่มต้นให้เกิดกระบวนการซ่อมแซม[16,17]

เอชเอ็มจีบี1มีบทบาทในโรคต่างๆ ที่เกิดจากกระบวนการอักเสบเช่น การติดเชื้อในกระแสโลหิต (sepsis)[18] ข้อต่ออักเสบ (arthritis)[19,20] และการบาดเจ็บของปอดอย่างเฉียบพลัน (acute lung injury)[21] สำหรับในช่องปากโรคปริทันต์เป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ก่อให้เกิดการทำลายของเหงือกและกระดูกเบ้าฟันจนทำให้ฟันโยกและสูญเสียฟันในที่สุด[22] สำหรับการศึกษาถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ในโรคปริทันต์ ในปัจจุบันยังมีอยู่ไม่มาก[23]

นอกเหนือจากบทบาทในด้านการเป็นสารอักเสบแล้วการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอชเอ็มจีบี1 มีบทบาทต่อพฤติกรรมของเซลล์ที่สำคัญได้แก่การเคลื่อนที่ (migration) และเพิ่มจำนวน (proliferation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อการเกิดการหายของแผล (wound healing)[24] ในการทดลองของเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นเลือดในหนูพบว่าเอชเอ็มจีบี1 มีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังกล่าว[5] การศึกษาในเซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมา (glioblastoma)[25] พบว่ามีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 และเมื่อกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ก็ส่งผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ยังพบได้ในเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหนู (rat smooth muscle cell)[26] เซลล์เคอร์ราติ-โนไซต์ (keratinocyte)[27] เป็นต้น

ในปี 2006 การศึกษาของ Morimoto Y. และคณะ[23] พบว่า มีการแสดงออกเอชเอ็มจีบี1 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ สอดคล้องกับการศึกษาของกนิษฐ์ นันทเสนีย์ และคณะ[28] ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ (human periodontal ligament fibroblast cell) และสร้างเส้นใยเหงือก (human periodontal ligament fibroblast cell) มนุษย์ ในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนภายในเซลล์ ต่อมามีการศึกษาของรุ่งทิวาและคณะ[29] พบว่ามีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1เพิ่มขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารบริสุทธิ์ไลโพโปลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ของเชื้อก่อโรคปริทันต์พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) และส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ (*Aggregabacter actinomycetemcomitan*) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์เช่นกัน จากผลการศึกษาเหล่านี้ ก่อให้เกิดคำถามที่ว่าเอชเอ็มจีบี1 มีบทบาทอย่างไรในโรคปริทันต์

ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งเน้นในการศึกษาผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อพฤติกรรมของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ อันได้แก่การเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผลการทดลองที่ได้จะเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญ เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ต่ออวัยวะปริทันต์ ส่งผลต่อการประยุกต์ใช้ในการพัฒนารักษาโรคปริทันต์ในอนาคตต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงผลของเอชเอ็มจีบี1ต่อการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

ความสำคัญของการวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีเชื้อโรคเป็นสาเหตุเบื้องต้น ร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อเชื้อโรคเหล่านั้น ส่งผลให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์ จนเกิดการสูญเสียฟันไปในที่สุด การเกิดการอักเสบเป็นปฏิกิริยาของร่างกายการตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ คือ เชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยธัส (*Tannelsella forsythus*) รวมทั้งปัจจัยความรุนแรง (virulent factors) ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ในสภาวะอักเสบจะเกิดการผลิตไซโตไคน์ (cytokine) และหลั่งสารอักเสบออกมาจากของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์โมโนไซต์ แมคโครฟาจ รวมถึงเซลล์สร้างเส้นใยก็พบว่าสามารถหลั่งไซโตไคน์ ได้อีกด้วย การกระทำดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมาได้[22, 30]

กระบวนการหายของแผล เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและต้องอาศัยเซลล์ที่อยู่ในบริเวณนั้นๆ ในการที่จะเกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อขึ้นได้ การเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญในกระบวนการดังกล่าว ในระหว่างการทำลายเนื้อเยื่อจากการอักเสบร่างกายจะมีการหลั่ง ไซโตไคน์และโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ซึ่งส่งผลดึงดูดเซลล์ให้มีการเคลื่อนที่เข้ามาและกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น[31] ปัจจัยใดที่ส่งเสริมกระบวนการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ จะส่งผลบวกต่อการหายของแผลได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อกระบวนการดังกล่าว

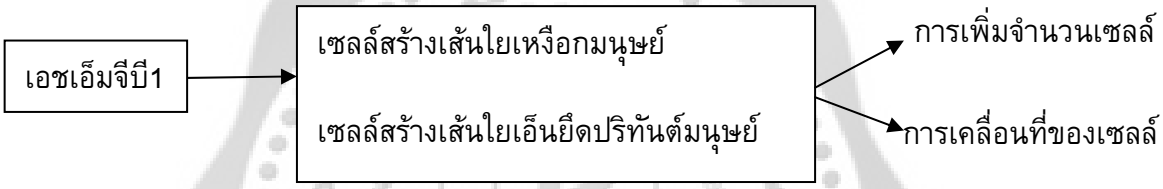
ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาภายในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาถึงการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ในสภาวะที่มีและไม่มีเอชเอ็มจีบี1 เป็นตัวกระตุ้น

นิยามศัพท์เฉพาะ

- Periodontitis : โรคปริทันต์อักเสบ
- HMGB1 : เอชเอ็มจีบี1
- Human periodontal ligament fibroblast : เซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์
- Human gingival fibroblast : เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์
- Cell migration : การเคลื่อนที่ของเซลล์
- Cell proliferation : การเพิ่มจำนวนของเซลล์

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย



สมมติฐานในการวิจัย

เอชเอ็มจีบี1มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. บทบาททั่วไปของเอชเอ็มจีบี1
2. เอชเอ็มจีบี1 กับโรคปริทันต์อักเสบ
3. ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์
4. ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์

บทบาททั่วไปของเอชเอ็มจีบี1

เอชเอ็มจีบี1หรืออีกชื่อหนึ่งเรียกว่า แอมโฟเทอริน (amphoterin)[32] ถูกค้นพบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นระยะเวลานานมากว่า 30 ปี โดยชื่อที่ถูกเรียกนี้เป็นไปตามคุณสมบัติการที่สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วในโพลีอะไคลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)[33] ในระยะแรกพบว่าเอชเอ็มจีบี1เป็นโครมาตินโปรตีน (chromatin protein) ที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 215 ตัวและเป็นสมาชิกในกลุ่มเอชเอ็มจีโปรตีน (High mobility group protein superfamily) ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิดแบ่งตามส่วนประกอบด้านปลายสายไนโตรเจน (N-terminal functional domains) ที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย เอชเอ็มจีบี (HMGB) เอชเอ็มจีเอ็น (HMGN) และเอชเอ็มจีเอ (HMGA) เรียกลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีบีว่า เอชเอ็มจีบ็อกซ์ (HMG boxes) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ็นเรียกว่า ส่วนจับของนิวคลิโอโซม (nucleosome – binding domain) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอเรียกว่า เอทีฮุค (AT-hook)[34] เอชเอ็มจีบี 1 ประกอบด้วย 3 ส่วนโดยมีเอชเอ็มจีบีบ็อกซ์ (HMG boxes) 2 ส่วน เป็นส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domains) มีชื่อเรียกว่า เอชเอ็มจีบ็อกซ์เอ (HMG box A) และ เอชเอ็มจีบ็อกซ์บี (HMG box B) และส่วนที่สาม คือ ส่วนปลายที่เป็นกรด (acidic tail)[35] ตามโครงสร้างที่ประกอบดังภาพประกอบ 1

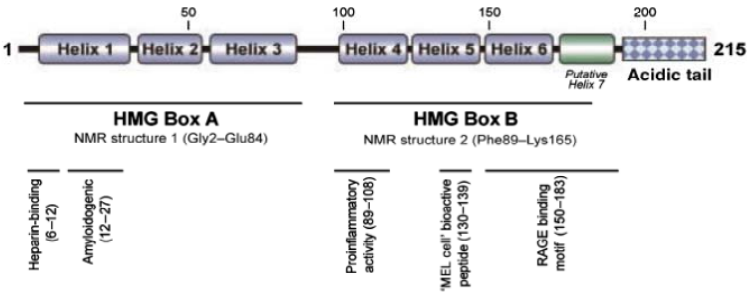


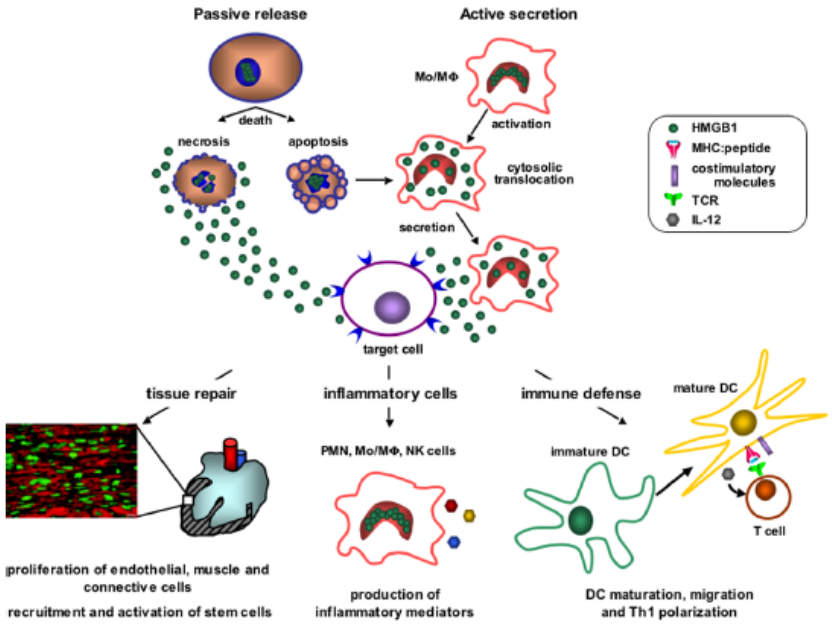
Fig. 1 The domain structure of amphoterin.

ภาพประกอบ 1 แสดงโครงสร้างเอชเอ็มจีบี1

ที่มา: H.J. HUTTUNEN, H. RAUVALA (2004) Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease. *J of Internal Medicine*; 255; 351-366

เอชเอ็มจีบี1พบได้ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกือบทุกชนิด เช่น ในเซลล์สร้างเส้นใย เซลล์เส้นประสาท เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์หลอดเลือด เป็นต้น[32] และโดยส่วนใหญ่พบเอชเอ็มจีบี1 ในนิวเคลียสบทบาทภายในเซลล์ของเอชเอ็มจีบี1ช่วยในกระบวนการทรานสคริบชั่น[4] การซ่อมแซมดีเอ็นเอ[5] เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมาแสดงถึงความสำคัญของเอชเอ็มจีบี1ต่อสิ่งมีชีวิต โดยในหนูที่ขาดเอชเอ็มจีบี1 จะตายตั้งแต่แรกเกิดจากภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia)[36]

การศึกษาในระยะต่อมาแสดงให้เห็นว่า เอชเอ็มจีบี1 สามารถถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ ซึ่งการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ออกนอกเซลล์มีอยู่ 2 แบบด้วยกัน คือ แบบแรกเมื่อเซลล์ถูกทำอันตรายหรือตายแบบนีโครซิสจะหลั่งเอชเอ็มจีบี1ออกมาเอง (passively released) แล้วกระตุ้นให้เกิดการผลิตไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นได้[37] การหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ออกจากเซลล์แบบที่ 2 คือเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้น (actively release) แล้วจะเกิดการหลั่งของเอชเอ็มจีบี1 ออกมา โดยส่วนใหญ่พบในเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) เช่น แมคโครฟาจ โมโนไซต์ เป็นต้น ซึ่งเอชเอ็มจีบี1 ที่หลั่งออกมาทั้งสองแบบ จะจับกับรีเซพเตอร์ (receptor) บนเซลล์เป้าหมายและจะส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ต่างๆ กัน[38] ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 แสดงกลไกการหลั่งเอชเอ็มจีบี1และบทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ

ที่มา: A. RAUCCI, R. PALUMBO, M.E. BIANCHI (2007) REVIEW HMGB1: A signal of necrosis: *Autoimmunity*; 40; 285–289

เอชเอ็มจีบี1มีบทบาทในกระบวนการอักเสบและเกี่ยวพันกับโรคที่มีการอักเสบหลายโรค โดยพบเอชเอ็มจีบี1ในภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis)[20] โรคตับอักเสบ (hepatitis)[38] เอชเอ็มจีบี1 ทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ในเซลล์อักเสบได้แก่ แมคโครฟาจ โมโนไซต์ ซึ่งจะมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ออกมาเมื่อได้รับการกระตุ้นของอินเตอร์ลิวคิน-1เบตา ทีเอนเอฟแอลฟา และไลโพโพลีแซคคาไรด์ ทำให้เกิดการตอบสนองและเกิดพยาธิสภาพขึ้น เมื่อเปรียบเทียบสารอักเสบอื่น ๆ เช่น ทีเอนเอฟแอลฟา และ อินเตอร์ลิวคิน-1เบตา จะพบข้อแตกต่าง คือ เอชเอ็มจีบี1 เป็นสารอักเสบที่ถูกหลั่งออกมาในระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นเป็นเวลานาน คือ ประมาณ 14-16 ชั่วโมง และทำให้การอักเสบคงอยู่ยาวนาน[39]

เอชเอ็มจีบี1ที่อยู่ภายนอกเซลล์มีบทบาทควบคุมกระบวนการทางชีววิทยาที่หลากหลาย เช่น การแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแพร่กระจายของเนื้อร้าย (metastasis) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเอชเอ็มจีบี1มีบทบาททั้งในกระบวนการอักเสบ และยังมีบทบาทให้เกิดการซ่อมแซมและการงอกใหม่ได้ ทั้งในภาวะปกติและภาวะเกิดโรค[40]

เอชเอ็มจีบี1 กับโรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่เกิดจากหลายๆปัจจัยร่วมกัน ก่อให้เกิดมีการอักเสบเรื้อรัง ทำลายอวัยวะปริทันต์จนส่งผลให้เกิดฟันโยกและสูญเสียฟันในที่สุด โรคปริทันต์อักเสบมีสาเหตุหลักเกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ที่สะสมอยู่บนตัวฟัน[41] ซึ่งเป็นเชื้อที่จำเพาะต่อการดำเนินของโรค เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจน (gram-negative anaerobic bacteria)[22] เช่น พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยธัส ซึ่งตัวเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีปัจจัยความรุนแรง เช่น สารพิษจากเชื้อพบในพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ความสามารถในการรุกรานเข้าเนื้อเยื่อที่จะพบในพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ แอคกริเกติแบค-เตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ทำให้มีความสามารถในการหลบหลีกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในขั้นตอนแรก และเอนไซม์ (enzyme) กับโปรตีเอส (protease) มีคุณสมบัติในการสลายคอลลาเจนและโปรตีน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการทำลายของอวัยวะปริทันต์เช่น ผลของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host immune response) ในการที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะมีคุณสมบัติในการต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรีย เพื่อที่จะป้องกันการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อ อันจะทำให้เซลล์ในกระบวนการอักเสบด่านแรกคือ นิวโตรฟิล (neutrophil) มายังบริเวณที่อักเสบตามมาด้วยแมคโครฟาจและลิมโฟไซต์ทำหน้าที่ในการหลั่งไซโตไคน์ออกมา[42]

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์มีบทบาทที่นอกเหนือไปจากการผลิตและสลายเส้นใยคอลลาเจน ในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จากเชื้อก่อโรคพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ จะทำให้มี

การหลั่งไซโตไคน์ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6) อินเตอร์ลิวคิน-8 (IL-8)[43,44,45] ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อขึ้น สำหรับเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ก็มีบทบาทในการสร้างและสลายเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อ ซึ่งไม่เพียงแต่ช่วยคงสภาพของเอ็นยึดปริทันต์ แต่ยังช่วยในเกิดการงอกใหม่และการซ่อมสร้างของอวัยวะปริทันต์ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ สามารถตอบสนองต่อไซโตไคน์และโกรทแฟคเตอร์ได้ ซึ่งมีบทบาทที่มีส่วนร่วมในการเกิดโรคปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ยังมีคุณสมบัติการเป็นพลูริโพเทนท์ (pluripotent) ด้วย[46,47]

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์มีการหลั่งของเอชเอ็มจีบี1เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จากเชื้อก่อโรคปริทันต์[48,29] นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือก (gingival epithelial cell) ก็มีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1สูงทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม และมีรายงานการตรวจพบเอชเอ็มจีบี1ในน้ำเหลืองเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์ อันอาจบ่งถึงความเกี่ยวพันกับการดำเนินของโรคปริทันต์ได้[23]

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีบทบาทสำคัญต่อการหายของแผล ซึ่งประกอบด้วยการงอกใหม่และการซ่อมแซม การงอกใหม่เป็นการแทนที่เนื้อเยื่อเดิมด้วยเนื้อเยื่อใหม่ที่มีคุณสมบัติที่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเดิม ส่วนการซ่อมแซมเป็นการแทนที่เนื้อเยื่อเก่าด้วยเนื้อเยื่อใหม่แต่ไม่สามารถที่จะทำหน้าที่ได้เหมือนเนื้อเยื่อเดิม ซึ่งในช่วงที่มีการหายของแผลในระหว่างการเกิดการโรคปริทันต์อักเสบส่วน ใหญ่จะเกิดหลังจากมีการอักเสบ เมื่อจบการอักเสบลงก็จะมีกระบวนการการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และการสร้างเนื้อเยื่อ (fibrogenesis) ตามมาซึ่งพบว่าอินเตอร์ลิวคิน-1เบตา และอินเตอร์ลิวคิน-1แอลฟา เป็นไซโตไคน์ที่จะมีผลโดยอ้อมในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย และการสร้างคอลลาเจน[43]

ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นกระบวนการสำคัญที่เกิดขึ้นในภาวะปกติและในภาวะที่เกิดโรคโดยที่ต้องอาศัยการจับกันของโกรทแฟคเตอร์ กับรีเซพเตอร์ที่มีความจำเพาะ ซึ่งโดยปกติ รีเซพเตอร์จะอยู่บนพื้นผิวของเซลล์ แล้วจะทำการส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ให้มากขึ้น[49,50]

โกรทแฟคเตอร์ เป็นโปรตีนที่ทำงานเฉพาะที่ (local) และทำงานได้ทั้งระบบ (systemic) มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการทำหน้าที่ของเซลล์ โกรทแฟคเตอร์มีคุณสมบัติในการกระตุ้นในการเพิ่มจำนวนต่อเซลล์ที่หลั่งโกรทแฟคเตอร์ออกมาเอง (autocrine) หรือส่งผลการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนต่อเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง (paracine) ซึ่งโกรทแฟคเตอร์เป็นตัวที่ทำการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และจำนวนเซลล์ในการผลิตเนื้อเยื่อ[51]

ในสภาวะที่มีการทำลายเกิดขึ้น เอชเอ็มจีบี1 จะทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณไปเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ[40] และในอีกแง่ของการศึกษาก็พบว่าเอชเอ็มจีบี1

ก็สนับสนุนการเกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อโดยส่งสัญญาณผ่านรีเซพเตอร์ ซึ่งพบว่าเอชเอ็มจีบี 1 จะจับกับเรจ รีเซพเตอร์ (RAGE receptor) ซึ่งเป็น รีเซพเตอร์ที่อยู่บริเวณผิวพบได้ในเซลล์ประสาท เซลล์หลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์โมโนไซต์ แมคโครฟาจ เป็นต้น[52] เรจรีเซพเตอร์มีส่วนในการควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์[7] มีการศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยของหนู (3T3 fibroblast)[53] พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 โดยเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ที่ 10 นาโนโมลาร์ แต่พบว่าเมื่อถูกยับยั้งโดยแอนติบอดี้ (antibodies) ที่ยับยั้งเรจรีเซพเตอร์ ส่งผลต่อเซลล์สร้างเส้นใยของหนูในแง่ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนได้ แต่ไม่พบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยของหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากเอชเอ็มจีบี1 และสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์เคราติโนไซต์พบว่าเซลล์เคราติโนไซต์[27] ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ความเข้มข้นเอชเอ็มจีบี1ที่ 10 นาโนโมลาร์ อาจกล่าวได้ว่าเอชเอ็มจีบี1 มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์หลายชนิดอาทิเช่น เซลล์หลอดเลือดของวัว (endothelial cell)[8] เซลล์ต้นกำเนิดของเส้นเลือดของหนู (mesoangioblast)[7] เซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมา[25] และเซลล์ต้นกำเนิดของหัวใจ (cardiac stem cell)[54] ในทางตรงข้ามพบว่าเอชเอ็มจีบี1 ยังยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคมอล (mesenchymal stem-cell) ในมนุษย์ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคมอลมากขึ้นก็ยิ่งทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคมอลยิ่งขึ้น[55] นอกจากเรจ รีเซพเตอร์แล้ว โทลล์ไลค์รีเซพเตอร์ 2 (Toll-like receptor 2: TLR2) และ โทลล์ไลค์รีเซพเตอร์ 4 (Toll-like-4 receptor: TLR4) ก็เป็นรีเซพเตอร์อีกอันนึงมีความสำคัญกับการจับกันกับเอชเอ็มจีบี1[56] ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เกี่ยวข้องการติดเชื้อและการอักเสบ พบได้ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ นิวโตรฟิลล์ เซลล์หลอดเลือด เป็นต้น[57]

จากการศึกษาเซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมามนุษย์[25] ในห้องปฏิบัติการพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเอชเอ็มจีบี1มากขึ้นก็จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มีมากขึ้นตามลำดับโดยเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าปฏิกิริยาระหว่างเรจรีเซพเตอร์และเอชเอ็มจีบี1มีส่วนสำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนั้นเอชเอ็มจีบี1 ยังกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในมนุษย์อีกด้วย[58]

จากการศึกษาการทดลองในหนูที่มีหัวใจขาดเลือด[54] พบว่าเมื่อให้เอชเอ็มจีบี1 200 นาโนกรัม ในบริเวณรอบๆ บริเวณที่เกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial infarction) พบว่ามีการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขึ้นมาใหม่ (myocyte) และยังพบว่ามีการทำหน้าที่ของหัวใจที่ดีขึ้น แสดงว่าเอชเอ็มจีบี1 มีประสิทธิภาพให้เกิดการงอกใหม่ของกล้ามเนื้อหัวใจที่ตายแล้ว และจากการศึกษาในหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าเมื่อให้เอชเอ็มจีบี1ปริมาณ 200 และ 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ทาที่บริเวณแผลจะพบการว่ามีการสนับสนุนให้เกิดการสร้างเส้นเลือดมากขึ้นและมีการสะสมของเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นมากขึ้นช่วยในการหายของแผลให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น[24]

กล่าวได้ว่าเอชเอ็มจีบี1มีผลต่อเซลล์แตกต่างกันออกไปทั้งในการกระตุ้นและยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งรายละเอียดในกลไกดังกล่าวยังไม่เป็นที่แน่ชัดและยังต้องมีการศึกษากันต่อไป

ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์

เซลล์แต่ละชนิดมีการเคลื่อนที่ในลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ในเซลล์ตัวอ่อนของมนุษย์ (embryonic cell) มีการเคลื่อนที่เพื่อการเจริญเติบโต (development) เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเคลื่อนที่เพื่อต่อสู้สิ่งแปลกปลอมในบริเวณที่ติดเชื้อ การเคลื่อนที่ของเซลล์ในกระบวนการหายของแผล และการเคลื่อนที่ในกรณีการแพร่กระจายของมะเร็งขั้นรุนแรง (malignant tumor) เป็นต้น[59]

การเคลื่อนที่ของเซลล์ มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโต การงอกใหม่ของเนื้อเยื่อ และการคงสภาพของเนื้อเยื่อ (maintenance) นอกจากนั้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ยังเป็นพื้นฐานในการพัฒนาอวัยวะมีรายงานถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์หลายชนิด[59] รวมถึงเซลล์ต้นกำเนิดของกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac stem cell)[60] เซลล์ต้นกำเนิดของหลอดเลือด (mesioangioblast)[7,61] เซลล์สร้างเส้นใย (3T3 fibroblast)[53] เซลล์เดนดริติก (dendritic cell)[62] เซลล์ประสาท (neuron)[63] เซลล์เคอร์ราติโนไซต์[27] และเซลล์โมโนไซต์[64] เป็นต้น การศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell)[26] พบว่าต้องอาศัยการจับกันของเอชเอ็มจีบี1กับเรจรีเซพ-เตอร์ ในการเกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ นอกจากนั้นยังมีรายงานถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการรุกรานและการแพร่กระจายของเนื้อร้าย[25,65] อีกด้วย ในการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดของกล้ามเนื้อหัวใจ (mesoangioblast) พบว่าเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เซลล์ต้นกำเนิดของกล้ามเนื้อหัวใจจะเคลื่อนที่มายังบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บและทำให้เกิดการแปรสภาพ (differentiation) เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiomyocyte) เกิดการงอกใหม่ของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardium regeneration) และทำให้หัวใจมีการทำงานที่ดีขึ้น[60] อีกการศึกษาของ Limana F. และคณะ[54] ในหนูที่หัวใจขาดเลือดมีการฉีดเอชเอ็มจีบี1 200 นาโนกรัม/10 ไมโครลิตร เข้าไปพบว่ามีผลคีโมแทกติก (chemotactic effect) ต่อเซลล์หัวใจทั้งในสัตว์ทดลองและในห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าเอชเอ็มจีบี1 กระตุ้นจำนวนเซลล์หัวใจได้เคลื่อนที่เป็นจำนวนเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาของ Palumbo R. และคณะ[61] ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้บอยเดนแชมเบอร์ (boyden chamber) พบว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยหนู (mouse fibroblast) การศึกษาของ Degryse B. และคณะ[26] ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหนู ก็พบฤทธิ์การกระตุ้นการเคลื่อนที่โดยเอชเอ็มจีบี1 เช่นกัน และพบว่าแอนตีบอดีที่จำเพาะต่อเอชเอ็มจีบี1 สามารถยับยั้งการกระตุ้นการเคลื่อนที่ได้

การศึกษาเกี่ยวกับเอชเอ็มจีบี1 ในการกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ในเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นเลือด (mesoangioblast) พบว่ามีปริมาณการเคลื่อนที่ของเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นเลือดมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอชเอ็มจีบี1 มากขึ้นที่ปริมาณ 10, 50, 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ[7] และยังพบว่าในเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์เคอร์ราติโนไซต์ที่ผิวหนังในมนุษย์มีการกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น ด้วยเอชเอ็มจีบี1ซึ่งมีปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในการหายของแผลอยู่ที่ 200 – 800 นาโนกรัม ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เอชเอ็มจีบี1ภายใน มีผล

ต่อการซ่อมแซมในบาดแผลที่ผิวหนัง และถ้ามีการใช้เอชเอ็มจีบี1 จากภายนอกร่วมด้วยจะช่วยในการหายของแผลได้ดียิ่งขึ้น[24]

เมื่อทดลองในหนูโดยใช้ก้อนเฮพาริน ซัลฟาโรสที่มีเอชเอ็มจีบี1 ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อแล้วอีก 30 นาทีก็ฉีดเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นเลือด (mesoangioblast) เมื่อตัดชิ้นเนื้อมาย้อมพบว่าบริเวณที่มีก้อนเฮพารินซัลฟาโรสที่มีเอชเอ็มจีบี1 จะพบปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นเลือดอย่างมาก ซึ่งแสดงว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถดึงดูดเซลล์ต้นกำเนิดให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีเอชเอ็มจีบี1 ได้ [66] และจากการศึกษาของ Rouhianen A และคณะ[64] พบว่า เอชเอ็มจีบี1มีบทบาททั้งในการกระตุ้นเซลล์ของตัวเองและเซลล์ข้างเคียง ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของโมโนไซต์ในการรุกรานผ่านเซลล์หลอดเลือด และพบว่ามีเอชเอ็มจีบี1 บริเวณส่วนปลายของเซลล์โมโนไซต์ ในการศึกษาของ Meng E และคณะ[55] พบว่าเอชเอ็มจีบี1 มีผลในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ให้มีจำนวนเซลล์เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคมอลเคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้นตามปริมาณเอชเอ็มจีบี1ที่เพิ่มขึ้น พบว่าจำนวนเซลล์เคลื่อนที่มากที่สุดที่ปริมาณเอชเอ็มจีบี1 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และยังมีบทบาทในการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคมอลในมนุษย์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ได้มาจากฟันของผู้ป่วยที่ถูกถอนที่ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เนื่องจากเป็นฟันคุดหรือเพราะเหตุผลทางการจัดฟัน โดยไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย เนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ได้จากฟันจำนวน 3 ซี่ จากผู้ป่วย 3 คน ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้รับการยินยอมจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 11/2552

นำฟันที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ (phosphate buffer saline : PBS) หลายๆครั้ง แล้วจึงทำการเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก โดยการใช้มีดผ่าตัดตัดชิ้นเหงือกบริเวณคอฟันและตัดให้มีขนาดเล็กๆ ส่วนการเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ทำโดยใช้มีดผ่าตัดเลาะชิ้นเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ออกจากบริเวณตอนกลางของรากฟัน (middle third)

นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) ที่เติมซีรัมร้อยละ10 (10%FCS-DMEM) กลูตามีน (glutamine) ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (antibiotics and antimycotics) เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียสประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รอจนเซลล์เจริญออกมาจากชิ้นเนื้อจนเต็มจานเลี้ยง หลังจากนั้นทำการขยายจำนวนเซลล์โดยการถ่ายเซลล์ออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1: 3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอนไซม์ทริปซินอีดีทีเอ (Trypsin - EDTA) ช่วยในการทำให้เซลล์หลุดออกจากจานเลี้ยงเซลล์ รอจนเป็นเซลล์รุ่นที่ 3 ถึงจะใช้ในการทดลองจนถึงรุ่นที่ 8

การเตรียมเอชเอ็มจีบี1

การทดลองนี้ใช้รีคอมบิแนนท์ เอชเอ็มจีบี1 ของมนุษย์ (recombinant human HMGB1, Sigma, USA) โดยเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นสูง (stock solution) 2000 นาโนกรัม/มิลลิลิตรในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รอจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวน (proliferation assay) ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1

ศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวิธีเอ็มทีที (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay) โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Mossman T. ในปี1983[67] ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ไมโตคอนเดรียดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) จากเซลล์ที่มีชีวิต

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม แต่ละหลุมเซลล์มีความหนาแน่น 5000 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0, 5, 10, 50 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัม (serum free -DMEM) ทำซ้ำ 3 หลุมในแต่ละความเข้มข้น เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 6 วัน หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลายเอ็มทีที (MTT solution) ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 110 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม ใส่ในตู้อบอุณภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รอจนครบ 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเอ็มทีทีออก แล้วเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าเบา ๆ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่อ่านได้กับจำนวนเซลล์ โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เปลี่ยนจำนวนเซลล์โดยให้จำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100

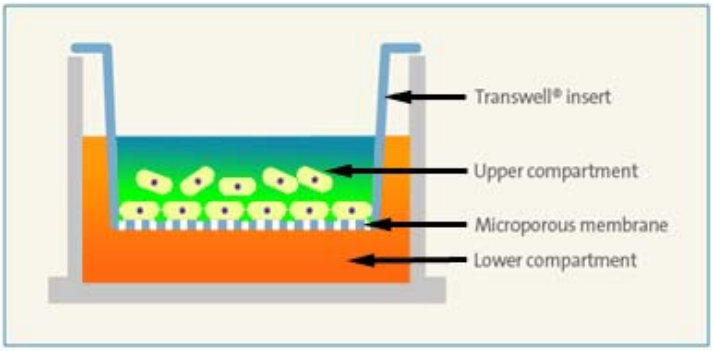
การศึกษาการเคลื่อนที่ (migration assay) ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1

การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ทำโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Degryse และคณะในปี 2001[26] โดยมีวิธีการดังนี้

แบ่งกลุ่มที่ทำการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุมลบ (negative control) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมกับน้ำปราศจากเชื้อ
2. กลุ่มควบคุมบวก (positive control) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ10 ที่เลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่ใช้แล้ว (fibroblast cultured medium) เป็นตัวกระตุ้น
3. กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 คือใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและเอชเอ็มจีบี1ที่มีความเข้มข้น 10 และ100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ทั้ง 3 กลุ่มถูกเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate) หลุมละ 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นวาง ทรานสเวล อินเสิร์ท (Transwell Insert: Corning Incorparation) ลงในทุกหลุมที่ทำการทดลอง แล้วทำการถ่ายเซลล์โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ อีดีทีเอ (PBS-EDTA) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ1 (1%FCS-DMEM) จนให้ได้เซลล์มีความหนาแน่น $1x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร ลงไปในส่วนบนของ ทรานสเวล อินเสิร์ท ปริมาตร 120 ไมโครลิตรดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างของทรานสเวล อินเสิร์ท

ที่มา: S. Dai, C. Sodhi, S. Cetin, et al. (2010) Extracellular High Mobility Group Box-1 (HMGB1) Inhibits Enterocyte Migration via Activation of Toll-like Receptor-4 and Increased Cell-Matrix Adhesiveness J BIOL CHEM; 285; 4995–5002

เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นก็ใช้ที่คีบหยิบทรานสเวล อินเสิร์ทออกมาเช็ดเซลล์ที่ติดค้างอยู่ทางด้านบนเมมเบรน (membrane) ด้วยสำลีพันก้าน ล้างเมมเบรนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ ย้อมเซลล์ทางด้านใต้เมมเบรนด้วยสารละลาย ตามลำดับดังนี้ ตรึงเซลล์ (fixation) ด้วย 20% เมทิลแอลกอฮอลล์ (methyl alcohol) 15 นาทีแล้ว ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 2.5% คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น ตัดแผ่นเมมเบรน วางเมมเบรนโดยส่วนด้านล่างสัมผัสแผ่นแก้วสไลด์ นับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า ร่วมกับการใช้โปรแกรมโมติก อิมเมจ แอดวานซ์ 3.1 (Motic Image Advanced 3.1 program)

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. การเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์เปรียบเทียบด้วย ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้การทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA

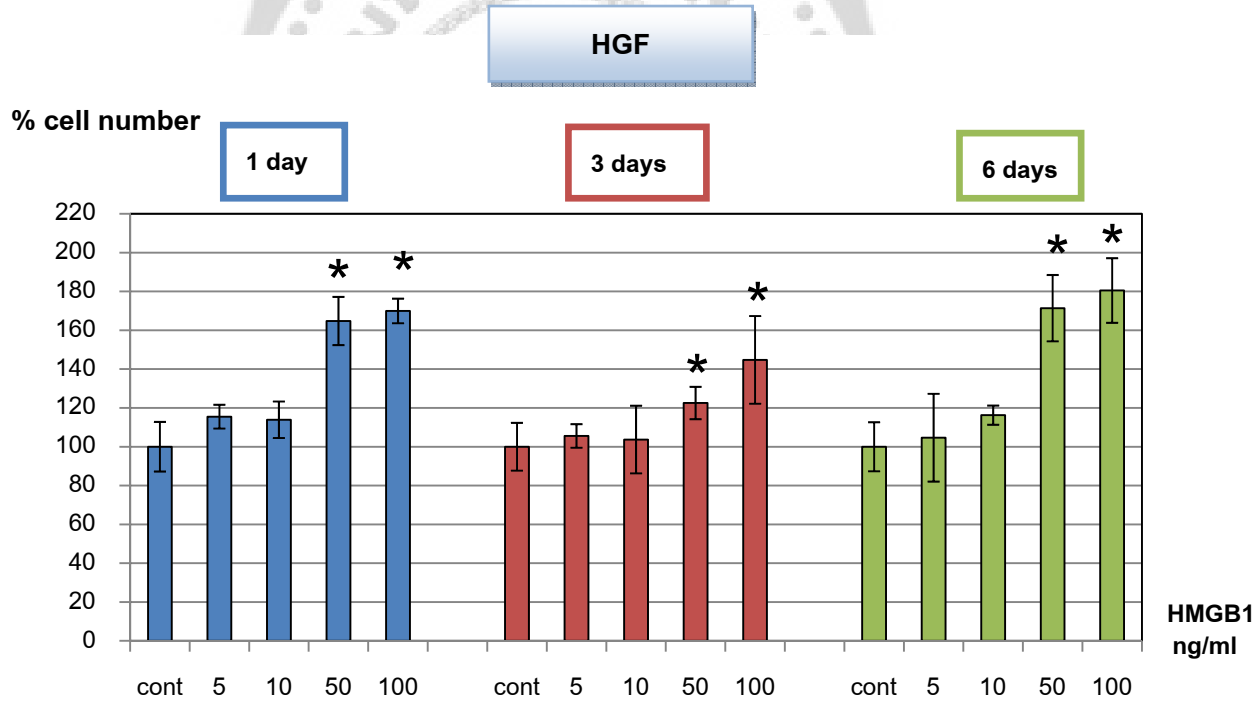
2. วัดจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับการใช้ โปรแกรมโมติก อิมเมจ แอดวานซ์ 3.1 ค่าที่ได้จะเป็นจำนวนเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ นำมาหาค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์โดยใช้การทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA

บทที่ 4
ผลการวิจัย

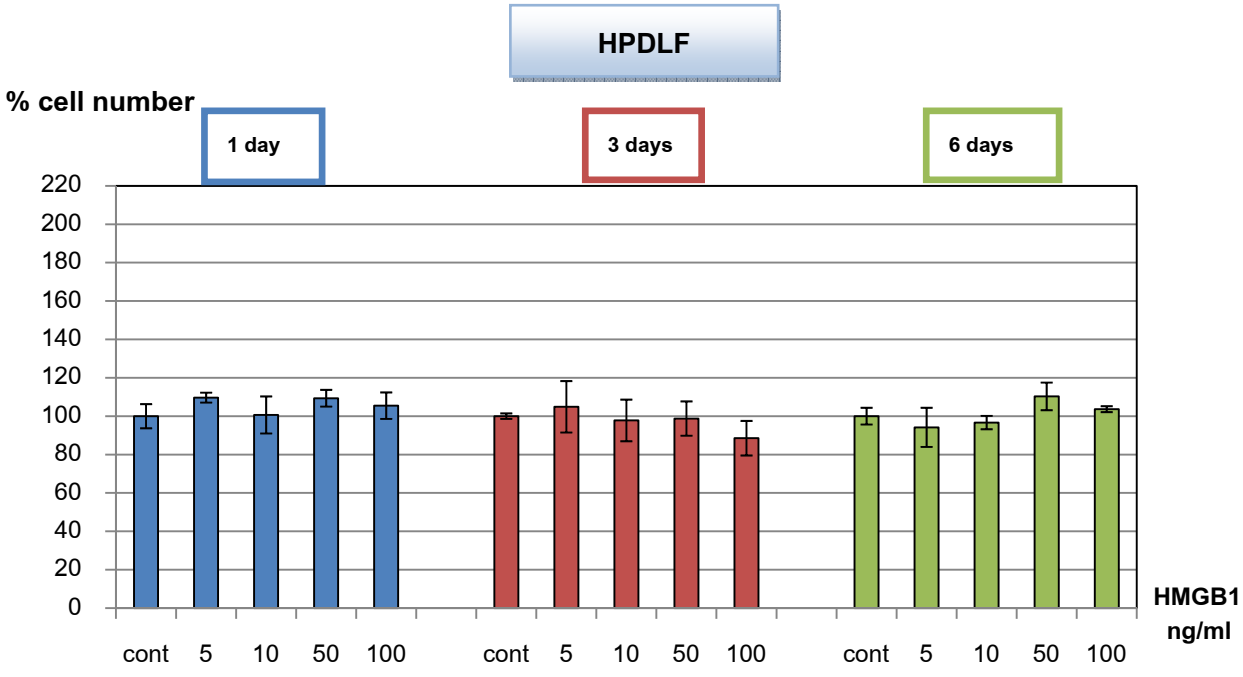
ผลของการศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี 1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีเอชเอ็มจีบี1 เป็นตัวกระตุ้นในขนาด 0, 5, 10, 50, 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1, 3 และ 6 วัน แล้วทำการวัดค่าจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกในวันที่ 1, 3 และ 6 พบการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพประกอบ 4 สำหรับเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในทุกความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 ที่นำมากระตุ้นเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งในวันที่ 1, 3 และ 6 ดังแสดงในภาพประกอบ 5



*แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ ที่ p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ภาพประกอบ 4 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 50 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ณ เวลา 1, 3 และ 6 วัน (HGF 1 วัน, HGF3 วัน and HGF 6 วัน) ตามลำดับ



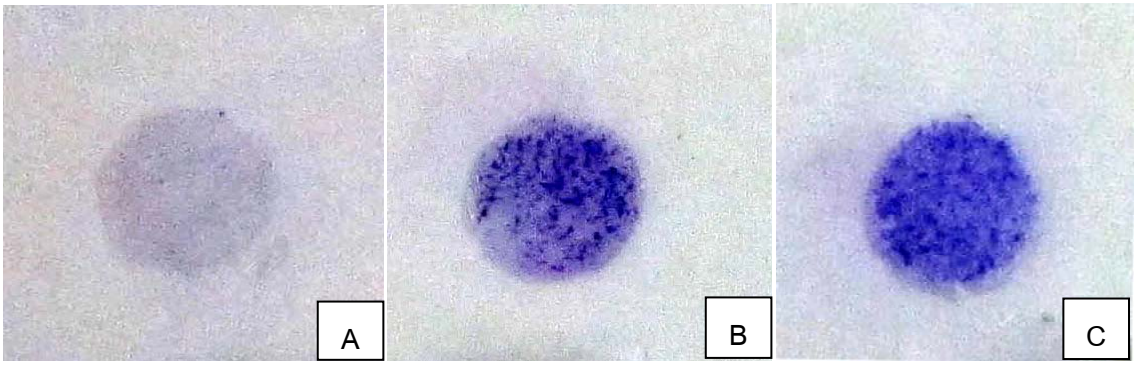
* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ ที่ p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ภาพประกอบ 5 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 50 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ณ เวลา 1, 3 และ 6 วัน (HPDLF 1 วัน, HPDLF 3 วัน, HPDLF 6 วัน) ตามลำดับ

ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี 1

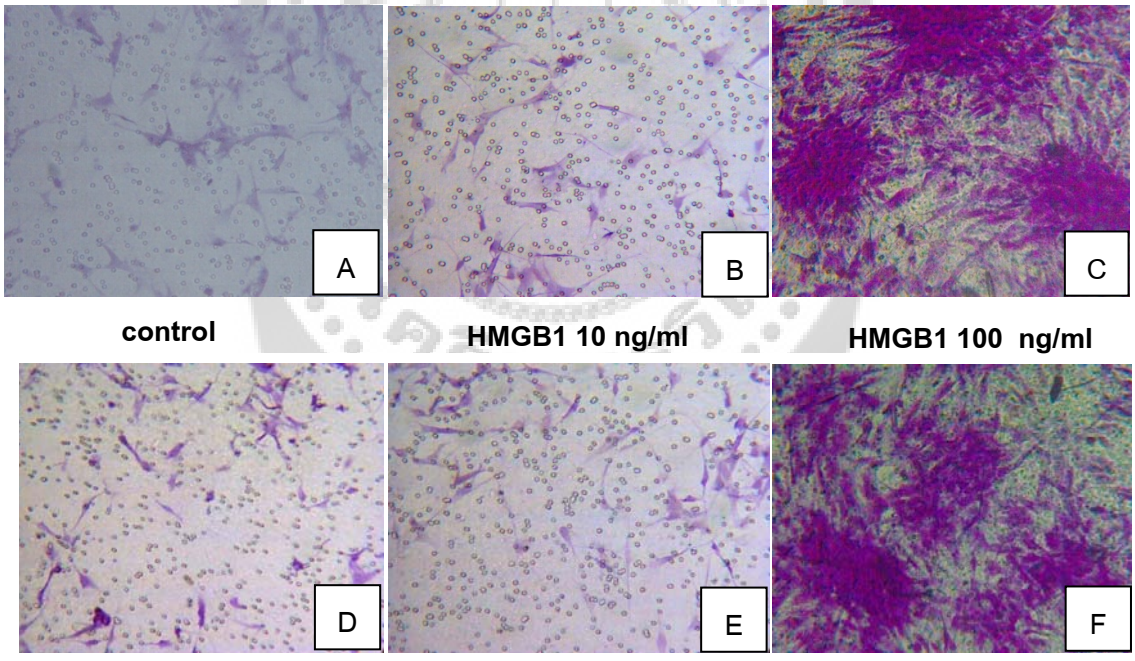
จากการทดลอง การกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์โดยใช้ ทรานสเวล อินเสิร์ทในสภาวะที่ไม่มีและมีเอชเอ็มจีบี1ขนาด 10 และ 100 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์จะมีการเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไปทางด้านล่างของเมมเบรน เมื่อทำการย้อมสีด้วย 2.5 % คริสตัลไวโอเลต จะมองเห็นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ติดสีม่วง ซึ่งสามารถมองเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวิร์ท (inverted microscope) ดังแสดงในภาพประกอบ 6 และ 7

จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยโปรแกรมโมติก อิมเมจ แอดวานซ์ 3.1 พบว่า เอชเอ็มจีบี1ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพประกอบ 8



Negative control **HMGB1 100 ng/ml** **Positive control**

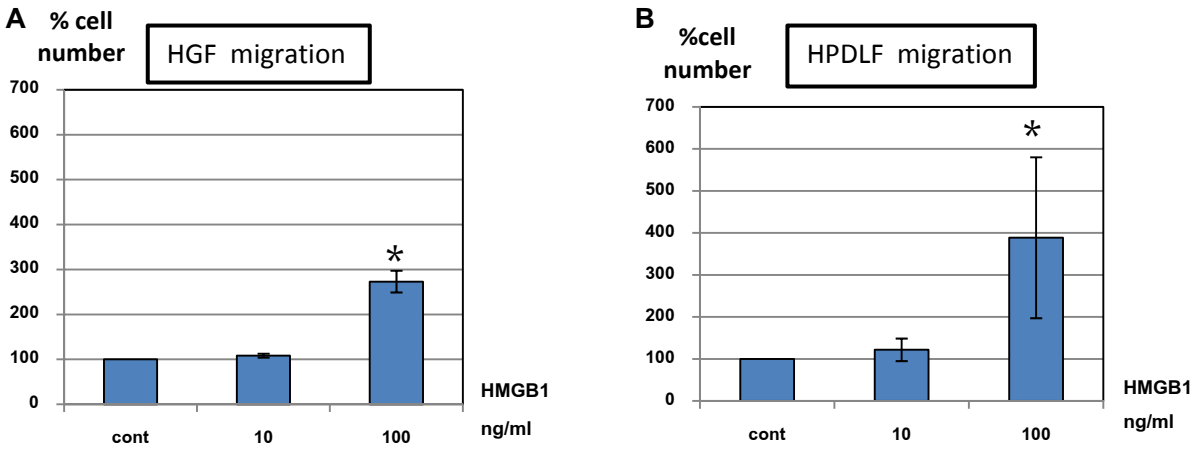
ภาพประกอบ 6 แสดงตัวอย่างแผ่นเมมเบรนเมื่อมองด้วยตาเปล่าแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมลบ (A) กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1ขนาด 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (B) และ กลุ่มควบคุมบวกดังรูป (C) ตามลำดับ



control **HMGB1 10 ng/ml** **HMGB1 100 ng/ml**

control **HMGB1 10 ng/ml** **HMGB1 100 ng/ml**

ภาพประกอบ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวิร์ท ที่กำลังขยาย 10 เท่า แสดงตัวอย่างเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1ที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (A, Bและ C) ตามลำดับ และเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1ที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (D, Eและ F) ตามลำดับ



* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ ที่ p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ภาพประกอบ 8 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (A) และเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ (B) ที่มีการเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรน ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ณ 16 ชั่วโมง

บทที่ 5
อภิปรายผลและบทสรุปผล

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัย อันได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์ การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมและปัจจัยเสี่ยงทางด้านสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อและทำให้เกิดการสูญเสียการยึดเกาะระหว่างฟันและเนื้อเยื่อรองรับข้างใต้[68] ในด้านการดำเนินของโรคปริทันต์อักเสบนั้นส่วนใหญ่จะเป็นผลอันเนื่องมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งร่างกายจะมีการหลั่งไซโตไคน์ กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเพื่อให้มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอม และยังส่งผลให้เกิดการละลายตัวของกระดูกและเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จนทำให้เกิดการสูญเสียฟันในที่สุด[69] เป้าหมายสูงสุดของการรักษาโรคปริทันต์ก็คือ การทำให้เกิดการงอกใหม่ของอวัยวะปริทันต์ (periodontal regeneration) ทั้งรูปร่างและหน้าที่ของอวัยวะปริทันต์ทั้งหมดคือส่วนของ เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน และกระดูกเบ้าฟัน[31]

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอวัยวะปริทันต์ ทำหน้าที่ร่วมกันในการส่งเสริมการทำงานของอวัยวะปริทันต์ให้เป็นไปโดยปกติ[1] อย่างไรก็ตามเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ก็มีข้อแตกต่างกันบางประการ อันดับแรกคือต้นกำเนิดของเซลล์ทั้งสอง เซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์มีต้นกำเนิดมาจากเอคโตเดอร์มอล มีเซ็นไคม์ (ectodermal mesenchyme) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่กำเนิดจากมีเซ็นไคม์ทั่วไป (general mesenchyme)[49] มีการศึกษาพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของแอลคาไลน์ ฟอสเฟตที่สูงกว่า และมีอัตราการเพิ่มจำนวนที่สูงกว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก[70] นอกจากนั้นในเรื่องของบทบาทหน้าที่ เซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มีบทบาทในการขยายสัญญาณในกระบวนการอักเสบ และควบคุมการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ส่วนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมี ความสามารถในการทำให้การหายของแผลหายเร็วขึ้นและมีส่วนในการสร้างและสลายเมทริกซ์[49]

จากผลการศึกษาครั้งนี้วัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีทีที่ 1, 3 และ 6 วัน ผลที่ได้พบว่าภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1พบการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เฉพาะในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเท่านั้น แต่ไม่พบในเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ โดยพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตรของเอชเอ็มจีบี1 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา เอชเอ็มจีบี1ส่งผลต่อจำนวนเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป มีทั้งในแง่การกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ เช่น เซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมาพบว่ากระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 10 และ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[25] ในเซลล์เคอร์ราติโนไซต์ที่ความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[27] ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดของมนุษย์ ที่ความเข้มข้น 30 นาโนกรัม/

มิลลิลิตร[58] ในเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของหนูที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[53] การศึกษาของ Germani A. และคณะ พบว่าเอชเอ็มจีบี 1 ส่งผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดหัวใจหนูที่เกิดโรคหัวใจขาดเลือด และยังส่งผลต่อการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์คาร์ดิโอไมโอไซต์ (cardiomyocyte)[60] สำหรับเซลล์บางประเภทเอชเอ็มจีบี1ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ เช่น ในกรณีของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของหนูซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่พบว่ามีผลในการยับยั้งการสร้างคอลลาเจน[71] และในเซลล์สร้างเส้นใยหัวใจของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[72] ในทางตรงข้ามพบฤทธิ์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ เช่น ในการศึกษาของ Meng E. และคณะ ในการกระตุ้นมีเซ็นไคมอลสเตมเซลล์มนุษย์ (mesenchymal stem cell) ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่ความเข้มข้น 12.5-400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[55]

ความแตกต่างของการตอบสนองระหว่างเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่สามารถระบุเหตุผลได้อย่างชัดเจน โดยอาจเป็นจากความแตกต่างพื้นฐานระหว่างเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ลักษณะที่แตกต่างกันอีกประการระหว่างเซลล์ทั้ง 2 ชนิด[49] ได้แก่ เซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มีคุณสมบัติในการสร้างตะกอนสารอนินทรีย์และมีตัวบ่งชี้ว่ามีคุณสมบัติเป็นกระดูกเช่น แอลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) เป็นต้น[70]

นอกจากบทบาทในการเพิ่มจำนวนเซลล์แล้ว เอชเอ็มจีบี1ยังมีผลในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์หลายชนิดได้แก่เซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมา[25] เซลล์เคอร์ราติโนไซต์[27] เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดมนุษย์[58] เซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของหนู[53] เซลล์หลอดเลือดของวัว[8] เซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด[7] การเคลื่อนที่เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์ในหลายสภาวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเกิดการหายของแผลให้มีประสิทธิภาพ จะต้องมีเซลล์ประเภทต่างๆ เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิดแผล ทั้งเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น นิวโตรฟิล (neutrophil) แมคโครฟาจ (macrophage) แมสเซลล์ (mast cell) เพื่อเข้ามากำจัดและทำลายสิ่งแปลกปลอม และยังต้องมีการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่บริเวณปากแผลมาปิดบริเวณปากแผลและเกิดการซ่อมสร้างขึ้น[31]

จากผลการศึกษานี้ ภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี 1 ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบผลดังกล่าวเมื่อใช้เอชเอ็มจีบี1ในขนาด 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเอชเอ็มจีบี1 มีผลในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์หลายชนิด ดังเช่นในเซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมาถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่โดยเอชเอ็มจีบี1ความเข้มข้น 10 และ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[25] ในเซลล์เคอร์ราติโนไซต์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ในความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1ที่ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรใน 6 ชั่วโมง[27] เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดของมนุษย์ในความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1ที่ 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[58] ในเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของหนูที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[53]

กระตุ้นการเคลื่อนที่ในเซลล์หลอดเลือดของวัวเอชเอ็มจีบี1ที่ 75 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[8] และกระตุ้นการเคลื่อนที่ในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคมอลเซลล์ ที่ความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 12.5-50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร[55] ความแตกต่างของระยะเวลาในการกระตุ้นและขนาดของเอชเอ็มจีบี1 ที่ใช้ในการศึกษาแต่ละครั้ง อาจเป็นลักษณะที่เกิดจากธรรมชาติของเซลล์แต่ละประเภทและวิธีการที่ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามมีเพียงการศึกษาเดียว ที่ระบุถึงผลของเอชเอ็มจีบี 1 ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์เอ็นเทอโรไซต์ในเยื่อบุของลำไส้เล็กที่ความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 100-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[73]

กล่าวโดยสรุปได้ว่าเอชเอ็มจีบี1 ส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ไปยังบริเวณที่มีเอชเอ็มจีบี1 เมื่อผนวกกับความรู้จากการศึกษาที่ผ่านๆ ว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการสร้างเอชเอ็มจีบี1ภายในเซลล์[28] และสามารถถูกกระตุ้นให้หลั่งเอชเอ็มจีบี1ในสภาวะที่เกิดการอักเสบ[29] นอกจากนั้น เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันหลายตัว เช่น แมคโครฟาจและโมโนไซต์[74] ก็มีการหลั่งเอชเอ็มจีบี 1 ได้เช่นกัน เป็นที่ทราบกันดีว่า เอชเอ็มจีบี1 เป็นสื่ออักเสบที่ส่งสัญญาณให้ร่างกายทราบว่ามีการอักเสบและหลั่งออกมาหลังสุดเมื่อเทียบกับสื่อกลางตัวอื่นๆเช่น อินเตอร์ลิวคินเบตาเป็นต้น[6] ซึ่งนอกเหนือจากบทบาทในกระบวนการอักเสบเอชเอ็มจีบี1 อาจจะมีผลในการที่จะทำให้เกิดการหายของแผลที่เร็วขึ้น ในการที่มีคุณสมบัติดึงดูดเซลล์อักเสบมาในระยะของการอักเสบต่อมาในกระบวนการเจริญของเนื้อเยื่อและระยะของการปรับเปลี่ยน ก็ดึงดูดและเพิ่มจำนวนเซลล์อื่นๆเช่น เซลล์สร้างเส้นใยมาในขั้นตอนที่เกิดการซ่อมสร้าง ในกรณีของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ การที่เอชเอ็มจีบี1กระตุ้นการเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนย่อมส่งผลให้การซ่อมแซมเนื้อเยื่อเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น รายละเอียดในเรื่องของกลไก รีเซพเตอร์ ที่ใช้สำหรับกระบวนการดังกล่าว ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

บทสรุป

ภายใต้สภาวะของการวิจัยนี้ พบว่าเอชเอ็มจีบี1กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ และยังพบว่าเอชเอ็มจีบี1 กระตุ้นการเคลื่อนที่ของทั้งเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Cho MI, Garant PR, Development and general structure of periodontium. *Periodontol 2000*. 2000; 24: 9-27.
2. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997; 13: 20-40.
3. Callaghan A, Wang J and Redmond HP. HMGB1 as a key mediator of tissue response to injury: roles in inflammation and tissue repair. *Eur Surg*. 2006; 3814: 283-92
4. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 170–8.
5. Lange SS, Vasquez KM. HMGB1: The jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol Carcinog*. 2009; 48: 571–80.
6. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 1768–73.
7. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol*. 2004; 164: 441-9.
8. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, Melloni E, Presta M. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol*. 2006; 176: 12-5.
9. Gauley J, Pisetsky DS. The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity.* 2009; 42: 299-301.
10. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 1318-25.
11. Andersson U, Erlandsson HH, Yang H, Tracey KJ. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol.* 2002; 72: 1084-91.
12. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 285: 248-51.
13. Müller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianch ME. New embo members review: The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 2001; 20: 4337–40.

14. Rendon MB, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, Susarla S, Czura C, Mitchell RA, Chen G, Sama AE, Tracey KJ, Wang H. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003; 170: 3890-7.
15. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005; 78: 1-8.
16. Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin Chim Acta*. 2007; 375: 36-42.
17. Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17: 189-201.
18. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med*. 2004; 255: 320-31.
19. 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: 52-8.
20. Andersson U, Erlandsson HH. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med*. 2004; 255: 344-50.
21. Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, Mitra S, Kwak SH, Yamada S, Maruyama I,Ishizaka A, Abraham E. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288: 958–65.
22. Haffajee AD , Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontal 2000*. 1994; 5: 78-111.
23. Morimoto Y, Kawahara KI, Tancharoen SK, Matsuyama T, Hashiguchi T, Izumi Y, Maruyama I. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility group box-1. *J Periodontal res*. 2008; 43: 76-83.
24. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, De Mori R, Guerra L, Maurelli R, Panacchia L, Di Giacomo F, Palumbo R, Di Campli C, Uccioli L, Biglioli P, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2008; 128:1545-53.
25. Bassi R, Giussani P, Anelli V, Colleoni T, Pedrazzi M, Patrone M, Viani P, Sparatore B, Melloni E, Riboni L. HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration. *J Neurooncol*. 2008; 87: 23-33.

26. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 2001; 152: 1197-206.
27. Ranzato E, Patrone M, Pedrazzi M, Burlando B. HMGb1 promotes scratch wound closure of HaCaT keratinocytes via ERK1/2 activation. *Mol Cell Biochem*. 2009; 332: 199–205
28. Nantasenee K. Effect of LPS on HMGB1 expression in human periodontal ligament fibroblasts. (Dissertation M.Sc. Periodontology). Srinakharinwirot University. 2006.
29. Punpa R. HMGB1 Expression in Human Gingival and PDL Fibroblast Activated by Periodontopathic Bacteria. (Dissertation M.Sc. Periodontology). Srinakharinwirot University. 2009.
30. Arthur RH, Antonio Nanci. Cytoskeleton, Junctions, Fibroblasts and Extracellular matrix. In: John JD, editor. Ten cate's. Oral histology development, structure and function. 7th ed. China. Mosby Elsevier; 2008; 57-78.
31. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*. 2006; 41: 30-47.
32. Müller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med*. 2004; 255: 332-43.
33. 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; 38: 14-9.
34. Yang D, Oppenheim JJ. Alarmins and antimicrobial immunity. *Med Mycol*. 2009; 47: 146-53.
35. Bustin M, Lehn DA, Landsman D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1049: 231–43.
36. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet*. 1999; 22: 276-80.
37. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28: 367–88.
38. Harris E, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur. J. Immunol*. 2004; 34: 1503–12.

39. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol.* 2009; 86: 573-6.
40. Chen G, Ward MF, Sama AE, Wang H. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res*. 2004; 24: 329-33.
41. Helderman WH. Microbial etiology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1981; 8: 261-80.
42. Genco RJ. Host responses in periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992; 63: 338-55.
43. Michael G. Newman, DDS, Takei H, DDS, Perry R. Klokkevold, DDS, MS, Carranza FA. Dr. Odont. Carranza's Clinical Periodontology: Expert Consult, 10th edition 218-277.
44. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J Periodontal Res*. 1996; 31: 90–8.
45. Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *porphyromonas gingivalis* and *actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 177–80.
46. El-Awady AR, Messer RL, Gamal AY, Sharawy MM, Wenger KH, Lapp CA. Periodontal ligament fibroblasts sustain destructive immune modulators of chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010; 81: 1324-35.
47. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol 2000*. 2000; 24: 56-72.
48. 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: 292-8.
49. Grant PR. Oral mucosa. In: Arinne Dickson, editor. Oral cell and Tissues. Canada: Quintessence. 2003; 81-122.
50. Karp G. Cell signaling pathways. In: John Wiley& sons, editors. Cell biology. 6th ed. Singapore. 2010; 605-44.
51. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 1999; 19: 40-58.
52. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, Zeh HJ, Billiar T, Rubartelli A, Lotze MT. Masquerader: High Mobility Group Box-1 and Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2836-48.
53. Ranzato E, Patrone M, Pedrazzi M, Burlando B. Hmgb1 promotes wound healing of 3T3 mouse fibroblasts via RAGE-dependent ERK1/2 activation. *Cell Biochem Biophys.* 2010; 57: 9-17.

54. Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Müller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2005; 97: 73-83.

55. Meng E, Guo Z, Wang H, Jin J, Wang J, Wang H, Wu C, Wang L. High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway. *Stem Cells Dev.* 2008; 17: 805-13.

56. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*. 2004; 279: 7370-7.

57. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 41-55.

58. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, Maseri A. and Bianchi Marco E. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J*. 2006; 20: 2565-6.

59. Cooper GM, Hausman RE. The cytoskeleton and cell movement. In: Cooper GM, editor. The cell a molecular approach. 3rd ed. U.S.A. 2004. 454-82.

60. Germani A, Limana F, Capogrossi M. Pivotal Advance: High-mobility group box 1 protein-a cytokine with a role in cardiac repair. *J. Leukoc Biol*. 2007; 81: 41–5.

61. Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, Bianchi ME. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J Cell Biol*. 2007; 179: 33-40.

62. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc Biol*. 2007; 81: 59-66.

63. Parkkinen J, Raulo E, Merenmies, J, Nolo, R, Kajander, E. O.,Baumann, M and Rauvala, H. Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1993; 268: 19726-38.

64. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H. Regulation of monocyte migration by amphoterin . *Blood*. 2004; 104: 1174-82.

65. Sharma A, Ray R ,Rajeswari MR. Overexpression of High Mobility Group (HMG) B1 and B2 Proteins Directly Correlates with the Progression of Squamous Cell Carcinoma in Skin. *Cancer Invest*. 2008; 26: 843-851

66. Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 1165-70.

67. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.

68. Page RC, Kornman KS The pathogenesis of human periodontitis. *Periodontol 2000*.1997; 14:9-11.

69. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles*. Periodontol 2000.* 2012; 52:163-206.

70. Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HS, Kim BO and Han KY. Isolation and Characterization of Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblast-Specific cDNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001*;* 282: 1145–53.

71. Zhang Q, O'Hearn S, Kavalukas SL., Barbul A. Role of High mobility group box 1 (hmgb1) in wound healing. *J Surgical research*. Article in press.

72. Rossini A, Zacheo A, Mocini D, Totta P, Facchiano A, Castoldi R, Sordini P, Pompilio G, Abeni D, Capogrossi MC, Germani A. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44: 683-93.

73. Dai S, Sodhi C, Cetin S, Richardson W, Branca M, Neal MD, Prindle T, Ma C, Shapiro RA, Li B, Wang JH, Hackam DJ. Extracellular high mobility group box-1 (HMGB1) inhibits enterocyte migration via activation of Toll-like receptor-4 and increased cell-matrix adhesiveness. *J Biol Chem.* 2010; 285: 4995-5002.

74. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis*. J Intern Med.* 2004; 255: 320-31.

75. Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 1165-70.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	อธิษฐาน ชิตานุวัฒน์
วัน เดือน ปีเกิด	23 กุมภาพันธ์ 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดลำปาง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	127/138 หมู่บ้านซิกเนเจอร์ วิภาวดีรังสิต 60 แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ทันตแพทย์ ระดับชำนาญการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาลอ่าวอุดม อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2539 – 2542	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง
พ.ศ. 2542 – 2547	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2552 – 2555	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ