รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

The examination of anti-inflammatory action of fractionated Royal Jelly Part II on Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Fibroblasts

โดย

อ.ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ

หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย

ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ต่อ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

บทคัดย่อ

นมผึ้งหรือรอยัลเยลลี่ เป็นผลิตภัณฑ์จากการเลี้ยงผึ้งชนิดหนึ่ง ที่สามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการส่งเสริมสุขภาพในรูปแบบต่าง ๆ เมื่อนำนมผึ้งแยกส่วนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีชนิด Q-Sepharose และนำนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จากเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2.5 ติดตามการแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) และ Interleukin-1-beta (IL-1-beta) โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกกับยีน GRADH ด้วยเทคนิค Real time PCR พบว่านมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ส่งเสริมการแสดงออกของยีนของสารสื่อกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น TNF-alpha และ IL-1-beta ในเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออก 70.89 และ 7.26 เท่าในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์ และมีระดับกสนแสดงออก 516.7 และ 80.05 เท่าในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงเซลล์ทั้งสองชนิดจะมีระดับการแสดงของยีน TNF-alpha และ IL-1-beta ลดลง

The Examination of Anti-inflammatory Action of Fractionated Royal Jelly Part II on Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Fibroblasts

ABSTRACT

Royal jelly (RJ) is a commercially mass product from beekeeping and popularly used as health supplement in a various forms. When water soluble RJ was partial purified by using Q-Sepharose column chromatography, RJ fraction part 2 was obtained. The concentration of 0.15 mg/ml of RJ part 2 was then investigated to anti inflammation activity on human gingival fibroblast and periodontal ligament fibroblast cells treated with 1 μg/ml of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysacchride (LPS) in DMEM containing 2.5 % (v/v) serum for 4 and 24 hours. Real-time PCR was performed for the relative quantification of gene expression of selected proinflammatory cytokine such as Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and Interleukin-1-beta (IL-1-beta) was observed by compared with GAPDH level. The result show that the cell incubation at 4 hour with RJ increased level of TNF-alpha and IL-1 beta gene expression by 70.89 and 7.26 fold in human gingival fibroblast cell, respectively, and 516.7 and 80.05 fold in human periodontal ligament fibroblast cell, respectively. However, these expressions would be come down in the incubation at 24 hour.

ประกาศคุณูปการ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของนมผึ้งแยกส่วนจากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี ส่วนที่ 2 ต่อการแสดงออกของยีนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ยังคงเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ ในการแยกส่วนนมผึ้ง และ การทำสารตัวอย่างแห้งด้วยความเย็น

ขอขอบคุณ บริษัท ไบโอจีโนเมด จำกัด, คุณทรงศักดิ์ รักษาสุข และคุณเกล้ากมล สุนทรชื่น ผู้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือและคำแนะนำในปฏิบัติการของเทคนิค Real-time PCR

รวมทั้งขอขอบคุณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ผู้สนับสนุนทุนจากทุนอุดหนุน งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2554 ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลำล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ

ดวงพร ศรีสุภาพ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	
ประกาศคุณูปการ	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	6
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	11
บรรณานุกรม	13
ประวัติย่อผู้วิจัย	16

บัญชีตารางและภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 4.1 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน TNF- alpha (A) และ IL-1-beta (B) ในเซลล์ไฟโบร-บลาสต์เหงือกมนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS ในสภาวะที่มีและไม่นมผึ้งความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง 8

รูปที่ 4.2 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน TNF alpha (A) และ IL-1-beta (B) ในเซลล์ไฟโบร-บลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS ในสภาวะที่มีและไม่นมผึ้งความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง 9

บทที่ 1

บทนำ

การอักเสบ (inflammation) เป็นการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) อย่างหนึ่ง เมื่อมีการรุกรานของสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส หรือสิ่งก่อภยันตราย (injurious agents) ปฏิกิริยาที่สำคัญอันหนึ่ง คือการสร้างและคัดหลั่งสารเพื่อปกป้องและกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น ในบุคคลที่มีสุขภาพดีจะยังคงรักษาสมดุลระหว่างการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านและความรุนแรงของสิ่งแปลกปลอม หากการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านด้อยลงไปก็จะนำไปสู่การเกิดโรคและการทำลายเนื้อเยื่อต่อไป โดย cytokine เป็นสารสื่อกลาง (mediator) ของการอักเสบชนิดหนึ่งในหลาย ๆ ชนิดจำพวก polypeptide ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ต่อการอักเสบ สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้การตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบได้ เช่น interleukin-1 (IL 1), Tumor Necrotic Factor (TNF) เป็นต้น (1)

นมผึ้งหรือที่เรียกกันว่ารอยัลเจลลี่ (Royal jelly) เป็นอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้จากธรรมชาติในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง โดยมีองค์ประกอบทางเคมีมากมาย โดยมี โปรตีนมากที่สุดถึงร้อยละ 12-17 น้ำตาลร้อยละ 10-12 และลิปิดร้อยละ 3-4 ตามลำดับ (2,3,4)การศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของนมผึ้งพบว่านมผึ้งมีบทบาทหลายรูปแบบ เช่น ฤทธิ์ในการต้ายทานแบคทีเรีย (5,6) ฤทธิ์ต่อการปรับสมดุลของร่างกาย (7) รวมทั้งมีผลต่ออัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ลายน์ U-937 และ HB4C5 (8) ขณะเดียวกันก็จะมีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ลายน์ UM และ THP-1 (8) และเซลล์มะเร็ง Ehrlich และ Salcama-180 ได้ (9,10) สำหรับการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของนมผึ้งได้มีการวิจัยตรวจวิเคราะห์การลดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้น (11)

ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของนมแยกส่วนจากเทคนอคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี ส่วนที่ 2 ในงานวิจัยครั้งนี้ มุ่งขยายผลงานจากการศึกษาเรื่อง “การแยกส่วนนมผึ้งและการทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์” ของดวงพร ศรีสุภาพ โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ คณะทันตแพทยศาสตร์ประจำปี 2553 โดยพบว่าในนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 เป็นส่วนที่มีความบริสุทธ์ของโปรตีนมากที่สุด และสามารถแยกได้ในปริมาณมากเพียงพอต่อการทำการทดลอง เป็นส่วนที่น่าสนในการศึกษาทดสอบฤทธิ์ที่หลากหลายทางชีวภาพต่อไป

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cytokine เป็นสารสื่อกลาง (Mediator) การอักเสบในการอักเสบชนิดหนึ่งที่คัดหลั่งมาจากเซลล์ เป็น polypeptide ควบคุมการทำงานของเซลล์ที่ก่อการอักเสบ และนำไปสู่การเริ่มกระตุ้นและการดำเนินของโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดขึ้นในช่องปากส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการอักเสบ สารสื่อกลางการอักเสบนี้จะส่งผลต่อการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ การทำลายอวัยวะต่าง ๆ สำหรับ cytokine ที่มีความสำคัญต่อการอักเสบและการเกิดโรคในช่องปาก ได้แก่ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), Interlukin1-bata (IL-1-beta), Interlukin-6 (IL-6) เป็นต้น ซึ่งได้มีการนำมาใช้เป็นเครื่องหมายติดตาม (biomarkers) ในการวินิจฉัยโรคอย่างมีประสิทธิภาพได้ (1) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ก็เป็นกลุ่มเซลล์ชนิดหนึ่งที่สามารถก่อให้เกิดการอักเสบได้

สำหรับนมผึ้งซึ่งเป็นอาหารสำหรับผึ้งนางพญา ที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของตัวหนอนที่จะเจริญเป็นตัวเต็มวัยต่อไป มีองค์ประกอบทางเคมีด้วยสารต่าง ๆ มากมายหลายชนิด ในองค์ประกอบทางเคมีเหล่านี้จะมีโปรตีนเป็นสารอาหารหลักอยู่ประมาณร้อยละ 12-17 (2,3,4) สามารถจัดจำแนกชนิดของโปรตีนตามลำดับกรดอะมิโนที่ปลายสายด้านหมู่อะมิโนได้ 5 ชนิด คือ MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 และ MRJP 5 และจากการวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้าบนอะคริลาไมด์เจลซึ่งเป็นตัวกลาง (SDS-PAGE) พบว่าโปรตีนกลุ่มนี้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 49-87 กิโลดาลตัน โดย MRJP4 จะไม่สามารถพบได้เมื่อทำการวิเคราะห์ในระดับโปรตีน (12) MRJP 1 จะเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดร้อยละ 31 และพบ MRJP3, MRJP2 และ MRJP5 รองลงมาร้อยละ 26, 16 และ 9 ตามลำดับ

การออกฤทธิ์ของนมผึ้งมีบทบาทหลายรูปแบบ (13) โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ฤทธิ์ในการต้ายทานแบคทีเรีย (5,6) ฤทธิ์ต่อการปรับสมดุลของร่างกาย (7) ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยมีผลต่อการเพิ่มจำนวนทีเซลล์ (T-cell) (14) และในสัตว์ทดลองจะกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกัน (15) รวมทั้งมีผลต่ออัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ลายน์ U-937 (10) เซลล์ไฟโบรบลาต์ของหนูได้โดยการใช้โปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 57 กิโลดาลตัน (16) และเซลล์ MC3T3-E1 ซึ่งเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูกของหนู

การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบนั้น ในปี 2004 จากการกระตุ้นเซลล์ macrophage ในหนูด้วย Lipopolysaccharide (LPS) และ Interferon-gamma (IFN-gamma) และนำเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นมาเลี้ยงในสภาวะที่มีนมผึ้งในส่วนละลายน้ำ จะพบว่า มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine อันได้แก่ และ TNF-alpha, IL-1 และ IL-6 โดยปริมาณที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (11) และในปีต่อมามีศึกษาถึงผลของโปรตีนหลักของนมผึ้งชนิด MRJP 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุด ต่อการกระตุ้นการสร้างสารสื่อกลาง cytokine ของเซลล์เยื่อบุที่ผิวหนังมนุษย์ (human keratinocyte cell) จากการตรวจวัดระดับปริมาณการแสดงออกของยีน TNF-alpha, IL-1-beta, Transforming growth factor-beta (TGF-bata) รวมทั้ง MMP-9 พบว่า โปรตีน MJRP1 ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน TNF-alpha เป็นสองเท่าของเซลล์ปรกติ อย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงมีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน IL-1-beta, TGF-bata และ MMP 9 แต่ผลที่ได้ไม่แตกต่างกับเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (19)

ในปัจจุบันการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของนมผึ้งโดยใช้นมผึ้งแยกส่วนยังมีอยู่น้อย ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งที่จะขยายผลจากการแยกส่วนนมผึ้งในส่วนที่มีความบริสุทธิ์สูงต่อการต้านการอักเสบของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกมนุษย์และเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญทางด้านทันตแพทย์ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยทางด้านต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมนมผึ้ง

นมผึ้งชนิดผง ที่ผลิตจากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาละลายใน 1% Phosphate Buffer Saline ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน นำมาปั่นตกตะกอนส่วนที่เหลือ ที่แรงเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และนำสารละลายส่วนใสมาแยกส่วนด้วยคอลัมน์ Q-sepharose เก็บนมผึ้งที่แยกส่วนได้จากคอลัมน์ในส่วนที่ 2 ทำการทดลองต่อไป

3.2 การทดสอบความเป็นพิษของนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ต่อเซลล์

ถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ที่ความหนาแน่น 10,000 เซลล์ต่อหลุมต่อ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 วัน นำมาทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงในสภาวะที่มีนมผึ้งที่แยกส่วนได้ในแต่ละส่วนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่มีนมผึ้ง และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบหาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอ็นไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโตคอนเดรีย โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งและเติม 110 ไมโครลิตรของสารละลายผสมระหว่าง 100 ไมรโครลิตรของสารละลายเอ็มทีทีกับ 10 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงที่ไม่มีซีรัม) ลงในหลุม นำเข้าตู้อบ เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกและเติมสารละลายดีเอ็มเอสโอ 100 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำผลการทดลองมาสร้างกราฟและคำนวณหาความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษทำการทดลองต่อไป

3.3 การทดสอบการลดการอักเสบภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2

3.3.1 การเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้น

ถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 วัน นำกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ที่ได้จากการสกัดเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มีนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ความเข้มข้น 0.15

3.3.2 การสกัด RNA และ การสร้าง cDNA

นำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นในสภาวะต่าง ๆ มาสกัด RNA ทั้งหมด (total RNA) ด้วยชุดสกัดตามคำแนะนำของบริษัทและสร้าง cDNA โดยนำ mRNA ที่ได้มาเป็นแม่พิมพ์และใช้ไพรเมอร์ Oligo dT เป็นจุดเริ่มเกาะบน mRNA และสร้างสาย DNA สายใหม่ขึ้นด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ในชุดสร้างสาย cDNA ตามคำแนะนำของบริษัท

3.3.3 การเพิ่มปริมาณ cDNA ณ ตำแหน่งของยีนที่สนใจและตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิค real time PCR

เมื่อนำ cDNA ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยา เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ณ ตำแหน่งของยีนที่สนใจอันได้แก่ TNF-alpha, IL-1beta และ GAPDH ด้วยไพรเมอร์จำเพาะของแต่ละชนิด เปรียบเทียบค่าปริมาณการสร้างยีนที่แสดงออกเหล่านี้ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นและอยู่ในสภาวะที่มีและไม่นมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ด้วยเทคนิค real time PCR และติดตามผลจากการติดสี SYBR-Green ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแต่ละยีนจะควบคุมโดยยีนที่มีการแสดงออกปรกติ (housekeeping gene) เช่น beta-actin หรือ GAPDH หรือ 28S RNA เป็นต้น

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การทดสอบความเป็นพิษของนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ต่อเซลล์

นำสารละลายนมผึ้งส่วนที่ละลายน้ำ แยกส่วนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีโดยใช้คอลัมน์ชนิด Q-sepharose และชะล้างสารละลายนมผึ้งที่ความเข้มข้น 0-0.3 M NaCl เก็บนมผึ้งแยกส่วนที่อยู่บนคอลัมน์ ส่วนที่ 2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกมนุษย์และเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้เรื่อง “การแยกส่วนนมผึ้งและการทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์” ของดวงพร ศรีสุภาพ โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ คณะทันตแพทยศาสตร์ประจำปี 2553 ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของนมผึ้งแยกส่วนในแต่ละส่วน พบว่านมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน คือ 1.2, 0.6, 0.3, 0.15 และ 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยง DMEM ที่มี 2.5 % serum เป็นเวลา 1 วันและทดสอบหาการมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่าร้อยละ 90 ในงานวิจัยครั้งนี้จึงขออ้างอิงดังที่กล่าวมา และเมื่อนำนมผึ้งแยกส่วนส่วนที่ 2 นี้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากันกับที่ทดสอบข้างต้นพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เช่นเดียวกัน

ผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า นมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่พบในช่องปากทั้งสองชนิด ทั้งนี้เซลล์ทั้งสองยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่าร้อยละ 50 จึงไม่สามารถคำนวณค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไปร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดได้

4.2 การทดสอบการลดการอักเสบภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2

4.2.1 การเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้น

จากการศึกษาเรื่อง เรื่อง “การแยกส่วนนมผึ้งและการทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์” ของดวงพร ศรีสุภาพ โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ คณะทันตแพทยศาสตร์ ประจำปี 2553 พบว่าความเข้มข้นของนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 51.0 นั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงขอใช้ นมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ต่อไป

โดยนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่พบในช่องปากทั้งสองชนิดนี้มากระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย Lipopolysaccharide หรือเรียกชื่อย่อว่า LPS ของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์ชนิดหนึ่งในความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยง DMEM ที่มี 2.5 % serum เป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง โดยมีซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั้งสองชนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงดังกล่าว เป็นสภาวะปกติที่ไม่มีการกระตุ้นใด ๆ เป็นการการทดลองควบคุม

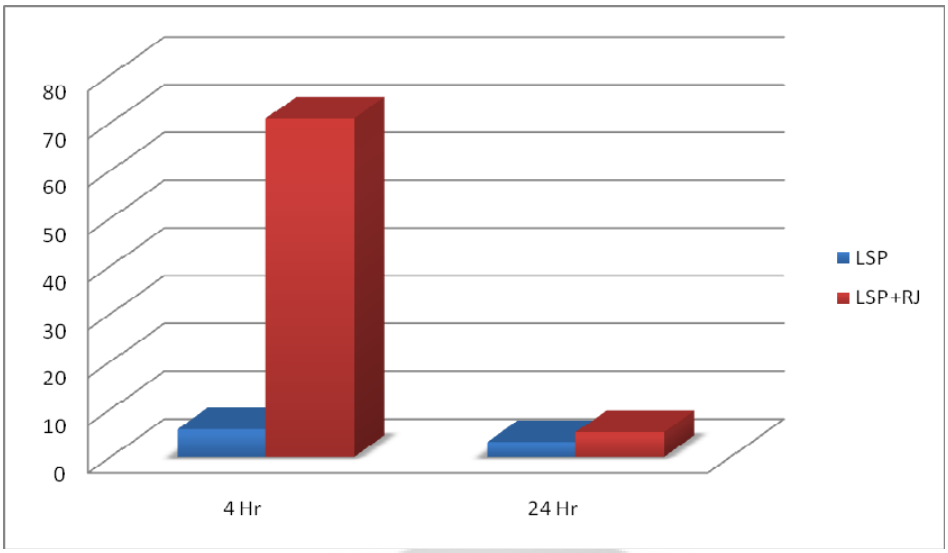
4.2.2 การสกัด RNA, การสร้าง cDNA และตรวจวัดการแสดงออกของยีด้วยเทคนิค real time PCR

นำเซลล์ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นมาสกัด RNA โดยละลาย RNA ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเอ็นไซม์ RNase 20 ไมโครลิตรจะได้ RNA มีที่ความเข้มข้นในช่วง 0.25-0.55 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลาย RNA ปริมาณ 3 ไมโครกรัมมาสร้าง cDNA และทำการทดสอบวิธีการสกัดและการสร้าง cDNA ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ซึ่งเป็นยีนจำเป็นของเซลล์ที่มีการแสดงออกปรกติ (housekeeping gene) พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีการแสดงออกของยีน GAPDH แสดงให้เห็นว่าการทดลองมีศักยภาพในการสกัดและสร้าง cDNA ได้ดี

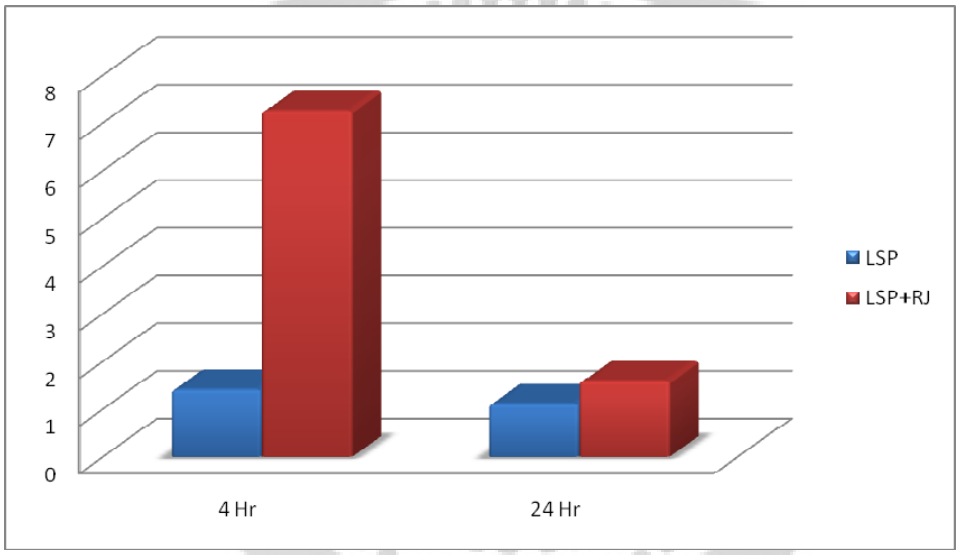
4.2.3 การเพิ่มปริมาณ cDNA ณ ตำแหน่งของยีนที่สนใจและตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิค real time PCR

นำ cDNA ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดระดับการแสดงของยีน TNF-alpha และ IL-1beta โดยเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนกับระดับการแสดงของยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Real time PCR ได้ผลดังรูป

A

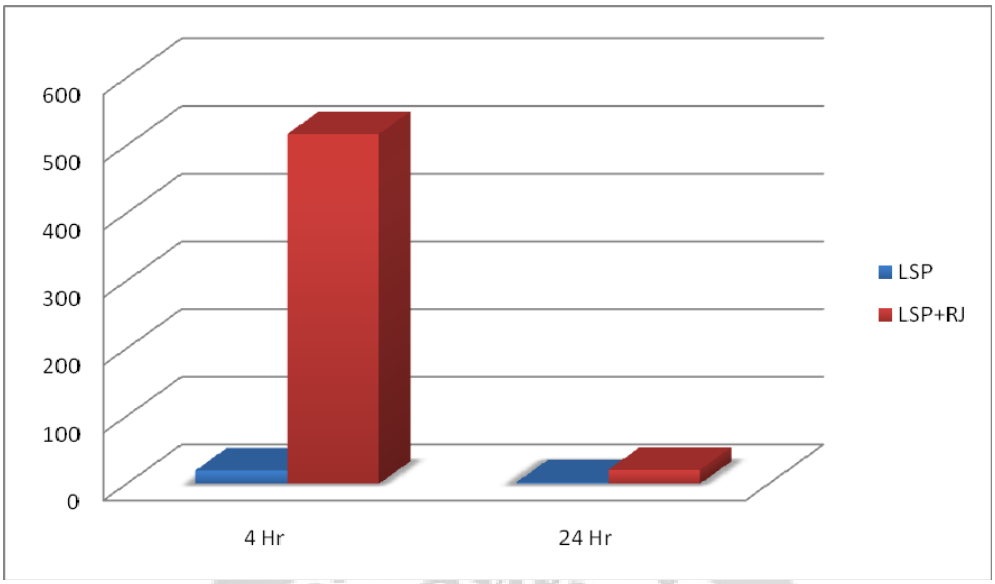


B

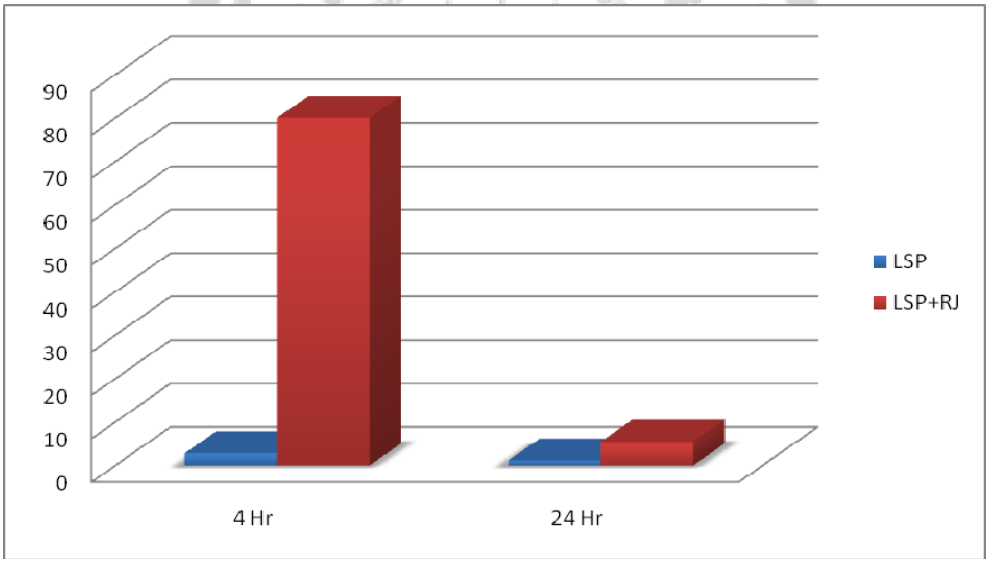


รูปที่ 4.1 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน TNF- alpha (A) และ IL-1-beta (B) ในเซลล์ไฟโบร-บลาสต์เหงือกมนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS ในสภาวะที่มีและไม่นมผึ้งความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

A



B



รูปที่ 4.2 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน TNF alpha (A) และ IL-1-beta (B) ในเซลล์ไฟโบร-บลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS ในสภาวะที่มีและไม่นมผึ้งความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากกราฟดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ทั้งสองถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS มีการแสดงออกของยีน TNF-alpha และ IL-1-beta ภายใน 4 ชั่วโมง โดยในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์จะมีสัดส่วนการแสดงออกของยีนอยู่ที่ 5.77 และ1.41 เท่าตามลำดับ ขณะที่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์จะมีสัดส่วนการแสดงออกของยีนอยู่ที่ 19.79 และ 2.81 ตามลำดับ

เมื่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นนี้อยู่ในสภาวะที่มีนมผึ้งด้วยนั้น พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดจะเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน TNF-alpha และ IL-1-beta ภายใน 4 ชั่วโมง เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์จะมีสัดส่วนการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเป็น 70.89 และ 7.26 เท่า โดยที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ก็มีสัดส่วนการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเป็น 516.67 และ 80.05 เท่า ตามลำดับด้วยเช่นกัน

และที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองสังเกตเห็นว่าการแสดงออกของยีนสองชนิดนี้ จะปรับระดับการแสดงออกของยีนลดลง และพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์จะมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นได้มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมุษย์

บทที่ 5

สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

ผลิตภัณฑ์จากนมผึ้งซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและอาหารสำหรับผึ้งนางพญานั้นนิยมนำมาใช้เป็นเป็นประโยชน์ในด้านการส่งเสริมสุขภาพกันมานาน ทั้งการเป็นอาหารเสริมหรือเป็นองค์ประกอบเพิ่มเติมในเครื่องสำอางหรือเครื่องดื่ม โดยมักใช้ในรูปนมผึ้งธรรมชาติที่ยังไม่มีการสกัดสารใด ๆ ออกมา ซึ่งในการวิจัยนี้ได้นำนมผึ้งที่แยกส่วนจากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี ตามที่ในรายงานวิจัยฉบับเรื่อง “การแยกส่วนนมผึ้งและการทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์” ของดวงพร ศรีสุภาพ โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ คณะทันตแพทยศาสตร์ประจำปี 2553 โดยใช้นมผึ้งแยกส่วน ในส่วนที่ 2 ส่วนที่มีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน ที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์มากที่สุด โดยเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาทำการทดลองในครั้งนี้

5.1 การทดสอบการลดการอักเสบภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ที่มีความซับซ้อน โดยมีสาเหตุต่าง ๆ มากมายทั้งการติดเชื้อและการได้รับสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่การติดเชื้อ สารสื่อกลางในการอักเสบมีหลายชนิดด้วยกัน โดย TNF-Alpha และ IL-1 Bata เป็นสารสื่อกลางกลุ่ม Proinflammatory Cytokine ที่นิยมใช้ในการศึกษาการอักเสบของเซลล์ โดยเฉพาะโรคในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังเช่น โรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์ (20, 21, 23) จากการทดลองได้ทำการตรวจวัดปริมาณการแสดงอออกของยีน TNF-Alpha และ IL-1 Beta ด้วยเทคนิค Real time polymerase chain reaction ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS ในสภาวะที่มีและไม่มีนมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาพบว่าในสภาวะที่มีนมผึ้ง เซลล์ทั้งสองมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนทั้งสองเพิ่มขึ้นภายใน 4 ชั่วโมงและมีการแสดงออกของยีนทั้งสองลดลงภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างกับการศึกษาของ Kohno และคณะ ในปี 2004 ได้รายงานว่านมผึ้งในส่วนที่ละลายนั้นสามารถยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ทั้งสองชนิด TNF-alpha และ IL-1 ของเซลล์ macrophage ในหนูด้วย Lipopolysaccharide (LPS) และ Interferon-gamma (IFN-gamma) ภายใน 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค ELISA ความสามารถในการยับยั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ โดยนมผึ้งที่ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตรกรัมต่อมิลลิลตรสามารถยับยั้งการสร้าง TNF-alpha ได้เกือบสมบูรณ์ (11) และในรายงานเดียวกันนี้ได้ทำการแยกวิเคราะห์

อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Majtan และคณะในปี 2010 ได้รายงานว่า นมผึ้งแยกส่วนด้วย HiTrap DEAE Sepharose FF column คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี ในส่วนที่มีโปรตีนหลักชนิดที่ 1 (MRJP1) ที่ความเข้มข้น 5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรภายใน 6 ชั่วโมง มีผลส่งเสริมให้เกิดการสร้าง TNF-alpha และ IL-1 -beta ในเซลล์ keratinocytes มนุษย์ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน โดยนมผึ้งในส่วนที่มีโปรตีนหลักชนิดที่ 1 (MRJP1)ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน TNF-alpha ได้อย่างมีนัยสำคัญ ถึง 2 เท่า (19)

สำหรับสารสื่อกลาง TNF-Alpha นั้น ไม่ได้เป็นสารสื่อกลางการตอบสนองในการอักเสบเพียงอย่างเดียว แต่ยังเป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอื่น ๆ ด้วยเช่น (1) การเพิ่มจำนวนหรือการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) ผ่านทาง NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) หรือวิถีของ MAPK (Mitogen activated protein kinase) cascades (2) การตายของเซลล์ เป็นต้น (23) และสารสื่อกลาง IL-1 Beta ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายคลึงกันก็มีความเกี่ยวข้องกับวิถีอื่นๆ เช่นเดียวกันกับ TNF-Alpha (24,25) ดังนั้นการแสดงออกยีนทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้เกี่ยวกับการบวนการอักเสบเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาครั้งจึงไม่สามารถสรุปได้ว่า นมผึ้งแยกส่วน ส่วนที่ 2 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ หากแต่ส่งเสริมการแสดงออกของยีน TNF- alpha และ IL-1 beta เพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเป็นผลกระทบจากกระบวนการอื่น ๆ ร่วมกันภายในเซลล์

บรรณานุกรม

1. Taba M, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. Dent. Clin. North. Am. 2005;49(3):551-
2. Howe SE, Dimick PS, Benton AW. Composition of freshly harvested anf commercial royal jelly. J. Apic.Res. 1985;24:52-61.
3. Karaali A, Meydanoglu F, Eke D. Studies on composition, freeze-drying and storage of Turkishroyal jelly. J.Apic.Res. 1988; 27:182-185.
4. Palma MS. Composition of freshly harvested Brazilian royal jelly: indentification of carbohydrates from the sugar fraction. J.pic.Res.1992; 31:42-44.
5. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly purification and determination of the primary structure of royalisin. The Journal of Biological Chemistry. 1990; 256: 11333-11337.
6. Sanguandeekul R, Nimachaikool P. Chemical composition and antibactirial action of royal jelly in Thailand. In L.J. Connor, T., Rinderer, H.A., Sylvester and S. Wongsiri (eds.), Asian Apiculture chesshire : Wicwas Press. 1993; 327-332 pp.
7. Kushima S. On the medical efficiency of royal jelly. Proceeding of the XXXth International Apicultural Congress, Nagoya, Japan. 1985; 448-425 pp.
8. Watanabe K, Shinmoto H, Kobori M, Tsushida T, Shinohara K, Kanacda J, Yonekura M. Stimulation of cell growth in the U-937 human nyeloid cell line by honey royal jelly protein. Cytotechnology. 1998, 26: 23-27.
9. Tamura T, Fiji A, Kuboyama N. Effect of royal jelly on experimental transplantable tumors. Proceeding of the XXXth International Apicultural Congress, Nagoya, Japan. 1985; 474-477 pp.
10. Tamura T, Fuji A, Kuboyama N. Antitumor effects of royal jelly (RJ). Nippon Yakurigaku Zassh. 1987 ; 89: 73-80.
11. Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. Biosci. Biotech. Biochem. 2004; 68(1): 138-145.

12. Schmitzova J, Klaudiny J, Albert S, Schroder W, Schreckengost W, Hanes J, Judova J, Simuth J. A family of major royal jelly proteins of honeybee *Apis mellfera* L. L. Cell. Mol. Life. 1998; 54: 1020-1030.
13. Martos MV, Navajas YB, Lopez F, Alvarez P. Funtional properties of honey, propolis and royal jelly. Journal of food science. 2008; 73: 117-124.
14. Gasic C, Tugyan K, Oncel S, Pinar E, Demirta§oglu F, Calli AO, Tolon B, Yilmaz O, Kiray A. Effectiveness of royal jelly on tympanic membrane perforations: an experimental study. J Otolarygol Head Neck Surg. 2008; 37(2): 179-84.
15. Sver L, Orsolic N,Tadic Z, Njari B, Valpotic I, Basic I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1996; 19(1): 31-8.
16. Kamakura M, Suenobu N, Fukushima m. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 282(4): 865-74.
17. Narita Y, Nomura J, Ohta S, Inoh Y, Suzuki KM, Araki Y, Okada S, Matsumoto I, Isohama Y, Abe K, Miyata T, Mishima S. Royal jelly stimulates bone formation: physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. Biosci Biotechnol Biochem. 2006; 70(10):2508-14.
18. Salarzar-Olivo LA, Paz-Gonzalez V. Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Toxicol In Vitro. 2005; 19(5): 645-51.
19. Majtan J, Kumar P, Majtan T, Walls AF, Klaudiny J. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 transcripts in humane keratinocytes. Experimental dermatology. 2009; 19: e73-e79.
20. Okada H, Murakami S. Cytokine Expression in Periodontal Health and Disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1998: 9(3): 248-266.
21. Tunes RS, Foss-Freitas MC, Nogueira-Filho GR. Impact of Periodontitis on the Diabetes-Related Inflammatory Status. J Can Dent Assoc 2010;76:a35.
22. Roberts EA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of Cytokine mRNA Expression in Chronic Adult Periodontitis. J Dent Res. 1997; 76(12): 1833-1839.
23. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell death and differentiation. 2003; 10: 45-65.

24. De S, Zelazny ET, Souhrada JF, Souhrada M. Interleukin-1 beta stimulates the proliferation of cultured airway smooth muscle cells via platelet-derived growth factor. Am J Respir Cell Mol Biol. 1993 Dec; 9(6):645-51.

25. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kiliç R, Sarikoç A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggrefe M. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. Atherosclerosis. 2003 Oct;170(2):205-11.

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) **นางดวงพร ศรีสุภาพ**
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs DUANGPORN SRISUPARBH
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-1201-01486-49-2
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
   ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
   โทร. 02-6641000 ต่อ 5130 โทรสาร. 02-6641882
   e-mail: d_srisuparbh@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
   Ph.D. in Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, พ.ศ. 2545
   M.Sc. in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, พ.ศ. 2540
   B.Sc. in Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, พ.ศ. 2536
6. ประวัติการรับทุน
   หัวหน้าโครงการวิจัย :
   - โครงการวิจัยเรื่อง In vitro Study of Royal jelly Treated KB Cell Line
     ทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์ ประจำปี 2547
     วงเงิน 25,000 บาท
     เลขที่สัญญาอ้งอิง 107/2547
   - โครงการวิจัยเรื่อง Polymorphism analysis of virulence factors of periodontal disease caused by *Porphyromonas gingivalis*
     ทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปี 2548 รอบ 2
     วงเงิน 132,000 บาท
     เลขที่สัญญาอ้างอิง 129/2548

   ผู้ร่วมโครงการวิจัย:
   - โครงการวิจัยเรื่อง การควบคุมการแสดงออกของ HMGB1 โดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในเซลล์ช่องปาก LPS regulation of HMGB1 expression in oral cells

ทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปี 2548 รอบ 2
วงเงิน 198,000 บาท
เลขที่สัญญาอ้างอิง 130/2548

- โครงการวิจัยเรื่อง ผลของนมผึ้งต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์
ทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์ ประจำปี 2552
วงเงิน 58,000 บาท
เลขที่สัญญาอ้างอิง 175/2551

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Biodiversity, Bioinformatic & Molecular Biology Research : PCR and Gene Expression

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

Srisuparbh D and Dhanesuan N. Growth inhibiton of royal jelly on KB cell line. Promgram and abstracts of the 17th FAOBMB Symposium/ 2nd IUBMB Special Meeting/ 7th A-IMBN Conference on "Genomics and Heath in the 21st Century" 2004; 158

แหล่งทุน งบประมาณเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์ ประจำปี 2547 เลขที่ 107/2547

Srisuparbh D, Klinbunga S, Wongsiri S and Sittipraneed S. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). J. Biochemistry and Molecular Biology 2003; 36 : 572-579.

แหล่งทุน พัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ BRT No. R-645005.

Sittipraneed S, **Sihanuntavong D** and Klinbunga S. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand revealed by polymorphism of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. Insectes soc 2001; 48 : 266-272.

แหล่งทุน BRT No.139024

Sihanuntavong D, Sittipraneed S and Klinbunga S. Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee, *Apis cerana* in Thailand. J. Apicultural Research 1999; 38(3-4): 211 – 219.

แหล่งทุน BRT No.139024

Sihanuntavong D and Sittipraneed S 1997. Mitochondrial DNA polymorphism in inter COI-COII region of Thai honey bee *Apis cerana*. Proceeding of the 23rd Congress on Science and Technology of Thailand 1997; 514 – 515.

แหล่งทุน BRT No.139024

Sihanuntavong D, Sittipraneed S, 1996. The large ribosomal subunit gene of Thai honey bee mitochondrial DNA : evidence for genetic variation. Proceeding of the Third Asia-Pacific Conference in Agricultural Biotechnology : 565-568.

แหล่งทุน BRT No.139024