

การตอบสนองของเซลล์กระดูกจากกระดูกเข้าพื้นมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ต่อการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 และผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

บทคัดย่อ

เซลล์กระดูกจากกระดูกขาเข้าพื้นมนุษย์ซึ่งได้มาจากการกรอออกระหว่างการผ่าตัด ฟันคุด ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *E.coli* ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$. อีก 7 วัน แล้วนำส่วนหนึ่งมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อีกส่วนนำมาสกัด RNA แล้วนำไปตรวจการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 โดยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น โดยใช้เซลล์จากผู้ป่วย 3 รายทำการทดลองแยกกัน และในเซลล์จากผู้ป่วยแต่ละรายจะทำซ้ำ 2 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อย่างไรก็ตามพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีผลทำให้การแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน 6 เพิ่มขึ้นแบบแปรผันตามกับความเข้มข้นที่ใช้ สรุปคือเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกจากกระดูกขากรรไกรมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ไม่มีผลต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6

IL-6 mRNA expression and Alkaline phosphatase activity of osteoblastic-like cells derived from human alveolar bone in response to Lipopolysaccharide

Abstracts

Osteoblasts were derived from human alveolar bone, which necessary removed in surgical impaction procedure. Cells were culture in osteogenic media 7 days, and then were treated with 0.5 or 5 μ g/ml. of *E.coli* LPS for 7 days. Treated cells were tested the alkaline phosphatase activity using colorimetric alkaline phosphatase detection system. Same experiments were done and RNA were extracted. IL-6 mRNA expression was evaluated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. All condition were done in 3 different cell lines, and duplicated in the same cell line. We not found the effect of LPS on alkaline phosphatase activity. However, the induction of IL-6 mRNA expression on human osteoblasts was obviously showed direct variation in dose dependent. *E.coli* LPS induced IL-6 mRNA expression on human alveolar bone derived osteoblasts, but had no effect in alkaline phosphatase activity.

ประกาศคุณูปการ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนทุนในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณภาควิชาโงษฐวิทยา และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาโงษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บชิ้นกระดูก ขอขอบพระคุณบริษัท ไบโอจิโนเมด จำกัด และเจ้าหน้าที่ประจำบริษัท ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษา ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า

นิรดา ธเนศวร

จารุมา ศักดิ์ดี

ชินชิวิต ทองศิริ

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	8
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	10
บรรณานุกรม	12
อภิธานศัพท์	15
ประวัติย่อผู้วิจัย	16

บัญชีตาราง

หน้า

<u>ตารางที่ 1</u>	Primer sequences for Real-time Polymerase Chain Reaction	7
-------------------	--	---

บัญชีภาพประกอบ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 สัดส่วนปริมาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่เพิ่มขึ้น หลังกระตุ้นด้วย

8

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อ

เทียบกับกลุ่มควบคุม วัดโดยวิธี Colorimetric alkaline

phosphatase detection system

แผนภูมิที่ 2 สัดส่วนของอินเตอร์ลิวคิน-6 mRNA เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลี

9

แซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับ

GAPDH วัดโดยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน

บทที่ 1

บทนำ

เซลล์กระดูก (osteoblasts) เป็นเซลล์ที่เจริญมาจาก mesenchymal stem cells มีหน้าที่หลักในการผลิตคอลลาเจน Type I ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน bone matrix นอกจากนี้ยังผลิตโปรตีนชนิดอื่น ๆ เช่น Proteoglycans และ Glycoproteins และยังมีส่วนช่วยในการตกตะกอนแคลเซียมในกระดูก (Calcification) เซลล์กระดูก (osteoblasts) ยังมีส่วนสำคัญในการควบคุมกลไกการละลายของกระดูก ด้วยโดยควบคุมการทำงานของ เซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts)

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการก่อให้เกิดการติดเชื้อในโพรงฟันและการละลายของกระดูกปลายราก เกิดเป็นรอยโรคปลายรากฟัน (Periapical lesion) โดยมีการศึกษาพบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์กระดูก (osteoblasts) ทำให้มันเหนียวนำไปเกิดการละลายกระดูกโดยเซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts)[1] อีกการศึกษายังพบอีกว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูก (osteoblasts) ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จะทำให้ความสามารถในการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการสะสมตะกอนแคลเซียมลดลง[2]

เซลล์ที่นำมาเลี้ยงเพื่อใช้ในการวิจัย (Cell culture) มี 2 ชนิด ได้แก่ Primary cells และ Cell line โดยปกติแล้ว Primary cells จะเป็นโมเดลที่มีความน่าเชื่อถือดีกว่า การเลี้ยงเซลล์กระดูก (osteoblasts) เพื่อใช้ในการวิจัย มีทั้งการใช้ Primary cells และ Cell line สำหรับ Primary cells ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้มักจะเป็นเซลล์ที่นำมาจากกระดูกของหนูทดลอง หรือไม่ก็นำมาจากชิ้นกระดูกส่วนต่างๆ ของร่างกายจากผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับขากรรไกรและใบหน้า ชิ้นกระดูกที่นำมาเพื่อเลี้ยงเซลล์นั้นก็มักจะมีมาจากรู้นกระดูกขากรรไกร (Basal bone) เนื่องจากสามารถเก็บชิ้นส่วนได้ง่ายกว่าและปริมาณมากกว่าจากการทำศัลยกรรมภายในช่องปาก ซึ่งกระดูกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ Pathophysiology ของโรคต่าง ๆ ในช่องปาก เช่น การเกิดรอยโรคปลายรากฟัน (Periapical lesion) หรือการเกิดโรคปริทันต์ทำให้มีการละลายของกระดูกเข้าฟัน (Periodontitis) จะ

เป็นส่วนกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) ไม่ใช่ฐานกระดูกขากรรไกร (Basal bone) จากประสบการณ์การ เซลล์กระดูก (osteoblasts) ทั้งจาก Basal bone และ Alveolar bone พบว่าทั้งสองมี bone characteristic ที่แตกต่างกัน ในปัจจุบันงานวิจัยที่ใช้เซลล์กระดูก (osteoblasts) ที่ได้จาก Alveolar bone ของมนุษย์ยังมีไม่มาก และการศึกษาส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องมักจะใช้เซลล์ที่ได้จากหนูทดลอง ดังนั้นทางคณะวิจัยคิดว่า การศึกษา Characteristics ของเซลล์กระดูก (osteoblasts) ที่เลี้ยงจากกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) ที่ตอบสนองต่อเชื้อหรือไซโตไคน์ (cytokines) ที่ก่อให้เกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟัน น่าจะทำให้เราเข้าใจกลไกการตอบสนองของเซลล์นี้ได้มากขึ้น และอาจเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อใช้พัฒนาเซลล์นี้ ในการเป็นโมเดลทดลองวัสดุหรือยาที่ใช้ทางทันตกรรมชนิดใหม่ ๆ ในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูกจัดเป็น Dynamic tissue มีการเกิดรีโมเดลลิง (remodeling) คือมีการละลายของกระดูกตามด้วยการสร้างกระดูกสลับกัน โดยอาศัยการทำงานของเซลล์สองชนิดตลอดชีวิต ได้แก่ เซลล์กระดูก (osteoblasts) และ เซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts) เซลล์กระดูก (osteoblasts) เจริญมาจากมีเซนไคม์สเต็มเซลล์ (mesenchymal stem cells) หน้าที่หลักคือการสร้างกระดูกและควบคุมการเกิดรีโมเดลลิง รวมไปถึงการควบคุมการทำงานของเซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts) ด้วย

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) เป็น bone marker พบได้ในเซลล์กระดูก (osteoblasts) พบระดับ mRNA ในเซลล์จะสูงขึ้นในช่วงก่อนการเกิดการสะสมตะกอนแคลเซียม (calcification) และระดับ mRNA จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะการสะสมตะกอนแคลเซียม[3] สำหรับหน้าที่ของ ALP นั้นในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อกันว่ามันน่าจะมีส่วนในการขนส่งสารจากในเซลล์ออกสู่นอกเซลล์ และน่าจะมีส่วนในการทำลาย inorganic pyrophosphate (PPi) ซึ่งถือเป็นตัวยับยั้งการตกตะกอนแคลเซียมฟอสเฟตที่สำคัญ[4]

ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นให้เซลล์ของร่างกายหลั่งของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory mediators) ต่าง ๆ เช่น ไพรอสตาแกลนดินอีทู (Prostaglandin E2) และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinases) [5-7] ซึ่งสารเหล่านี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการละลายของกระดูกโดยการทำงานของเซลล์กระดูก (osteoblasts) ร่วมกับเซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts)[1]

อินเตอร์ลิวคิน-6 (Interleukin-6) เป็น cytokine ที่มีหน้าที่หลากหลายที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ[8] ผลิตได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น monocytes, fibroblasts, endothelial cells, macrophages, T- and B-cell [9] ในกระดูกสามารถผลิตได้จากเซลล์กระดูก (osteoblasts) [10] และพบว่ามันเป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญในการเกิด Osteoclasts differentiation และการละลายของกระดูก [11]

มีรายงานพบว่าเมื่อมีการเติมไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จาก *P.intermedia* ลงใน mouse เซลล์กระดูก (osteoblasts) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำการผลิตอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ลดลง 60% การสะสมของแคลเซียมลดลง 80% จากกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้นสูงพบว่าทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการผลิตตะกอนแคลเซียมอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่ากระตุ้นโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ทำให้เซลล์กระดูก (osteoblasts) จากหนูผลิตอินเตอร์ลิวคิน-6 ในปริมาณที่สูง[2] ซึ่งมีรายงานพบว่า อินเตอร์ลิวคิน-6 เหนี่ยวนำเซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts) ให้ละลายกระดูก[12-13] และยังกระตุ้นให้เซลล์กระดูก (osteoblasts) สร้าง MMPs[14-15] มีการทดลองในเซลล์กระดูก (osteoblasts) ซึ่งได้จากกระดูกขากรรไกรของหนูพบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จาก *Porphyromonas gingivalis* สามารถทำให้การแบ่งตัวของเซลล์กระดูก (osteoblasts) ลดลงและไปยับยั้งการเกิด osteoblasts differentiation โดยดูจากลดการทำงาน ALP [16]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

Osteoblasts cell culture

นำชิ้นกระดูกขากรรไกรที่ได้จากการผ่าฟันคุด มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F12 ที่มีส่วนผสมของซีรัมวัวร้อยละ 10 (fetal calf serum, FCS) ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (100 IU/ml penicillin G, 50 µg/ml streptomycin และ amphotericin B 2.5 µg/ml) และ 2 มิลลิโมลาร์ กลูตามีน (L-glutamin) ทำการเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์ที่ได้ออกมาแล้ว จะนำส่วนหนึ่งไปทดสอบการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยการเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก (osteogenic media) ที่มีผสมของ กรดแอสคอบิก 50µg/ml, เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) 5 mM และเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone) 250 nM in ETOH (Osteogenic media) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบด้วย BCIP/NBT (substrate for alkaline phosphatase) เฉพาะ cell line ที่ให้ผลบวกต่ออัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเท่านั้นที่จะนำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งเซลล์ที่นำมาใช้จะอยู่ใน passage ที่ 3-5

Effect of *E.coli* Lipopolysaccharide (LPS) in ALP activity

ใช้เซลล์กระดูก (osteoblasts) เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24-well-plate) หลุมละ 25,000 เซลล์ ด้วยอาหารเลี้ยงดั่งที่กล่าวข้างต้นเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีรัมวัวร้อยละ 2.5 และมีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นต่ำ (0.5 µg/ml) และความเข้มข้นสูง (5 µg/ml) ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จากนั้นนำมาทดสอบการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยใช้ Colorimetric alkaline phosphatase detection system [17] โดยแต่ละ cell line ทำซ้ำ 2 ครั้ง

Interleukin-6 mRNA expression induced by LPS

ใช้เซลล์กระดูก (osteoblasts) เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well-plate) หลุมละ 150,000 เซลล์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กล่าวข้างต้นเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมซีรัมร้อยละ 2.5 และมีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นต่ำ (0.5 µg/ml) และความเข้มข้นสูง (5 µg/ml) ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

การสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA extraction) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วย PBS แล้วดูดทิ้ง อาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเตรียมโดยใช้ไตรโซล (Trizol, Gibco, USA) ตามวิธีการแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต มีขั้นตอนโดยย่อ คือ ใส่ไตรโซล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 5 นาที เติมนคลอโรฟอร์มปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าหลอดพลาสติกแรงๆ 15 วินาที แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนสุดซึ่งเป็นชั้นที่มีอาร์เอ็นเอปนอยู่ จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนของเหลวใสออกให้เหลือแต่ตะกอนที่ก้นหลอดพลาสติก จากนั้นล้างด้วย เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เคาzeที่ข้างหลอดเบาๆ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทของเหลวใสออกแล้วคว่ำหลอดพลาสติกทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที แล้วละลายตะกอนที่อยู่นก้นหลอดซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase-free water) ปริมาณ 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้จะเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์คอมปริเมนแทรีเอ็นเอสแตนด์ (First strand cDNA synthesis) ทำโดยใช้ชุดสกัดรีเวอร์สเอด (RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit) (Fermentas, Life sciences, USA) โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และ โอลิโก (Oligo (dt) 18) ในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปรับปริมาณรวมให้ได้ 12 ไมโครลิตร โดยใช้ดีเพควอเตอร์ (DPEC-water) นำไปอุ่นที่อ่างน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ขณะนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่ช่วยเพิ่มปฏิกิริยา (5x reaction buffer) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร เติมด้วยยับยั้งเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease inhibitor) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotide triphosphate: dNTPs) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่น (mix and quick spin) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเติมเอ็นไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

และบันทึกครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จนกระทั่งปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำไปใช้งาน

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้หลักการเรียลไทม์โพลีเมอเรสเซนรีแอคชั่น (Real-time Polymerase Chain reaction: PCR) ทำการสอบหาปริมาณ cDNA โดยใช้เครื่อง Light Cycler 480[®] (Roche[®], Germany) และใช้น้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (real-time PCR master mix) (LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master) คู่มือไพรเมอร์ที่ใช้ (primer pair) สำหรับการทดสอบชนิด ไซเบอร์กรีน เรียลไทม์พีซีอาร์ คือ อินเตอร์ลิวคิน-6

ในการวิเคราะห์ cDNA เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ไมโครลิตร ฟอว์เวิร์ด ไพร์เมอร์ (forward primer) และรีเวิร์ส ไพร์เมอร์ (reverse primer) อย่างละ 1 ไมโครลิตร น้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (Master mixed) 10 ไมโครลิตร และตัวอย่างสกัด cDNA 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลิตภัณฑ์เรียลไทม์พีซีอาร์ โดยให้เกิดปฏิกิริยา 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C 20 วินาที 65°C 20 วินาทีและ 72°C 20 วินาที วิเคราะห์สัญญาณแสงที่วัดได้ด้วยโปรแกรมของบริษัท (Light Cycler 480 SW1.5) และคำนวณปริมาณสารด้วยวิธี รีเลทีฟ ควอนทิฟิเคชัน (Relative Quantification) โดยใช้ค่า GAPDH เป็นสารควบคุม ลำดับเบสของคู่มือไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primer sequences for Real-time Polymerase Chain Reaction

Primer	Primer sequences	References
GAPDH	Forward primer: 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'	[18]
(383bp)	Reverse primer: 5'-CCATCACGCCACAGTTTCC-3'	
Interleukin-6	Forward primer: ATGTAGCCGCCCCACACAGA	[19]
(190 bp)	Reverse primer: GCATCCATCTTTTTCAGCCATC	

บทที่ 4

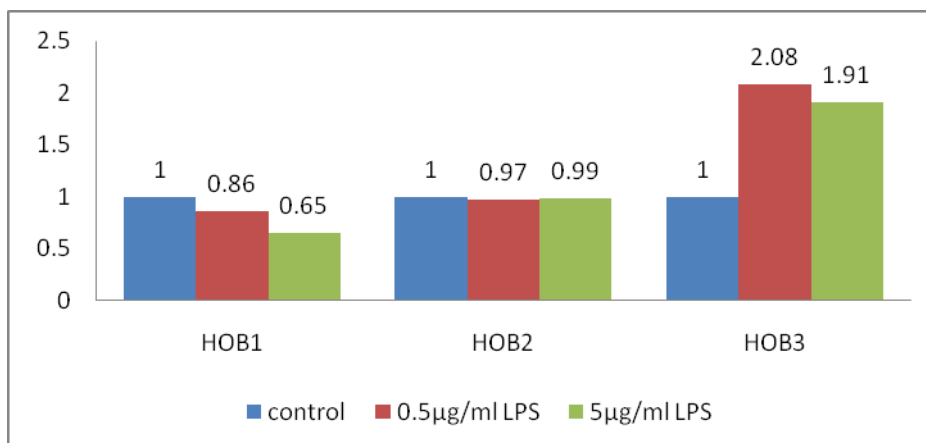
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

Osteoblasts cell culture

เซลล์ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาจะต้องถูกทดสอบการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเบื้องต้นด้วย BCIP/NBT (substrate for alkaline phosphatase) เฉพาะ cell line ที่ได้ผลบวกเท่านั้นถึงจะนำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งในการศึกษาค้างนี้ได้เซลล์ที่เป็นผลบวกต่อ BCIP/NBT จากขึ้นกระดุกของผู้ป่วย 3 รายจากการผ่าฟันคุดในตำแหน่งฟันกรามล่าง ได้แก่ human osteoblast (HOB)1, HOB2 และ HOB3

Effect of *E.coli* Lipopolysaccharide (LPS) in ALP activity

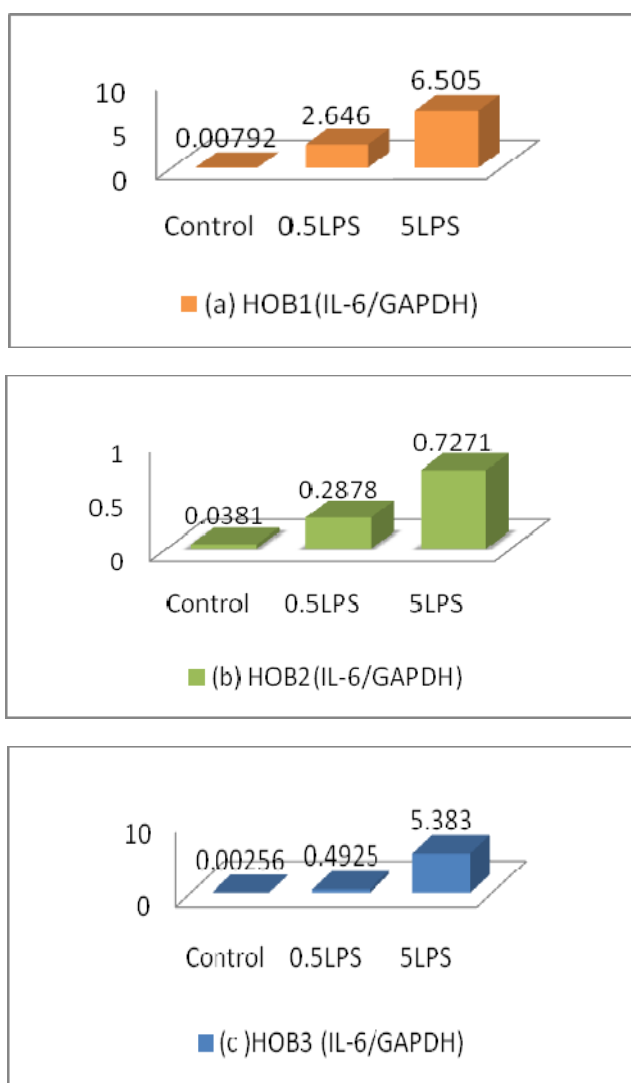
พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E.coli* ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ ให้ผลแตกต่างกันทั้ง 3 cell line ต่อระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 สัดส่วนปริมาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เพิ่มขึ้น หลังกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม วัดโดยวิธี Colorimetric alkaline phosphatase detection system [17] (HOB : human osteoblast)

Interleukin-6 mRNA expression induced by LPS

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ อินเตอร์ลิวคิน-6 mRNA โดยการวัดด้วยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น โดยปริมาณ mRNA ที่พบจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ *E.coli* ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ใช้ ซึ่งทั้ง 3 cell line ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 สัดส่วนของ อินเตอร์ลิวคิน-6 mRNA เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับ GAPDH วัดด้วยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการทดลองได้ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูก (osteoblasts) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูกเป็นเวลา 7 วันก่อนกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E.coli* และในขณะที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E.coli* อีก 7 วัน ซึ่งการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E.coli* ต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยในแต่ละ cell line มีรูปแบบการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่แตกต่างไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน อย่างไรก็ตามการพบการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นการยืนยันว่าเซลล์ที่เก็บมาใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์กระดูก (osteoblasts)

การศึกษานี้ให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาของ Katono และคณะ[20] พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูก (osteoblasts) จากมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 100ng/ml เป็นเวลา 12 วันแล้วมีผลลดการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อีกการศึกษาหนึ่งก็พบว่าก็พบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์มีผลลดการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเช่นกัน โดยมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้กระตุ้น[2] แต่พบข้อแตกต่างของสภาวะที่ใช้ในการทดลองที่ให้ผลขัดแย้งคือการศึกษานี้ใช้ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูกที่มีส่วนผสมของเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone) ในขณะที่การศึกษาที่กล่าวอ้างทั้งสองการศึกษานั้น ไม่ได้มีการเติมเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone) ลงไป เดกซาเมธาโซน (Dexamethasone) เป็นกลุ่มของ Glucocorticoid มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์อ่อนพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblasts) ได้ [21] เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นดอทีเรียด้วยกรดแอสคอบิกหรือเบต้ากลีเซอรอเฟสเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ ในขณะที่ถ้ากระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone) อย่างเดียว หรือกระตุ้นร่วมกับกรดแอสคอบิกหรือเบต้ากลีเซอรอเฟส หรือกระตุ้นร่วมกับสารทั้งสองตัว จะเพิ่มการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น [22] เหตุผลที่การศึกษานี้ให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาที่ผ่านมา อาจเนื่องมาจากสภาวะที่มีเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone) มีผลกระตุ้นการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากกว่าผลยับยั้งของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่ออัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

อินเตอร์ลิวคิน-6 เป็นไซโตไคม์ที่สร้างจากเซลล์กระดูก (osteoblasts) ซึ่งจะมีส่วนสำคัญในกระบวนการเกิด osteoclastogenesis ในการศึกษาเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูก (osteoblasts) ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E.coli* พบว่ามีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของอินเตอร์ลิวคิน-6 โดยพบว่ายิ่งความเข้มข้นมากขึ้น จะพบการแสดงออกของยีนส์ตัวนี้มากขึ้น โดยเซลล์ทั้งหมดที่นำมาใช้ให้ผลการทดลองสอดคล้องกัน Pelt และคณะ [2] กระตุ้นเซลล์กระดูก (osteoblasts) ที่ได้จากหนูด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก *Prevotella intermedia* ในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 2 ไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 1 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อกระตุ้นเป็นเวลา 11 วัน จะพบการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-6 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อกระตุ้นด้วยความเข้มข้น 5 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 1 วันหลังกระตุ้นจะมีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ในปริมาณที่สูงที่สุด

มีรายงานพบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 จากเซลล์ MG-63 (human osteoblastic cell line) ได้ ขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น โดยพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงจะมีการหลั่ง อินเตอร์ลิวคิน-6 ออกจากเซลล์ MG-63 สูงกว่าที่ 6 และ 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทุกช่วงเวลาก็มีการหลั่งของ อินเตอร์ลิวคิน-6 ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์ สูงกว่ากลุ่มควบคุม และยังพบอีกว่าการกระตุ้นเซลล์กระดูกด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ให้สร้าง อินเตอร์ลิวคิน-6 นั้นเกี่ยวข้องกับ Adenosine receptors [23]

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงผลของการกระตุ้นเซลล์กระดูก (osteoblasts) ที่ได้จากกระดูกขากรรไกรมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E.coli* ต่อการเพิ่มการแสดงของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ แต่ไม่พบผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคตถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆของเซลล์นี้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์

บรรณานุกรม

1. Nair, S.P., et al., *Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions*. Infect Immun, 1996. 64(7): p. 2371-80.
2. Pelt, P., et al., *Effects of lipopolysaccharide extracted from Prevotella intermedia on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro*. Arch Oral Biol, 2002. 47(12): p. 859-66.
3. Stein, G.S. and J.B. Lian, *Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype*. Endocr Rev, 1993. 14(4): p. 424-42.
4. Risteli, L. and J. Risteli, *Biochemical markers of bone metabolism*. Ann Med, 1993. 25(4): p. 385-93.
5. Robertson, P.B., et al., *Collagenolytic activity associated with Bacteroides species and Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res, 1982. 17(3): p. 275-83.
6. Heath, J.K., et al., *Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells*. Infect Immun, 1987. 55(9): p. 2148-54.
7. Schwartz, Z., et al., *Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis*. Periodontol 2000, 1997. 14: p. 158-72.
8. Gabay, C., *Interleukin-6 and chronic inflammation*. Arthritis Res Ther, 2006. 8 Suppl 2: p. S3.
9. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis Res Ther, 2006. 8 Suppl 2: p. S2.

10. Nagy, Z., J. Radeff, and P.H. Stern, *Stimulation of interleukin-6 promoter by parathyroid hormone, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta in UMR-106 osteoblastic cells is inhibited by protein kinase C antagonists*. J Bone Miner Res, 2001. 16(7): p. 1220-7.
11. Balint, E., C.F. Marshall, and S.M. Sprague, *Role of interleukin-6 in beta2-microglobulin-induced bone mineral dissolution*. Kidney Int, 2000. 57(4): p. 1599-607.
12. Ishimi, Y., et al., *IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption*. J Immunol, 1990. 145(10): p. 3297-303.
13. Tamura, T., et al., *Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(24): p. 11924-8.
14. Damiens, C., et al., *Modulation by soluble factors of gelatinase activities released by osteoblastic cells*. Cytokine, 2000. 12(11): p. 1727-31.
15. Kusano, K., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption*. Endocrinology, 1998. 139(3): p. 1338-45.
16. Roberts, H.C., et al., *Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts: consequences for bone repair during periodontal disease*. Eur J Oral Sci, 2008. 116(3): p. 207-16.
17. Pavasant, P., et al., *The synergistic effect of TGF-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts*. Arch Oral Biol, 2003. 48(10): p. 717-22.

18. Memoli, B., et al., *Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293(4): p. E1030-5.
19. Zhang, Y., et al., *PGC-1alpha induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARgamma-dependent pathway*. Cell Res, 2007. 17(4): p. 363-73.
20. Katono, T., et al., *Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts*. Arch Oral Biol, 2009. 54(2): p. 146-55.
21. Abe, Y., et al., *Development of mineralized nodules in fetal rat mandibular osteogenic precursor cells: requirement for dexamethasone but not for beta-glycerophosphate*. Calcif Tissue Int, 2000. 66(1): p. 66-9.
22. Hayami, T., et al., *Dexamethasone's enhancement of osteoblastic markers in human periodontal ligament cells is associated with inhibition of collagenase expression*. Bone, 2007. 40(1): p. 93-104.
23. Russell, J.M., et al., *Adenosine inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion by the osteoblastic cell line MG-63*. Calcif Tissue Int, 2007. 81(4): p. 316-26.

อภิธานศัพท์

Alkaline phosphatase, ALP	อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
Alveolar bone	กระดูกเบาฟัน
β -glycerophosphate	เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟส
Basal bone	กระดูกขากรรไกร
Calcification	ตะกอนแคลเซียม
Cytokine	ไซโตไคน์
Dexamethasone	เดกซาเมธาโซน
inflammatory mediators	สารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
Interleukin-6	อินเตอร์ลิวคิน-6
Lipopolysaccharide, LPS	ไลโปโพลีแซคคาไรด์
Matrix metalloproteinases	แมทริกเมทัลโลโปรตีนเอส
Osteoblasts	เซลล์กระดูก
Osteoclasts	เซลล์ละลายกระดูก
Osteogenic media	อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก
Prostaglandin E2	พรอสตาแกลนดินอีทู
Real-time Polymerase Chain reaction: PCR	เรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น
Remodeling	รีโมเดลลิง
RNA	อาร์เอ็นเอ
Serum	ซีรัม

ประวัติย่อผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ

นางสาวอินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า

Indra Wongyaofa, Dr.

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 1004 00064 77 8

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาเอ็นโดครินต์

ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษและทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทร 02-6641000 ต่อ 5112

อีเมล w_pupe@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปี 2545 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 1

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปี 2546 Certificate in Japanese language, Tokyo Medical and Dental
University, Tokyo, Japan

ปี 2550 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาเอ็นโดครินต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาเอ็นโดครินต์

2. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางนิรดา ธเนศวร

Nirada Dhanesuan, Dr.

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3100203601126

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 หน่วยงาน ภาควิชาโณสุวิทยา ชั้น 10 คณะทันตแพทยศาสตร์ มศว
 โทร 02-664-1000 ต่อ 5126 แฟกซ์ 02-664-1882
 อีเมล nirada@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

2530- 2535 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 2539- 2545 หลักสูตรดุริยางค์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 2541- 2544 ทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์ ณ St.Vincent's Institute of Medical
 Research, Melbourne, Australia

3. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางสาวจารума ศักดิ์ดี

Jaruma Beau Sakdee, Dr.

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 1009 02434 96 2

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์
 ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 โทร 02-6641000 ต่อ 5112
 อีเมล bjsakdee@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปี 2543 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2551 Doctor of Medical Science (D.M.Sc.), Certificate in Endodontics

Harvard University

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์

4. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางสาวชื่นชีวิต ทองศิริ

Chuencheewit Thongsiri, Dr.

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 5308 00395 53 1

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาปริทันตวิทยา

ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทร 02-6641000 ต่อ 5112

อีเมล chuencheewi@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปี 2546 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปี 2552 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาปริทันตวิทยา

อภิธานศัพท์

Alkaline phosphatase, ALP	อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
Alveolar bone	กระดูกเบ้าฟัน
β -glycerophosphate	เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟส
Basal bone	กระดูกขากรรไกร
Calcification	ตะกอนแคลเซียม
Cytokine	ไซโตไคม์
Dexamethasone	เดกซาเมธาโซน
inflammatory mediators	สารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
Interleukin-6	อินเตอร์ลิวคิน-6
Lipopolysaccharide, LPS	ไลโปโพลีแซคคาไรด์
Matrix metalloproteinases	แมทริกเมทัลโลโปรตีนเอส
Osteoblasts	เซลล์กระดูก
Osteoclasts	เซลล์ละลายกระดูก
Osteogenic media	อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก
Prostaglandin E2	พรอสตาแกลนดินอีทู
Real-time Polymerase Chain reaction: PCR	เรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น
Remodeling	รีโมเดลลิง
RNA	อาร์เอ็นเอ
Serum	ซีรัม

ประวัติย่อผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ

นางสาวอินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า

Indra Wongyaofa, Dr.

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 1004 00064 77 8

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาเอ็นโดครินต์

ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษและทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทร 02-6641000 ต่อ 5112

อีเมล w_pupe@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปี 2545 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 1

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปี 2546 Certificate in Japanese language

Tokyo Medical and Dental University,

Tokyo, Japan

ปี 2550 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเอ็นโดครินต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิชาเอ็นโดครินต์

2. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางนिरดา ธเนศวร

Nirada Dhanesuan, Dr.

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3100203601126

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชาโษสรีรวิทยา ชั้น 10 คณะทันตแพทยศาสตร์ มศว

โทร 02-664-1000 ต่อ 5126 แฟกซ์ 02-664-1882

อีเมล nirada@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

- 2530- 2535 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2539- 2545 หลักสูตรดุริยางค์บัณฑิต สาขาวิชาดุริยางค์วิทยาซ่งปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2541- 2544 ทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์ ณ St.Vincent's Institute of Medical
Research, Melbourne, Australia

3. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางสาวจารุมา ศักดิ์ดี

Jaruma Beau Sakdee, Dr.

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 1009 02434 96 2

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์
ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
โทร 02-6641000 ต่อ 5112
อีเมลล์ bjsakdee@gmail.com

ประวัติการศึกษา

- ปี 2543 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปี 2551 Doctor of Medical Science (D.M.Sc.), Certificate in Endodontics
Harward University

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์

4. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางสาวชื่นชีวิต ทองศิริ

Chuencheewit Thongsiri, Dr.

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 5308 00395 53 1

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาปริทันตวิทยา

ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
โทร 02-6641000 ต่อ 5112
อีเมล chuencheewi@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปี 2546 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปี 2552 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาปริทันตวิทยา



บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

การตอบสนองของเซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ต่อการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 และผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

IL-6 mRNA expression and Alkaline phosphatase activity of osteoblastic-like cells derived from human alveolar bone in response to Lipopolysaccharide

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันต่อการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6

ที่มาของการวิจัย

เซลล์กระดูก (osteoblasts) เป็นเซลล์ที่เจริญมาจาก mesenchymal stem cells มีหน้าที่หลักในการผลิตคอลลาเจน Type I ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน bone matrix นอกจากนี้ยังผลิตโปรตีนชนิดอื่น ๆ เช่น Proteoglycans และ Glycoproteins และยังมีส่วนช่วยในการตกตะกอนแคลเซียมในกระดูก (Calcification) เซลล์กระดูก (osteoblasts) ยังมีส่วนสำคัญในการควบคุมกลไกการละลายของกระดูกด้วยโดยควบคุมการทำงานของ เซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts)

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการก่อให้เกิดการติดเชื้อในโพรงฟันและการละลายของกระดูกปลายราก เกิดเป็นรอยโรคปลายรากฟัน (Periapical lesion) โดยมีการศึกษาพบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์กระดูก (osteoblasts) ทำให้มันเหนียวทำให้เกิดการละลายกระดูกโดย เซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts)[1] อีกการศึกษายังพบอีกว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูก (osteoblasts) ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จะทำให้ความสามารถในการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการสะสมตะกอนแคลเซียมลดลง[2]

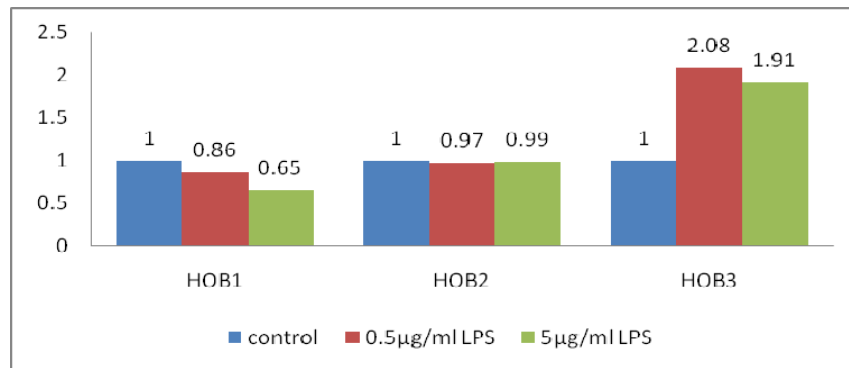
เซลล์ที่นำมาเลี้ยงเพื่อใช้ในงานวิจัย (Cell culture) มี 2 ชนิด ได้แก่ Primary cells และ Cell line โดยปกติแล้ว Primary cells จะเป็นโมเดลที่มีความน่าเชื่อถือดีกว่า การเลี้ยงเซลล์กระดูก (osteoblasts) เพื่อใช้ในงานวิจัย มีทั้งการใช้ Primary cells และ Cell line สำหรับ Primary cells

ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้มักจะเป็นเซลล์ที่นำมาจากกระดูกของหนูทดลอง หรือไม่ก็นำมาจากชั้นกระดูกส่วนต่าง ๆ ของร่างกายจากผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับขากรรไกรและใบหน้า ชั้นกระดูกที่นำมาเพื่อเลี้ยงเซลล์นั้นก็มักจะมาจากฐานกระดูกขากรรไกร (Basal bone) เนื่องจากสามารถเก็บชิ้นส่วนได้ง่ายกว่า และปริมาณมากกว่าจากการทำศัลยกรรมภายในช่องปาก ซึ่งกระดูกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ Pathophysiology ของโรคต่าง ๆ ในช่องปาก เช่น การเกิดรอยโรคปลายรากฟัน (Periapical lesion) หรือการเกิดโรคปริทันต์ทำให้มีการละลายของกระดูกเบ้าฟัน (Periodontitis) จะเป็นส่วนกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) ไม่ใช่ฐานกระดูกขากรรไกร (Basal bone) จากประสบการณ์การ เซลล์กระดูก (osteoblasts) ทั้งจาก Basal bone และ Alveolar bone พบว่าทั้งสองมี bone characteristic ที่แตกต่างกัน ในปัจจุบันงานวิจัยที่ใช้เซลล์กระดูก (osteoblasts) ที่ได้จาก Alveolar bone ของมนุษย์ยังมีไม่มาก และการศึกษาส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องมักจะใช้เซลล์ที่ได้จากหนูทดลอง ดังนั้นทางคณะวิจัยคิดว่า การศึกษา Characteristics ของเซลล์กระดูก (osteoblasts) ที่เลี้ยงจากกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) ที่ตอบสนองต่อเชื้อหรือไซโตไคน์ (cytokines) ที่ก่อให้เกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟัน น่าจะทำให้เราเข้าใจกลไกการตอบสนองของเซลล์นี้ได้มากขึ้น และอาจเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อใช้พัฒนาเซลล์นี้ ในการเป็นโมเดลทดลองวัสดุหรือยาที่ใช้ทางทันตกรรมชนิดใหม่ ๆ ในอนาคต

การดำเนินงานและผลงานที่ได้รับจากการวิจัย

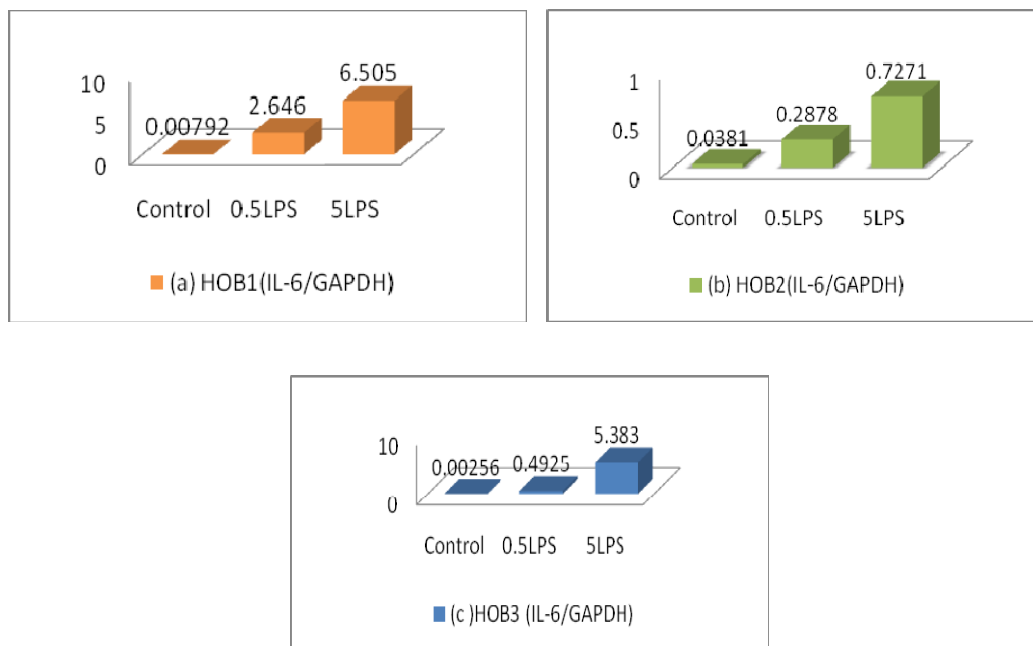
นำเซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ซึ่งได้มาจากการกรอออกระหว่างการผ่าฟันคุด ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงอาหารที่มีฤทธิ์เหนียวทำให้เป็นเซลล์กระดูก (มีส่วนผสมของกรดแอสคอบิก, เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต และเดกซามะธาโซน) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *E.coli* ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$. อีก 7 วันแล้วนำส่วนหนึ่งมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อีกส่วนนำมาสกัด RNA แล้วนำไปตรวจการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 โดยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอร์เชนรีแอคชัน โดยใช้เซลล์จากผู้ป่วย 3 รายทำการทดลองแยกกัน และในเซลล์จากผู้ป่วยแต่ละรายจะทำซ้ำ 2 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *E.coli* ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ ให้ผลแตกต่างกันทั้ง 3 cell line ต่อระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 สัดส่วนปริมาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เพิ่มขึ้นหลังกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 µg/ml เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม วัดโดยวิธี Colorimetric alkaline phosphatase detection system [19] (HOB : human osteoblast)

อย่างไรก็ตามพบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์มีพบทำให้การแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน 6 เพิ่มขึ้นแบบแปรผันตามกับความเข้มข้นที่ใช้ แสดงดังแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 สัดส่วนของ IL-6 mRNA เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 µg/ml เปรียบเทียบกับ GAPDH วัดโดยวิธี Real-time Polymerase chain reaction (HOB : human osteoblast)

สรุปคือเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ไม่มีผลต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6

การนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้

การวิจัยนี้พบว่าสามารถเลี้ยงเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ได้ พบว่าเซลล์นี้มีการตอบสนองต่อกระบวนการกระตุ้นการอักเสบได้ ซึ่งน่าจะเป็นโมเดลที่ดีในศึกษาการดำเนิน pathophysiology ของการเกิดโรคในกระดูกขากรรไกรได้เป็นอย่างดีในอนาคต

ผลงานวิจัย/ผลผลิต สิ่งประดิษฐ์ นวัตกรรม หรืออื่น ๆ ที่ได้จากการทำวิจัย

และมี Impact ต่อสังคม, ประเทศชาติได้รับประโยชน์อะไร

การศึกษาต่อไปในอนาคตถึงการตอบสนองของเซลล์นี้ในแง่อื่นๆ อาจใช้เป็นโมเดลในการศึกษาถึงการตอบสนองของยาที่ใช้รักษารอยโรคในกระดูกเบ้าฟัน หรือใช้ทดสอบวัสดุทางทันตกรรมตัวใหม่ ๆ ที่เราอาจจะผลิตขึ้นมาเองเพื่อใช้ในการรักษาเบ้าฟัน

ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นจากการทำวิจัย

ผู้วิจัยเลือกใช้วิธีการทำเรียลไทม์โพลีเมอเรสเซนรีแอกชั่น ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเชื่อถือในปัจจุบัน การทำการทดลองนี้จำเป็นจะต้องไปใช้เครื่องในการอ่านผลที่มีความจำเพาะ จึงจำเป็นต้องไปใช้เครื่องที่บริษัทผู้แทนจำหน่าย ทำให้การดำเนินการติดขัดบ้าง

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

-

งานวิจัยที่คาดว่าจะดำเนินการต่อไป

จะนำเซลล์กระดูกนี้มาตรวจการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการอักเสบและการเกิดโรคในกระดูกเบ้าฟัน เช่น RANKL, OPG, IL-8 และ MMP-1 เป็นต้น

คณะผู้ทำวิจัย

- | | | |
|-------------|---|------------------------------|
| 1. ชื่อสกุล | นางสาวอินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า | หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน |
| สังกัด | ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ | |
| | 114 สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กทม 10600 | |
| | โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-1000 ต่อ 5112 โทรสาร..... | |
| | อีเมลล์ w_pupe@yahoo.com | |

2. **ชื่อสกุล** นางนिरดา ธเนศวร
สังกัด ภาควิชาโณษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
114 สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กทม 10600
โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-1000 โทรสาร.....
อีเมลล์ nirada@swu.ac.th
3. **ชื่อสกุล** นางสาวจรรมา ศักดิ์ดี
สังกัด ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษและทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
114 สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กทม 10600
โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-1000 ต่อ 5112 โทรสาร.....
อีเมลล์ bjsakdee@gmail.com
4. **ชื่อสกุล** นางสาวชื่นชีวิต ทองศิริ
สังกัด ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษและทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
114 สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กทม 10600
โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-1000 ต่อ 5112 โทรสาร.....
อีเมลล์ chuencheewi@hotmail.com

ทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณรายได้มหาวิทยาลัย
ประจำปีงบประมาณ 2553
เริ่มงานวิจัย กุมภาพันธ์ ปี 2553
สิ้นสุดงานวิจัย ปี 2554