



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์
จากเนื้อเยื่อโครงฟันของมนุษย์ โดยเดกชาเมธาไซน

โดย

ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์

นिरชา เรืองพานิช

ประสิทธิ์ ภาวสันต์

617.634
PT489 ก

พฤษภาคม ๒๕๕๖

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช



รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

การเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันของ
มนุษย์ โดยเดกซาเมธาโซน

Differentiation of Human Pulpal Fibroblasts Induced by
.....Dexamethasone.....

โดย

ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์

นیرชา เรืองพานิช

ประสิทธิ์ ภาวสันต์

พฤษภาคม 2546

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

1. คณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย
2. อาจารย์และบุคลากรของภาควิชาคัลยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บฟันจากผู้ป่วย
3. เจ้าหน้าที่ศูนย์ชีววิทยาช่องปาก ที่ให้ความเอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิจัย
4. อาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่และให้การสนับสนุนในการทำวิจัย
5. รศ.ทญ.ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านการเลี้ยงเซลล์และการทำ RT-PCR
6. ทญ.เกษรา ปัทมพันธุ์ และ ทญ.ศิริลักษณ์ ตีรณธนากุล ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ ดูแลเครื่องมือเครื่องใช้ให้อยู่ในสภาพพร้อมเสมอ
7. ดร.อาชว ศิริรักษ์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	การเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ โดยเดกชา เมธาโชน
ผู้วิจัย	ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ นีรชา เรืองพานิช ประสิทธิ์ ภาสันต์
เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ	พฤษภาคม 2546

บทคัดย่อ

เซลล์โพรงฟันเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สำคัญในการซ่อมแซมเนื้อฟัน โดยเมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสม จะมีความสามารถดิฟเฟอเรนเชียลเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน แต่ปัจจัยที่มีผลต่อการดิฟเฟอเรนเชียลนี้ยังไม่ชัดเจน การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของเดกชาเมธาโชน ที่ขนาดและเวลาต่างๆ ที่มีต่อดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ ในแง่ของระดับการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การแสดงออกของออสติโอพอนติน ปริมาณของคอลลาเจนที่เซลล์ผลิต โดยวัดปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน สัดส่วนปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ I และชนิดที่ III ที่ เซลล์ผลิต ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชั่นของคอลลาเจนชนิดที่ I และระดับของเอนไซม์ LH1 และ LH2 ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเดกชาเมธาโชนที่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสให้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนคือ 200 นาโนโมลาร์ โดยเดกชาเมธาโชนสามารถเพิ่มการแสดงออกของทั้งอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและออสติโอพอนติน โดยเห็นผลชัดเจนในวันที่ 10 หลังจากเริ่มกระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่ามีการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์โพรงฟันมนุษย์ด้วยเดกชาเมธาโชนเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และระดับการสร้างเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ผ่านมา ระดับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ III มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ จึงไม่สามารถสรุปผลของเดกชาเมธาโชนที่มีต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ III นอกจากนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชั่นของคอลลาเจน ซึ่งสอดคล้องกับการที่ระดับของเอนไซม์ LH1 และ LH2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Project Title : Differentiation of human pulpal fibroblasts induced by dexamethasone
Name of Investigators : Sirivimol Srisawasdi Prasit Pavasant Neeracha Ruangpanit
Year : May 2003

Abstract

Dental pulp fibroblasts have been shown to play an important role in dental pulp healing mechanism by differentiating into odontoblast-like cells. However, factors influencing the differentiation process of these cells are still unclear. In the present study, we would like to study the effect of dexamethasone, using various doses and times, on differentiation of pulpal fibroblasts in primary culture utilizing alkaline phosphatase activity, expression of OPN, amount and ratio of type I : type III collagen, degree of lysyl hydroxylation and expression of LH1 and LH2 as differentiation markers. The results showed that 200 nM of dexamethasone could increase both the activity of alkaline phosphatase and the expression of OPN within 10 days compared to control. The amount of type I collagen was also shown to be elevated in the dexamethasone-treated group compared to control and was dose and time dependent. The level of type III collagen was so sparse that the amount could not be determined under the condition of this experiment, therefore, the effect of dexamethasone on the production of type III collagen is still questionable. In addition, when cells were cultured in the presence of 200 nM dexamethasone, no difference was found regarding the degree of lysyl hydroxylation after 5, 10 and 15 days compared to control, which was in agreement with the results from the expression of LH1 and 2 where no difference was found.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

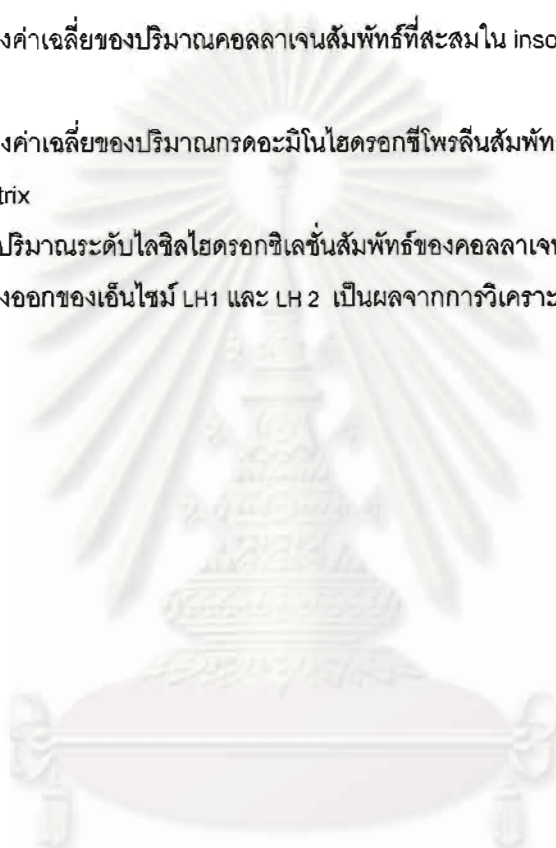
	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลของการวิจัยและบทวิจารณ์	11
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	16
เอกสารอ้างอิง	17
รูปภาพประกอบ	19



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ผลของเตกซาเมธาโซนต่อการกระตุ้นเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์โพรงฟัน	19-20
รูปที่ 2	ภาพเจลแสดงระดับของออสติโอพอนติน ในเซลล์โพรงฟัน	21
รูปที่ 3	ภาพเจล SDS-PAGE ซึ่งแสดงคอลลาเจนควบคุมและคอลลาเจนที่สกัดจาก matrix	22
รูปที่ 4	กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณคอลลาเจนสัมพัทธ์ที่สะสมใน insoluble matrix	23
รูปที่ 5	กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนสัมพัทธ์ที่สะสมใน insoluble matrix	24
รูปที่ 6	แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณระดับไลซิลไฮดรอกซีเลชันสัมพัทธ์ของคอลลาเจน	25
รูปที่ 7	แสดงการแสดงผลของเอนไซม์ LH1 และ LH 2 เป็นผลจากการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR	26



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทนำ

เป้าหมายหลักของการรักษาความมีชีวิต (vitality) ของฟันเอาไว้เพื่อให้มีหน้าที่ที่ปกติก็คือการรักษาสภาพของสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อฟันและเนื้อเยื่อโพรงฟัน (dentin-pulp interface) ให้อยู่ในสภาวะปกติ การเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนี้โดยการกระทำของสิ่งเร้าต่างๆทำให้ไม่สามารถคุ้มครองเนื้อเยื่อที่อยู่ในโพรงฟันให้ปลอดภัยได้ (Tziafas et al., 2000) ดังนั้นเป้าหมายสำคัญของการรักษาความมีชีวิตของเนื้อเยื่อโพรงฟันไว้ คือการต้องบูรณะสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวข้องนี้ให้เข้าสู่ภาวะปกติให้ได้ เซลล์สร้างเนื้อฟันหรือโอดอนโตบลาสต์ (odontoblast) เป็นเซลล์ที่สร้างเนื้อฟันปฐมภูมิ (primary dentin) ซึ่งเป็นเนื้อฟันหลักรอบโพรงฟันเมื่อมีการสร้างตัวของฟัน หลังจากนั้นเซลล์สร้างเนื้อฟันจะสร้างเนื้อฟันทุติยภูมิ (secondary dentin) ซึ่งมีผลทำให้ โพรงฟันมีขนาดเล็กลงอย่างช้าๆ ถึงแม้ว่าการทำงานของเซลล์สร้างเนื้อฟันในระยะนี้จะมีอัตราที่ช้าลง แต่พบว่าเซลล์สร้างเนื้อฟันสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานเท่าชีวิตของฟัน เว้นเสียแต่ว่าจะมีการบาดเจ็บและทำลาย การตอบสนองของเซลล์สร้างเนื้อฟันต่ออันตรายที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นโดยการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin) ภายใต้อบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ แต่ถ้ามการบาดเจ็บรุนแรงมากอาจทำให้เซลล์สร้างเนื้อฟันตาย และด้วยสภาวะที่เหมาะสมเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันจะได้รับการกระตุ้นให้มีการดิฟเฟอเรนซิเอต (differentiate) เป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cell) ซึ่งสามารถสร้างเนื้อเยื่อเมทริกซ์ (matrix) ขึ้นมาซ่อมแซมส่วนที่บาดเจ็บได้ จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องมี ความรู้ความเข้าใจในกลไกของการสร้างเนื้อฟันในสภาพปกติของร่างกาย เพื่อนำความรู้ ความเข้าใจนี้มาพัฒนาองค์ความรู้เพื่อหาทางสร้างภาวะที่เหมาะสมโดยการหาสารที่สามารถให้สัญญาณกระตุ้นจากภายนอกที่จะกระตุ้นให้เซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันสามารถดิฟเฟอเรนซิเอตไปเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Tziafas et al., 2000, Ranly and Garcia-Godoy, 2000) และเป็นการพัฒนาแนวทางที่จะหาทางรักษาสภาวะความมีชีวิตของฟันเอาไว้ได้เมื่อฟันนั้นได้รับบาดเจ็บจนมีการสูญเสียเซลล์สร้างเนื้อฟันไป

แนวทางการรักษาสภาพมีชีวิตของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ผ่านมาเป็นเวลานานและเป็นที่ยอมรับคือการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปิดที่บริเวณเนื้อฟันที่สึกๆภายหลังการกำจัดรอยผุออกไป หรือปิดที่รอยทะลุเข้าสู่โพรงประสาทฟัน (Ranly and Garcia-Godoy, 2000) โดยพบว่ามีความสำเร็จของการรักษาพอควร นั่นคือพบว่ามีการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม (reparative dentin) ได้ โดยภาวะความเป็นด่างสูงของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ช่วยลดการติดเชื้อ และกระตุ้นให้ร่างกายมีการซ่อมแซมเกิดขึ้นเองโดยเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าความเป็นด่างของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ยังสามารถกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย growth factor บางตัว เช่น TGF- β ออกจากเนื้อฟันซึ่งจะเป็นตัวไปกระตุ้นให้ เซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันสามารถดิฟเฟอเรนซิเอตเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน และ

สามารถสร้างเนื้อฟันซ่อมแซมได้ อย่างไรก็ตามก็ดี คุณสมบัติที่ไม่แข็งแรงและการละลายตัวสูงของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ทำให้การบูรณะฟันภายหลังมีปัญหาเนื่องจากมีฐานรองรับ (foundation) ที่ไม่แข็งแรง ได้มีความพยายามใช้สารบอนด์ (dentin bonding agent) ร่วมกับการใช้กรดกัดเนื้อฟัน (dentin acid etching) มาทำการรักษาภาวะการทะลุเข้าโพรงประสาทฟัน แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากวิธีการใช้ค่อนข้างยุ่งยากและต้องการความระมัดระวังอย่างสูง (Ranly and Garcia-Godoy, 2000) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับความพยายามที่จะใช้สารอื่นในการกระตุ้นให้เซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันดิฟเฟอเรนซิเอตเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เช่นการใช้สารสเตียรอยด์ (steroid) พวกเดกซาเมธาโซน (dexamethasone) โดยมีการศึกษาทั้งในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ในโพรงประสาทฟัน และพบว่าเมื่อใช้เดกซาเมธาโซนอย่างเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับสารอื่น เช่น วิตามินดี หรือ growth factor เช่น basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Ishida and Heersche, 1998, Kasugai et al., 1993, Ferrari and Byers, 1996, Pri-Chen et al., 1998) สามารถกระตุ้น ให้มีการดิฟเฟอเรนซิเอตของเซลล์จนเกิดการสร้างสารอนินทรีย์ได้ ในปัจจุบันการวิจัยจึงมุ่งไปในทิศทางที่จะหาสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ที่จะนำไปสู่การสร้างสารอนินทรีย์ได้

เซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟันเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อโพรงฟันและการซ่อมแซมโพรงฟัน ในสภาวะที่มีอันตรายต่อฟันและมีการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์เหล่านี้จะสามารถดิฟเฟอเรนซิเอตเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพื่อทำหน้าที่สร้างเนื้อฟันซ่อมแซม (reparative dentin) ขึ้นป้องกันอันตรายต่อเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Kakehashi et al., 1965; Yamamura 1985) อย่างไรก็ตามก็ดี เงื่อนไขในการเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันนี้ ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์โพรงฟันส่วนใหญ่ จะเป็นการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดดิฟเฟอเรนซิเอชัน หรือเป็นความพยายามในการศึกษากลไกการกระตุ้นดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน

ขั้นตอนหรือกระบวนการเกิดดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน แต่น่าจะเทียบเคียงได้กับขั้นตอนการเกิดดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์กระดูก โดยจากรายงานการเลี้ยงเซลล์อ่อนของกระดูก (young osteoblast) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเซลล์เหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงที่สามารถแบ่งออกได้เป็นระยะใหญ่ๆ 4 ระยะ (Aubin และคณะ, 1993) คือ

- ระยะ proliferative ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว รวมทั้งมีการสร้างโปรตีนหลายชนิด โดยโปรตีนหลักที่สร้างในระยะนี้ คือ คอลลาเจนชนิดที่ I

- ระยะ early maturation phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดการแบ่งตัว และเริ่มพบการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous proteins) เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และโปรตีนออสติโอพอนติน (Osteopontin, OPN) ซึ่งเพิ่มสูงในขณะนี้ และอัตราการสร้างคอลลาเจนจะลดลง

- ระยะ late maturation phase จะเป็นระยะที่เซลล์ปรับเปลี่ยน (modulate) เมทริกซ์ที่สร้างขึ้นในระยะก่อนเพื่อเตรียมสำหรับการเกิดตะกอนอินทรีย์ ในระยะนี้จะพบการสร้างโปรตีนกลุ่มที่ไม่ใช่คอลลาเจนเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะ Bone Sialoprotein (BSP) และเริ่มพบออสติโอแคลซิน (Osteocalcin, OC)

- ระยะ mineralization phase จะเป็นระยะที่พบการเกิดตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต และพบการสร้างโปรตีนออสติโอแคลซินจำนวนมาก

ขั้นตอนของการเกิดดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์กระดูกข้างต้น พบว่าสามารถนำไปใช้อธิบายดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์เอ็นดอทีเลียลได้ด้วย โดยผลจากการศึกษาของ Ramakrishnan และคณะ (1995) รวมทั้งจากการศึกษาของผู้ร่วมงานวิจัยครั้งนี้ พบตรงกันว่า ขั้นตอนการเกิดดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์เอ็นดอทีเลียลของหนูและของคน ภายใต้การเหนี่ยวนำของเดกซาเมธาโซน จะดำเนินไปในลักษณะเดียวกับเซลล์กระดูก และน่าจะนำมาใช้อธิบายในเซลล์โพรงฟันได้เช่นกัน และจากรายงานข้างต้น พบว่า การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ OPN สามารถใช้เป็น marker ในการบ่งชี้ว่า เซลล์ได้ดิฟเฟอเรนเชียลเข้าสู่ระยะ early maturation phase แล้ว ซึ่งเป็นที่ยอมรับในการกำหนดระดับของดิฟเฟอเรนเชียลในเซลล์กระดูก

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกลุ่มฟอสเฟต แม้ว่าบทบาทโดยตรงในการเกิดเนื้อเยื่ออินทรีย์ยังไม่ชัดเจน แต่ก็มีรายงานว่าเอนไซม์ตัวนี้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับเซลล์สร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ โดยพบว่าเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ตัวนี้สามารถเหนี่ยวนำการเกิดตะกอนอินทรีย์ได้ในสภาวะที่เหมาะสม (Wlodarski and Reddi, 1986)

OPN เป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่พบได้มากในเนื้อเยื่ออินทรีย์ ได้แก่กระดูกและฟัน หน้าที่ของโปรตีนตัวนี้ยังไม่ชัดเจน พบว่า OPN สามารถเป็นตัวกลางช่วยในการยึดเกาะของเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ และช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Mckee et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการจับกับผิวของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Sodek et al., 1992) และควบคุมขนาดของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ในขณะที่กำลังเกิดการตกตะกอนของสารอินทรีย์

คอลลาเจนจัดเป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่มีความสำคัญในการบ่งชี้ระยะดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์ โดยมีการศึกษาพบว่าก่อนที่จะมีการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ เซลล์จะมีการสร้างเมทริกซ์ที่ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ I

(type I collagen) ออกมาเป็นปริมาณมาก (Knott et al., 1997) และมีการศึกษาพบว่าคอลลาเจนมีบทบาทสำคัญต่อขบวนการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์เพราะเป็นโครงร่าง (framework) ให้แร่ธาตุมาจับเกาะ (mineral deposition) โดยพบว่าการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์เริ่มต้นที่บริเวณช่องว่างระหว่างโมเลกุล (gap zone) ของคอลลาเจน (Traub et al., 1992; Landis et al., 1993) ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีที่ยืนยันถึงบทบาทโดยตรงของคอลลาเจนต่อการตกตะกอนของแร่ธาตุในโครงร่างคอลลาเจน แต่มีการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรค osteogenesis imperfecta ซึ่งมีความผิดปกติทางพันธุกรรมของคอลลาเจน มีผลทำให้มีการสร้างคอลลาเจนน้อยลงและมีคุณภาพที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งในผู้ป่วยเหล่านี้พบว่ามีกระดูกที่ที่มีความผิดปกติไปอย่างมากด้วย (Yamauchi, 1995) เป็นการยืนยันว่าคอลลาเจนมีอิทธิพลต่อการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ นอกจากนี้ การตรวจสอบคุณภาพของคอลลาเจนเมทริกซ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนชนิดที่ I ทำให้สามารถทำนายได้ว่าเมทริกซ์นั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นเนื้อเยื่ออินทรีย์หรือไม่ เพราะมีผลจากการศึกษาอื่นที่ทำมาก่อนพบว่าเซลล์สโตรมาลจากไขกระดูก (bone marrow stromal cells) จะมีการเพิ่มมากขึ้นของไฮดรอกซีเลชันของไลซีน (lysyl hydroxylation) ที่บริเวณส่วนปลายที่ไม่ได้เป็นเกลียว (non-triple helical domain) ของโมเลกุลของคอลลาเจนในระยะท้ายของดิฟเฟอเรนเชียชัน (late stage of differentiation) ร่วมกับการมีคอลลาเจนครอสลิงค์ (collagen cross-links) ที่พบว่าเป็นลักษณะเฉพาะตัวของเนื้อเยื่ออินทรีย์ เช่น ครอสลิงค์ชนิด DHLNL, pyridinoline และ lysyl pyridinoline (Uzawa et al., 1999) ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของคอลลาเจนที่เซลล์สร้างในระยะต่างๆเป็นการตรวจสอบได้ว่าเซลล์กำลังเข้าสู่ระยะดิฟเฟอเรนเชียชันที่จะนำไปสู่การเกิดการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ได้หรือไม่

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษามวลของเดกซาเมธาโซน ที่ขนาด (dose) และเวลา (time) ต่างๆ ที่มีต่อดิฟเฟอเรนเชียชันของเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ ในแง่ของ

1. ระดับการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity)
2. การแสดงออกของฮอสติโอพอนติน
3. ปริมาณของคอลลาเจนที่เซลล์ผลิตโดยวัดปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline)
4. สัดส่วนปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ I และชนิดที่ III (type I collagen : type III collagen) ที่ เซลล์ผลิต
5. ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชัน (lysyl hydroxylation) ของคอลลาเจนชนิดที่ I และการแสดงออกของเอ็นไซม์ไลซิลไฮดรอกซีเลส 1 และ 2 (LH 1 และ 2)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

เซลล์ชนิดสร้างเส้นใย (fibroblast) ถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของผู้ป่วยที่มากอนพื้นที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ไม่มีการติดเชื้อหรือรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองถูกเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อที่ได้จากคนไข้อย่างน้อย 3 คน และเตรียมเซลล์โดยมีวิธีการโดยนำฟันที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง จากนั้นใช้คีมถอนฟันปราศจากเชื้อบีบฟันให้แตกและนำเอาเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมาเก็บทันทีในน้ำยาสารอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อที่ได้ถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) เซลล์ถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์เคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์ถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์ถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์ในรุ่นที่ 3-6

การกระตุ้นเซลล์ด้วยเดกซามะธาโซน

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเติมสารต่อไปนี้คือ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเดกซามะธาโซนที่ความเข้มข้น 20, 200 และ 2000 นาโนโมลาร์ โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ที่ไม่ได้เติมเดกซามะธาโซน อาหารเลี้ยงเซลล์ได้ถูกเปลี่ยนทุก 2 วันจนเสร็จสิ้นการทดลอง

การวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เซลล์เพาะเลี้ยงถูกถ่ายและถูกกระตุ้นตามวิธีการข้างต้นเป็นเวลาต่างๆ กัน ในช่วง 1-2 สัปดาห์ การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity assay) ใช้วิธีการที่รายงานโดย Orly และคณะ (1989) ซึ่งมีวิธีการคือล้างเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์

สกัด (extraction buffer) ที่เตรียมจากส่วนผสมของทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton-X-100) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10 ลงในแต่ละหลุมพร้อมทั้งขูดกันหลุม (scrape) หลายๆ ครั้งเพื่อให้เซลล์ละลายได้ดีขึ้น นำสารละลายเซลล์นี้มาทำการวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการผสมกับสารละลายของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate) ที่ประกอบด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต, 0.1 โมลาร์ของ 2-อะมิโน-2-เมทิล-1-โพรพานอล (2-amino-2-methyl-1-propanol), 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 โดยที่พาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตเป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส หลังจากนั้นจึงนำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) ที่เป็นสารที่มีสี เมื่อสังเกตว่าสารละลายที่บ่มไว้มีความเข้มของสีที่เหมาะสม (โดยเปรียบเทียบกับสีของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ใช้เป็นมาตรฐาน) ปฏิกริยาถูกหยุดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้ถูกนำไปคำนวณเป็นค่าการทำงานของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ใช้เป็นมาตรฐาน ค่าการทำงานของเอนไซม์คำนวณเป็นนาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที แล้วปรับเป็นร้อยละโดยให้การทำงานของเอนไซม์ของกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100

การวิเคราะห์ระดับของ ออสติโอพอนติน (OPN) และ เอ็นไซม์ไลซัลไฮดรอกซิลเลส 1 และ 2 (LH1, LH2)

ด้วยวิธี RT-PCR

RNA ถูกสกัด (extract) จากเซลล์ด้วยสารละลาย TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท จากนั้นวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปเตส (reverse transcriptase, RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์เออาร์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ด้วยเอนไซม์เอเอ็มวี (AMV; avian myeloblastosis virus) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

คอมพลีเมนต์เออาร์ดีเอ็นเอที่ได้ ถูกนำมาขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) และไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ mRNA ของ OPN LH1

และ LH2 โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์จากลำดับของสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีรายงานแล้ว และใช้ไพรเมอร์ต่อเอนไซม์ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จาก PCR ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (agarose gel) และอ่านค่าด้วยเครื่อง Gel Documentation System ของบริษัท Bio-Rad

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง คือ

OPN

เซนส์ (sense strand) 5' AGT ACC CTG ATG CTA CAG ACG 3'

แอนติเซนส์ (antisense) 5' CAA CCA GCA TAT CTT CAT GGC TG 3',

LH1

เซนส์ (sense strand) 5' AGT TGA ACT ACC TGG GCA AC 3'

แอนติเซนส์ (antisense) 5' ATC TGA GGA CTG CAG CTC A 3',

LH2

เซนส์ (sense strand) 5' GCC AGA AAC ATG GGA ATG GA 3'

แอนติเซนส์ (antisense) 5' GTG CAA TGA ACT CCC GGA TA 3',

GAPDH

เซนส์ (sense strand) 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3'

แอนติเซนส์ (antisense) 5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3'

การวิเคราะห์ระดับของคอลลาเจนใน insoluble matrix โดยการสกัดด้วยเปปซิน (pepsin) และการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน polyacrylamide gel (SDS-PAGE)

เซลล์รวมทั้งเมทริกซ์ถูกนำไปกำจัดส่วนประกอบที่ไม่ใช่คอลลาเจนในชั้นต้นด้วยสารละลายผสมระหว่าง Tris 50 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 150 มิลลิโมลาร์ โดยการเขย่าเบาๆตลอดเวลาเป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 14,000 g เพื่อนำส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลายซึ่งมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ไปสกัดด้วยเปปซินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยการ

เขย่าเช่นเดียวกัน ลักษณะโครงสร้างที่เป็นเกลียว (triple helix) ซึ่งพบเฉพาะในคอลลาเจนจะคงเหลืออยู่โดยไม่ถูกย่อยสลายโดยเปปซินแต่อยู่ในรูปของสารละลายคอลลาเจน กระบวนการดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดกระทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นคอลลาเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเปปซินถูกทำให้แข็งด้วยความเย็นและนำไปทำให้แห้งโดยการไลโอไฟไลซ์ จากนั้นคอลลาเจนที่ได้ถูกนำไปทำละลายด้วยเลียมลิบัฟเฟอร์ (Laemmli buffer) ก่อนนำไปเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้นต่อหนึ่งจานเลี้ยงเซลล์ต่อไปภายหลังด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแบบ SDS-PAGE ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณ ของการสร้างเส้นใยคอลลาเจนโดยวัดปริมาณของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน

การวัดปริมาณของคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้น โดยวัดจากปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน ด้วยขบวนการวิเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid analysis) มีวิธีการคือ ล้างเซลล์และเมทริกซ์ที่เซลล์สร้างขึ้น ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ย่นที่เย็น และทำให้เซลล์แตกโดยใช้ไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl, 0.125 NaCl buffer containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% deoxycholate, a cocktail of protease inhibitor) นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงขูดเซลล์และเมทริกซ์ออกจากจานเลี้ยง แล้วนำมาหมุนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีก 1 คืน นำผลที่ได้ไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 2,000 g นาน 30 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนที่เป็นตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น แล้วทำให้แห้งโดยขบวนการไลโอไฟไลซ์ นำตัวอย่างที่แห้งแล้วนี้ทั้งหมดมาทำไฮโดรไลซิส โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N (6 N HCl constant boiling, Pierce, USA) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสนาน 22 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการปั่นความเร็วสูงภายใต้สภาพสุญญากาศโดยเครื่อง SpeedVac (Savant) แล้วนำมาละลายน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปกรองโดยใช้เมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate membrane) ขนาด 0.22 ไมครอน (Spin X, Costar, USA) แล้วนำส่วนฟิลเตรต (filtrate) ไปหาปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนโดยขบวนการวิเคราะห์กรดอะมิโน

การวิเคราะห์สัดส่วนระหว่างคอลลาเจนชนิดที่ I และ III ใน insoluble matrix โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

แบบ Delayed Reduction SDS-PAGE

คอลลาเจนที่เตรียมได้ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น ถูกทำละลายในเลียมลิบัฟเฟอร์ ที่มียูเรีย (20 มิลลิโมลาร์ Tris/HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 2M urea และ 0.05% bromphenol blue, pH6.8) นำไปต้มประมาณ 5 นาที แล้วนำไปแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ที่ระดับกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 10 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งโปรตีนตัวอย่าง

เคลื่อนผ่านเข้าสู่เนื้อเจลเป็นระยะทางประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นทำการหยุดกระแสไฟฟ้า และเติมสารละลาย 10% mercaptoethanol ในบัฟเฟอร์ตัวกลางที่ใช้ในการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้ mercaptoethanol ตัดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ที่เชื่อมสายโพลีเปปไทด์ทั้งสามของคอลลาเจนที่พบอยู่ในส่วนปลายด้าน C (C-terminus) ซึ่งพบเฉพาะในคอลลาเจนชนิดที่ III แต่ไม่พบในคอลลาเจนชนิดที่ I เพื่อให้คอลลาเจนชนิดที่ III สามารถเคลื่อนเข้าสู่เจลได้

โดยปกติ คอลลาเจนชนิดที่ III จะเคลื่อนเข้าสู่เจลได้เพียงระยะสั้นๆในส่วนต้นของเจลถ้าไม่ตัดพันธะไดซัลไฟด์ แต่ถ้าตัดพันธะไดซัลไฟด์ก่อนเริ่มแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ก็จะทำให้ไม่สามารถแยกสายโพลีเปปไทด์ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III กับสายโพลีเปปไทด์ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I ได้ เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน และอยู่ในตำแหน่งเดียวกันในเจล การเติม mercaptoethanol หลังแยกด้วยไฟฟ้าไประยะหนึ่งแล้ว จึงเป็นการตัดพันธะไดซัลไฟด์ของคอลลาเจนชนิดที่ III ที่เพิ่งเริ่มเคลื่อนเข้าสู่เจล ในขณะที่สายโพลีเปปไทด์ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I ได้เคลื่อนเข้าสู่เจลไปก่อนแล้ว ดังนั้นเมื่อแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จ ก็จะได้พบแถบของสายโพลีเปปไทด์ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III แยกอยู่เหนือแถบของโพลีเปปไทด์ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I

การวิเคราะห์ระดับไลซิลไฮดรอกซีเลชันของคอลลาเจนแบบที่หนึ่ง

ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันของทั้งโมเลกุลของคอลลาเจน

นำตัวอย่าง (ส่วนของเมทริกซ์นอกเซลล์ที่สกัดได้จากการเลี้ยงเซลล์โดยเก็บทั้งหมดจากงานเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวข้างต้น) ที่ทำให้แห้งแล้วมาสกัดด้วยสารละลาย 6M guanidine/0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเอาส่วนที่เป็นตะกอนออกโดยการปั่นความเร็วสูง 25,000g นาน 30 นาที นำส่วนเหลวทั้งหมดมาไดอะไลซ์ ในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงแล้วนำผลที่ได้มาแบ่งเป็นสองส่วน โดยนำส่วนหนึ่งที่มีปริมาณ 1/3 ของปริมาตรทั้งหมดไปไลโอไฟไลซ์ แล้วนำมาวิเคราะห์ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันโดยนำไปทำการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด (acid hydrolysis) แล้วนำไฮโดรไลเสตที่ได้มาวิเคราะห์หากรดอะมิโน ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันกำหนดจากระดับของ Hyl/Lys+Hyl

ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันในส่วนเกลียวของโมเลกุลของคอลลาเจน

นำตัวอย่างส่วนที่แบ่งจากข้างต้น คือ 2/3 ของปริมาตรทั้งหมดไปทำให้แห้งแล้ว มาละลายในกรดอะซิติก (0.5 N acetic acid) แล้วนำไปย่อยด้วยเปปซิน (pepsin) ที่ความเข้มข้น 20% โดยน้ำหนัก เป็นเวลานาน 24

ชั่วโมง นำมากำจัดส่วนที่หลงเหลือจากการย่อย (residue) โดยการปั่นด้วยความเร็วสูงที่ 25,000 g นาน 45 นาที นำส่วนน้ำเหลวข้างบน (supernatant) ไปไดอะไลซ์ (dialyze) ในน้ำกลั่นที่เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งโดยการไลโอไฟไลซ์ จากนั้นนำตัวอย่างที่แห้งแล้วนี้มาละลายในเลียมคลอไรด์ และนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วย SDS-PAGE ความเข้มข้นของอะคริลามายด์ร้อยละ 5% ภายใต้ภาวะที่ไม่ถูกรีดิวซ์ โปรตีนที่ถูกแยกแล้วบนเจลจะถูกย้าย (transfer) ไปบนเมมเบรนโดยกระแสไฟฟ้า และย้อมโดยใช้สี Ponceau S Red ตำแหน่งที่โปรตีนตรงกับสาย α 1 และ α 2 จะถูกตัดออกจากเมมเบรนและนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรด (acid hydrolysis) นำไฮโดรไลเสตที่ได้มาวิเคราะห์ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชั่นโดยการวิเคราะห์กรดอะมิโน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการวิจัยและบทวิจารณ์

ผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

จากการกระตุ้นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์โพรงพื้นมนุษย์ที่ถูกถอนออกมา ทั้งหมด 3 กลุ่ม (Line 1, 2, และ 3) โดยใช้ความเข้มข้นของเดกซาเมธาโซนที่ต่างกัน ได้แก่ 20, 200 และ 2000 นาโนโมลาร์ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซน โดยตรวจวัดการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 1, 5, 10 และ 15 หลังจากเริ่มกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 1A ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ในทิศทางเดียวกัน โดยพบการเพิ่มขึ้นของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 10 อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาของการตอบสนองต่อการกระตุ้นนั้นมีความแตกต่างกันในเซลล์แต่ละกลุ่ม ในเซลล์กลุ่มที่ 1 การตอบสนองจะเริ่มเห็นได้ที่ความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ของเดกซาเมธาโซนในวันที่ 10 ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ 2 ซึ่งเริ่มตอบสนองในวันที่ 10 เช่นเดียวกัน แต่การตอบสนองจะสูงสุดที่ความเข้มข้น 2000 นาโนโมลาร์ ส่วนในเซลล์กลุ่มที่ 3 การตอบสนองจะคล้ายกลุ่มที่ 1 และระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์กลุ่มที่ 3 พบว่ามีค่าสูงกว่าในสองกลุ่มแรก

รูปที่ 1B แสดงผลรวมของการตอบสนองของเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มที่มีต่อเดกซาเมธาโซน ในรูปแบบของกราฟแท่ง โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากเซลล์ทั้งสามกลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนขึ้นว่า การตอบสนองต่อการกระตุ้นจะพบได้ชัดเจนในวันที่ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แม้ว่า การตอบสนองจะมีความแตกต่างกันบ้างในระดับการแสดงออกของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่จะเห็นว่าความเข้มข้นแรก ของเดกซาเมธาโซน ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในการทดลองครั้งนี้ คือที่ระดับ 200 นาโนโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกที่สามารถกระตุ้นอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 10 ของเซลล์ทั้งสามกลุ่ม และคณะผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ นี้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

รูปที่ 2 แสดงผลของเดกซาเมธาโซนในการกระตุ้นการแสดงออกของออกสติโอพอนติน (OPN) โดยในรูป 2A แสดงผลของ RT-PCR ซึ่งจะเห็นว่าระดับของ OPN ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จะเริ่มเห็นชัดที่วันที่ 10 แต่ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซน จะเริ่มพบการแสดงออกของ OPN ตั้งแต่วันที่ 5 (ในวันที่ 1 จะไม่พบการแสดงออกของ OPN เลยในทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จึงไม่ได้แสดงผลไว้) ค่าการแสดงออกของ OPN จากเซลล์ทั้งสามกลุ่ม จะถูกปรับบนฐานของระดับการแสดงออกของ GAPDH ซึ่งเป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) แล้วแสดงในกราฟรูป 2B ผลการทดลองแสดงว่าระดับการแสดงออกของ OPN ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนจะมีระดับการแสดงออกของ OPN สูงกว่ากลุ่มควบคุม และความแตกต่าง จะเห็นได้ชัดที่สุดที่วันที่ 10

การที่เดกซาเมธาโซนสามารถเพิ่มการแสดงออกของทั้งอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและ OPN แสดงว่าเดกซาเมธาโซนสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงระดับดีฟเฟอเรนเชียลของเซลล์โพรงฟันให้เข้าสู่สภาวะที่จะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์มากขึ้น ซึ่งต่อมาคณะผู้วิจัยจะได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของคอลลาเจนซึ่งเป็น marker อีกตัวหนึ่งในการบ่งชี้ระยะของดีฟเฟอเรนเชียล ในการทดลองระยะถัดไป

ความแตกต่างในระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากการกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนนั้น สาเหตุประการหนึ่งน่าจะเกิดจากระดับดีฟเฟอเรนเชียลของเซลล์ที่ต่างกัน ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบได้เสมอจากการเตรียม primary culture โดยจะพบว่าระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์แต่ละกลุ่มที่เตรียมได้นั้น มีระดับที่ต่างกัน แต่เซลล์เหล่านี้จะไม่พบการแสดงออกของ OPN ใน 5 วันแรก ดังนั้น แม้จะมีความแตกต่างกันบ้างของเซลล์เริ่มต้น แต่เชื่อว่าไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาทดลองในภาพรวม โดยจะเห็นว่า ในวันที่ 10 นั้น เดกซาเมธาโซนสามารถเพิ่มระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและ OPN ได้ในเซลล์ทุกกลุ่ม

ผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อปริมาณคอลลาเจนและสัดส่วนระหว่างคอลลาเจนชนิดที่ I และ III ใน insoluble matrix โดยการสกัดด้วยเปปซิน (pepsin) และการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน polyacrylamide gel (SDS-PAGE)

เมทริกซ์นอกเซลล์ที่เซลล์สร้างขึ้นและฝังตัวอยู่จะถูกย่อยด้วยเปปซิน ตามวิธีการทดลองที่อธิบายไว้ข้างต้น โดยวิธีนี้ส่วนเกลียว (triple helix) ของคอลลาเจนชนิดต่างๆจะยังคงสภาพอยู่และสามารถแยกได้โดยกระแสไฟฟ้า ภายหลังเสร็จสิ้นการย่อยด้วยเปปซิน นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณและสัดส่วนการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I และ III แต่เนื่องจากสาย $\alpha_1(I)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ สาย $\alpha_1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III จึงใช้วิธี Delayed reduction มาประยุกต์กับการแยกโดย SDS-PAGE ซึ่งโดยวิธีการนี้จะทำให้แถบโปรตีนของ $\alpha_1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III แยกออกมาจากแถบโปรตีนของ $\alpha_1(I)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I โดยวิธีการนี้ โปรตีนที่ได้จากการทดลองก่อนที่จะนำมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จะถูกต้มในสภาวะที่ไม่มีสารรีดิวซ์ (reducing agent) ในสภาวะนี้สาย α ทั้ง 3 สาย [$\alpha_1(I)$ 2 สาย และ $\alpha_2(I)$ 1 สาย] ที่ประกอบขึ้นเป็น เกลียวของคอลลาเจนชนิด I เกือบทั้งหมดจะคลายเกลียวและแยกสายออกจากกัน ในขณะที่สาย α ทั้ง 3 สายของ $\alpha_1(III)$ ที่ประกอบเข้าเป็นเกลียวของคอลลาเจนชนิดที่ III ยังคงยึดติดกันอยู่เนื่องจากพันธะไดซัลไฟด์ในส่วนของ ปลายด้าน C (C-terminus) ดังนั้น เมื่อทำการแยกด้วย SDS-PAGE ขนาดของโมเลกุลที่ใหญ่มาก (ประมาณ >300 kDa) ที่ยังอยู่ในรูปของเกลียวของคอลลาเจนชนิดที่ III จะไม่สามารถเคลื่อนผ่านเข้าสู่เนื้อเจลได้ แต่เพื่อให้สามารถแยกคอลลาเจนชนิดที่ III ออกจากคอลลาเจนชนิดที่ I และแสดงให้เห็นองค์ประกอบสายของ $\alpha_1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III การแยกโปรตีนด้วย

SDS-PAGE จะถูกหยุด หลังจากทำการแยกไปได้ระยะหนึ่ง เพื่อให้สาย $\alpha 1(I)$ และ $\alpha 2(I)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I เคลื่อนผ่านเข้าสู่เนื้อเจลแล้ว และในระหว่างที่หยุดกระแสไฟฟ้านี้ จะทำการเติมสารรีดิวซ์ลงในแต่ละช่องของ stacking gel เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งสารรีดิวซ์นี้จะซึมผ่าน gel ลงไปสัมผัสกับโมเลกุลขนาดใหญ่ของคอลลาเจนชนิดที่ III ที่ติดค้างอยู่ที่ส่วนบนสุดของ separating gel และตัดพันธะไดซัลไฟด์ออก เมื่อเริ่มการแยกโปรตีนต่อไป สาย $\alpha 1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III ที่ถูกคลายออกก็จะเริ่มเคลื่อนเข้าสู่เจล ในขณะที่สาย $\alpha 1(I)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I ที่มีขนาดเดียวกันนั้นได้เคลื่อนนำหน้าไปก่อนแล้วดังนั้น ด้วยวิธีการนี้ จะสามารถแยกสาย $\alpha 1(I)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I ออกจากสาย $\alpha 1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III ได้

ในรูปที่ 3 เป็น SDS-PAGE gel แสดงคอลลาเจนควบคุม (control) และคอลลาเจนที่สกัดจากเมทริกซ์นอกเซลล์ที่สกัดได้ ในแถวที่ 1 แสดงคอลลาเจนควบคุมที่เป็น collagen ชนิดที่ III ที่บริสุทธิ์ ดังนั้นจะพบเพียง 1 แถบของ $\alpha 1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III เท่านั้น เปรียบเทียบกับแถวที่ 2 ซึ่งเป็นคอลลาเจนควบคุมอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนัง (skin) โดยเตรียมขึ้นมาพิเศษให้มีสัดส่วนของคอลลาเจนชนิดที่ III มากกว่าคอลลาเจนชนิดที่ I (Ruangpanit N, 2001) จะพบแถบโปรตีนของ $\alpha 1(III)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III ในระดับเดียวกับแถบโปรตีนที่พบในคอลลาเจนควบคุมที่เป็น collagen ชนิดที่ III ที่บริสุทธิ์ ในขณะที่แถบโปรตีนของ $\alpha 1(I)$ และ $\alpha 2(I)$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I อยู่ในระดับที่ต่ำลงมาดังแสดงโดยลูกศร สำหรับสาย β คือ สารประกอบที่เกิดขึ้นได้ระหว่าง $\alpha 1(I)$ และ $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(I)$ และ $\alpha 2(I)$, และ $\alpha 2(I)$ และ $\alpha 2(I)$

ในแถวที่ 3-8 เป็นตัวอย่างจากชุดการทดลองชุดหนึ่งในสามชุด แสดงคอลลาเจนที่สกัดจากเมทริกซ์นอกเซลล์จากเจลพบว่าเซลล์สร้างคอลลาเจนชนิดที่ I เป็นหลัก ในขณะที่ไม่พบมีการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ III ในระดับที่ตรวจพบได้ ตลอดระยะเวลา 15 วันของการทดลอง โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่ปรากฏในคอลลาเจนควบคุมทั้งในแถวที่ 1 และ 2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ I ที่เซลล์สร้างพบว่ามีเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนที่สะสมในเมทริกซ์นอกเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับเดกซาเมธาโซนในทุกช่วงเวลาของการศึกษาที่ 5, 10 และ 15 วัน ภายหลังจากการกระตุ้น

ในรูปที่ 4 เป็นกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณคอลลาเจนสัมพัทธ์ที่สะสมในเมทริกซ์นอกเซลล์ภายหลังจากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนของคอลลาเจนชนิดที่ I จาก SDS-PAGE gel จากค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่พบมีความแตกต่างระหว่างปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ I ในระหว่างวันที่ 5, 10 และ 15 ภายหลังจากการกระตุ้นในกลุ่มของเซลล์ที่ได้รับเพียงกรดแอสคอร์บิกโดยลำพัง ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับเดกซาเมธาโซนจะมีการสะสมคอลลาเจนชนิดที่ I มากกว่า และปริมาณเพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ผ่านไปด้วย

ผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อปริมาณของคอลลาเจนที่เซลล์ผลิต โดยวัดปริมาณของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline)

จากการกระตุ้นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์โพรงฟันมนุษย์ที่ถูกถอนออกมา ทั้งหมด 3 กลุ่ม (Line 1, 2, และ 3) โดยใช้ความเข้มข้นของเดกซาเมธาโซนที่ 200 นาโนโมลาร์ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นดังกล่าวข้างต้น โดยตรวจวัดปริมาณของ ไฮดรอกซีโพรลีนที่วันที่ 5, 10 และ 15 หลังจากเริ่มกระตุ้น พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมเดกซาเมธาโซนและการเพิ่มนี้ก็สัมพันธ์กับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นด้วยดังแสดงในรูปที่ 5 การเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนนี้บ่งชี้ถึงการเพิ่มการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ (Uzawa et al., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการวัดปริมาณการสร้างคอลลาเจนโดยการวัดปริมาณของสาย α_1 และ α_2 โดยการใช้ SDS-PAGE ดังกล่าวแล้วข้างต้น

ทางคณะผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนระยะเวลาของการเลี้ยงเซลล์เป็น 10 วัน แทน 1 วันก่อนการกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซน เพราะผลจากการศึกษานำร่องพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ 1 วันแล้วกระตุ้น เซลล์แสดงผลของการตอบสนองที่ 5, 10 และ 15 วันได้ไม่ชัดเจนพอที่จะสรุปได้ว่าทิศทางการตอบสนองเป็นไปในทิศทางเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) และพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ 10 วันแล้วกระตุ้น เซลล์มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนโดยมีการสร้างคอลลาเจนได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์เพียง 1 วันแล้วกระตุ้น เมื่อวิเคราะห์โดยทั้งวิธี SDS-PAGE และการวัดปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนโดยการวิเคราะห์กรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ดีกว่าเมื่อเซลล์มีเวลาพอสมควรในการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์อยู่บ้างแล้ว จึงอาจตั้งสมมุติฐานได้ว่าการตอบสนองต่อเดกซาเมธาโซนในกรณีของการเปลี่ยนแปลงระดับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I อาจเกิดเป็นผลโดยอ้อม (indirect effect)

อย่างไรก็ดี เมื่อศึกษาถึงผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลซีน โดยใช้ความเข้มข้นของเดกซาเมธาโซนที่ 200 นาโนโมลาร์ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้น ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6A ซึ่งแสดงกราฟแท่งของค่าเฉลี่ยของระดับไลซิลไฮดรอกซีเลซีนสัมพันธ์ของคอลลาเจนทั้งโมเลกุลของเซลล์ 4 กลุ่ม ผลที่ได้ปรากฏว่า สัดส่วนของไฮดรอกซีเลซีนในคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับไลซิลไฮดรอกซีเลซีนทั้งโมเลกุลของคอลลาเจน และเมื่อทำการตัดส่วนปลายของคอลลาเจนที่ไม่ได้เป็นส่วนเฮลิคซ์ออก แล้วทำการวัดระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลซีนเฉพาะที่ส่วนเฮลิคซ์ ดังแสดงในรูปที่ 6B ปรากฏว่าระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลซีนในส่วนเฮลิคซ์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับเดกซาเมธาโซน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งหมายความว่า ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลซีนในส่วนปลายที่ไม่ได้เป็นเฮลิคซ์น่าจะมีแนวโน้มลดลงในกลุ่มที่ได้รับเดกซาเมธาโซน ซึ่งการแปลผลนี้ ใช้ฐานในรูปที่ 6A ที่

แสดงว่าระดับไลซิลไฮดรอกซีเลชันของโมเลกุลทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลที่ได้นี้ แยกกับสมมติฐานของคณะผู้วิจัยที่ว่า ระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันในส่วนปลายที่ไม่ได้เป็นเฮลิคซ์ จะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันเพิ่มขึ้น เข้าใกล้สภาวะที่จะสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยยังไม่สามารถสรุปในส่วนนี้ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากวิธีการตัดส่วนปลายที่ไม่ใช่เฮลิคซ์ของคอลลาเจนออกนั้น เป็นวิธีที่ค่อนข้างซับซ้อนและยุ่งยาก และมีโอกาสที่จะสูญเสียตัวอย่างในระหว่างกระบวนการได้ง่าย ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงปัญหานี้ จึงได้พยายามเพิ่มจำนวนตัวอย่างเท่าที่จะทำได้ โดยจะเห็นว่าในการทดลองช่วงนี้ แม้คณะผู้วิจัยจะได้พยายามใช้เซลล์จากผู้ป่วยมากขึ้นเป็น 2 เท่า (เตรียมจากผู้ป่วย 6 คน) แต่ผลที่ได้ครบถ้วนทุกช่วงเวลามีเพียง 4 รายดังแสดงในรูปที่ 6A และในระหว่างที่ตัดส่วนปลายที่ไม่ใช่เฮลิคซ์ออก จำนวนตัวอย่างมีการสูญเสียอย่างมาก จนได้จำนวนตัวอย่างในรายเดียวกันครบทุกช่วงเวลาเพียง 1 รายเท่านั้น และมีจำนวนตัวอย่างที่พอจะแปลผลได้อีกเพียง 2 คู่ ในส่วนที่เหลือจะสูญเสียกลุ่มควบคุมไปบ้าง หรือกลุ่มทดลองบ้าง ทำให้ตัวอย่างที่เหลือไม่สามารถนำมาแปลผลได้ แต่เนื่องจากระยะเวลาที่เหลือไม่เพียงพอให้ทำการทดลองซ้ำ เนื่องจากแต่ละรอบของการทดลองต้องใช้เวลาอย่างน้อย 4-5 สัปดาห์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแผนที่จะดำเนินการทดลองในส่วนนี้ ต่อไป จนกว่าจะได้คำตอบที่ชัดเจนในภายหลัง

อย่างไรก็ดี คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับของเอนไซม์ไลซิลไฮดรอกซีเลส 1 และ 2 (LH1 และ LH2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมกลุ่มไฮดรอกซิลให้แก่คอลลาเจน โดย LH1 จะเติมกลุ่มไฮดรอกซิลแก่ไลซีนที่บริเวณส่วนเฮลิคซ์ของคอลลาเจน ในขณะที่ LH 2 จะเติมกลุ่มไฮดรอกซิลแก่ไลซีนที่บริเวณส่วนปลายที่ไม่ใช่เฮลิคซ์ ดังนั้นระดับของเอนไซม์ทั้งสองนี้ จะเปลี่ยนแปลงตามระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ ดังที่พบในเซลล์ไขกระดูก (Uzawa et al., 1999) ที่มีรายงานว่าระดับ LH2 จะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 กลับแสดงว่าระดับของ LH2 ในเซลล์โพรงฟันอยู่ในระดับที่สูงมาตั้งแต่แรก และไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซน ผลที่ได้นี้ สอดคล้องกับผลในรูปที่ 6 ที่แสดงว่าระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันไม่เปลี่ยนแปลงในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซน เนื่องจากคณะผู้วิจัยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ LH1 และ LH2 อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้นี้ มาจากเซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยเพียง 2 ราย และคณะผู้วิจัยมีแผนจะศึกษาเพิ่มเติม ตลอดจนศึกษาเปรียบเทียบกับระดับ LH1 และ 2 จากเนื้อเยื่อโพรงฟันโดยตรงด้วย

สรุปผลของการวิจัย

1. ความเข้มข้นของเดกซาเมธาโซนที่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสให้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนคือ 200 นาโนโมลาร์ ที่วันที่ 10 ถูกเลือกนำมาใช้กระตุ้นเซลล์ในการทดลองระยะต่อไป
2. เดกซาเมธาโซนสามารถเพิ่มการแสดงออกของทั้งอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและ OPN โดยเห็นผลชัดเจนที่วันที่ 10 หลังจากเริ่มกระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น
3. มีการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์โพรงฟันมนุษย์ด้วยเดกซาเมธาโซนเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และระดับการสร้างเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ผ่านไป
4. ระดับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ III มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ ดังนั้น จึงไม่สามารถสรุปผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ III
5. ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับของไลซิลไฮดรอกซีเลชันของคอลลาเจน ซึ่งสอดคล้องกับการที่ระดับของเอนไซม์ LH1 และ LH2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาต่อผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการแสดงออกของ LH1 และ LH2 เพื่อให้ได้ผลที่สมบูรณ์ และนอกจากนี้ จะทำการเลี้ยงเซลล์ให้ระยะนานขึ้นเพื่อกระตุ้นจนเซลล์ถึงระยะที่สร้างตะกอนอินทรีย์ และสามารถย่อยแคลเซียมได้ หรือตรวจปริมาณแคลเซียมได้โดยวิธีการ Energy Dispersive Spectroscopy

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เอกสารอ้างอิง

- Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM. Osteoblastic cell lineage. In: Noda M. Cellular and molecular biology of bone. San Diego, Academic Press, 1993;pp1-45.
- Awa K, Grzesik WJ, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, Yamauchi M. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation *in vitro*. J Bone Miner Res 1999;14:1272-80.
- Ferrari AM, Byers MR. Chronic dexamethasone treatment and its effects on sensory neuropeptides, pulpal injury reactions and reparative dentin. Brain Res 1996;723:125-34.
- Ishida Y, Heersche JNM. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Both *in vivo* and *in vitro* concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. J Bone Miner Res 1998;13:1822-6.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral surg Oral med Oral pathol 1965;20: 340-9.
- Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. Arch Oral Biol 1993;38:769-77.
- Knott L, Tarlton JF, Bailey AJ. Chemistry of collagen cross-linking : Biochemical changes in collagen during the partial mineralization of turkey leg tendon. Biochem J 1997;322: 535-42.
- Landis WJ, Song MJ, Leith A, McEwen L, McEwen BF. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. J Struct Biol 1993;110:39-54.
- McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: Localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. Anat. Rec. 1996;245:293-312.

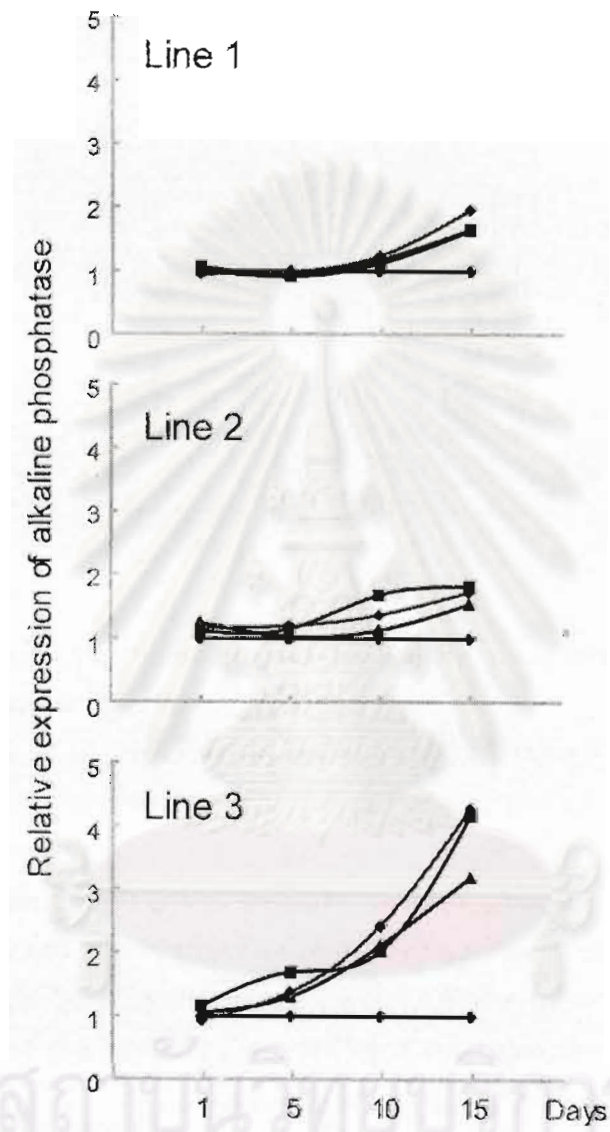
- Orly I, Gregoire M, Menanteau J, Dard M. Effects of synthetic calcium phosphates on the 3H-thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity of human fibroblasts in culture. *J Biomed Mater Res* 1989;23:1433-40.
- Pri-Chen S, Pitaru S, Lokiec F, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. *Bone* 1998;23:111-7.
- Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995;57:52-9.
- Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000;28:153-61.
- Sodek J, Chen J, Kasugai S, Nagata T, Zhang Q, McKee MD, Nanci A. Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. In: Slavkin, H., and Price, P. (eds) *Chemistry and Biology of mineralized tissues*. Amsterdam:Elsevier Science publishers. 1992;pp297-306.
- Traub W, Arad T, Weiner S. Growth of mineral crystals in turkey tendon collagen fibers: *Connect Tissue Res* 1992;28:99 -111.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000;28:77-92.
- Uzawa K, Grzesik W, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, Yamauchi M. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1272-1280.
- Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986;39:382-5.
- Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 1985;64:530-40.

Yamauchi M. Collagen: The major matrix molecule in mineralized tissues. In JB Anderson and SC Garner (eds.), Calcium and Phosphorus in Health and Disease. Boca Raton: CRC Press. 1995; pp. 157-72.



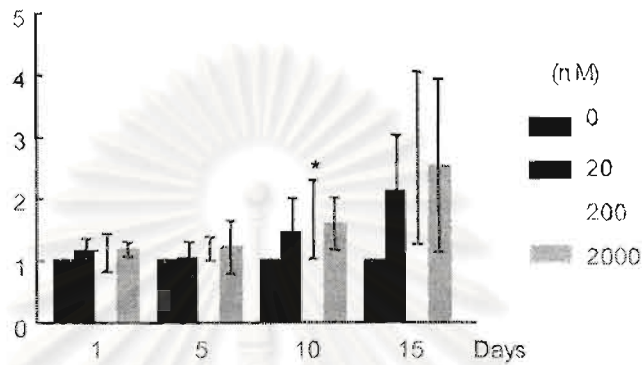
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A



รูปที่ 1

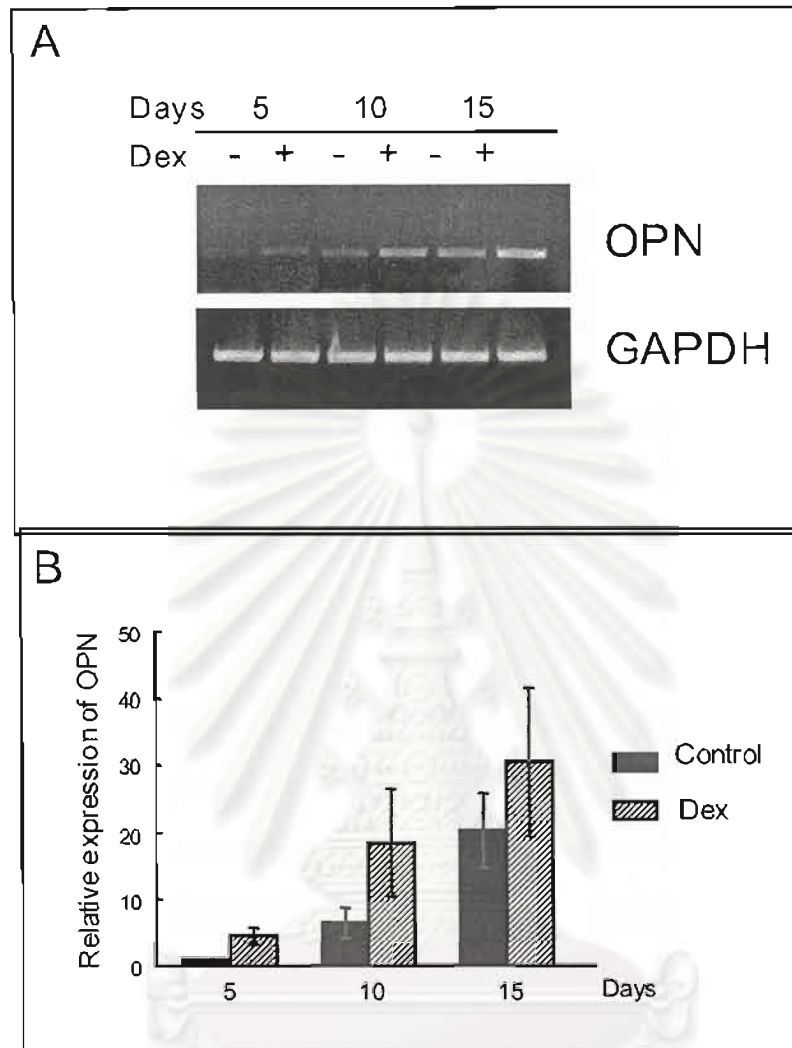
B



รูปที่ 1 ผลของเดกซาเมธาโซนต่อการกระตุ้นเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์โพรงฟัน

เซลล์โพรงฟันที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 ราย (Line 1-3 รูป 1A) ถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนที่ความเข้มข้น 20, 200, และ 2000 นาโนโมลาร์ (nM) เป็นเวลา 1, 5, 10 และ 15 วัน (Days) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 นาโนโมลาร์) จากนั้นจึงวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ค่าการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในกลุ่มควบคุม จะถูกปรับให้เป็น 1 ในทุกการทดลอง จากนั้นจึงปรับค่าการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในกลุ่มอื่นๆ โดยการอ้างอิงค่าของกลุ่มควบคุม

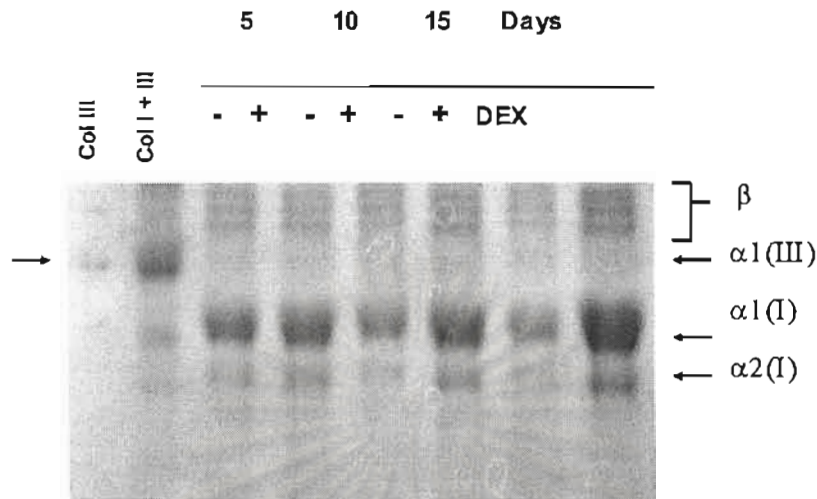
รูป 1B แสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่คำนวณจากผลการทดลองของเซลล์ทั้งสามชุดในรูป 1A ค่าในแกนตั้งแสดงจำนวนเท่าๆ ของค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์กลุ่มต่างๆ เมื่อปรับให้ค่าในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1 แกนนอนแสดงจำนวนวันที่กระตุ้นเซลล์



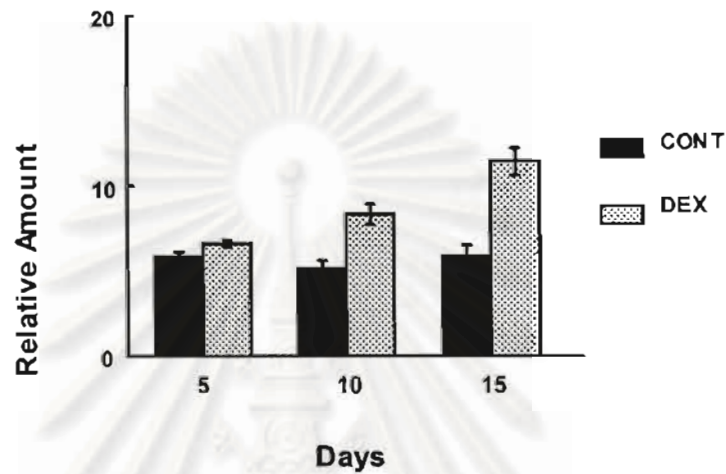
รูปที่ 2 แสดงระดับของออสติโพนิน (OPN) ในเซลล์โพรงฟัน

เซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซน ความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกที่สามารถกระตุ้นค่าการทำงานของ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ดูรูปที่ 1) เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน (Days 5, 10, 15) ผลการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR (รูปที่ 2 A) พบว่า จะเริ่มพบการแสดงออกของ OPN ที่วันที่ 5 ในสภาวะที่กระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซน (Dex +) และในวันที่ 10 และ 15 ระดับการแสดงออกของ OPN ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจะสูงกว่าระดับในกลุ่มควบคุม (Dex -) GAPDH คือระดับการแสดงออกของ glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน

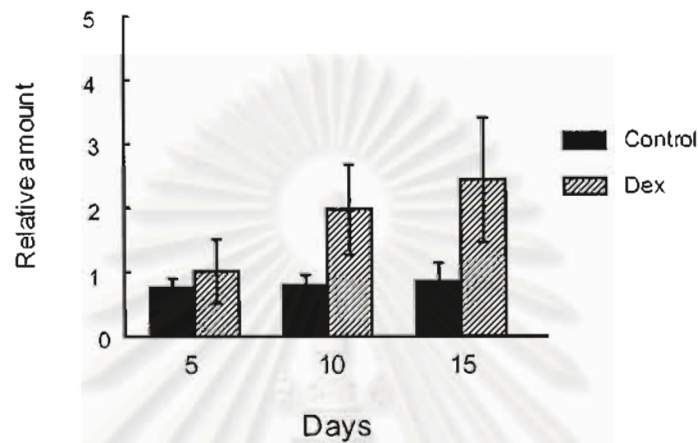
ในรูป 2B แสดงระดับของ OPN จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยกำหนดให้ค่าการแสดงออกของ OPN ในเซลล์กลุ่มควบคุมในวันที่ 5 เท่ากับ 1 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 3 แสดงภาพ SDS-PAGE gel ซึ่งแสดงคอลลาเจนควบคุมและคอลลาเจนที่สกัดจาก matrix deposition ของเซลล์ ในแถวที่ 1 แสดงคอลลาเจนควบคุมที่เป็น purified type III collagen ซึ่งพบเพียง 1 band ของ $\alpha 1(\text{III})$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III เท่านั้น เปรียบเทียบกับแถวที่ 2 ซึ่งเป็นคอลลาเจนควบคุมอีกตัวหนึ่งที่สกัดจากผิวหนัง (skin) และมีสัดส่วนของคอลลาเจนชนิดที่ III มากกว่าคอลลาเจนชนิดที่ I จะพบแถบโปรตีนของ $\alpha 1(\text{III})$ ของคอลลาเจนชนิดที่ III ในระดับเดียวกับแถบโปรตีนที่พบใน purified type III collagen ในขณะที่แถบโปรตีนของ $\alpha 1(\text{I})$ และ $\alpha 2(\text{I})$ ของคอลลาเจนชนิดที่ I อยู่ในระดับที่ต่ำลงมา ดังแสดงโดยลูกศรสำหรับ β -chain คือ complex ที่เกิดขึ้นได้ระหว่าง $\alpha 1(\text{I})$ และ $\alpha 1(\text{I})$, $\alpha 1(\text{I})$ และ $\alpha 2(\text{I})$, และ $\alpha 2(\text{I})$ และ $\alpha 2(\text{I})$ ในแถวที่ 3-8 เป็นตัวอย่างจากชุดการทดลองชุดหนึ่งในสามชุดแสดงคอลลาเจนที่สกัดจาก matrix deposition โดยเซลล์ จาก gel พบว่าเซลล์สร้างคอลลาเจนชนิดที่ I เป็นหลัก ในขณะที่ไม่พบมีการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ III ในระดับที่ตรวจสอบได้ ตลอดระยะเวลา 15 วันของการทดลอง โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่ปรากฏในคอลลาเจนควบคุมทั้งในแถวที่ 1 และ 2

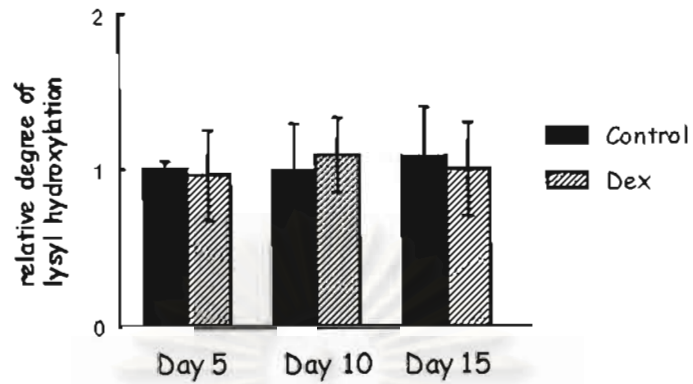


รูปที่ 4 เป็นกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณคอลลาเจนสัมพัทธ์ที่สะสมใน insoluble matrix ของเซลล์ 3 กลุ่ม ภายหลังจากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบสาย α ของคอลลาเจนชนิดที่ I จาก SDS-PAGE gel จากค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่พบมีความแตกต่างระหว่างปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ I ในกลุ่มควบคุมในระหว่างวันซี, 10 และ 15 ของการทดลอง ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับเดกซามธาโซนพบมีการสะสมคอลลาเจนชนิดที่ I มากกว่า และปริมาณเพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ผ่านไปด้วย

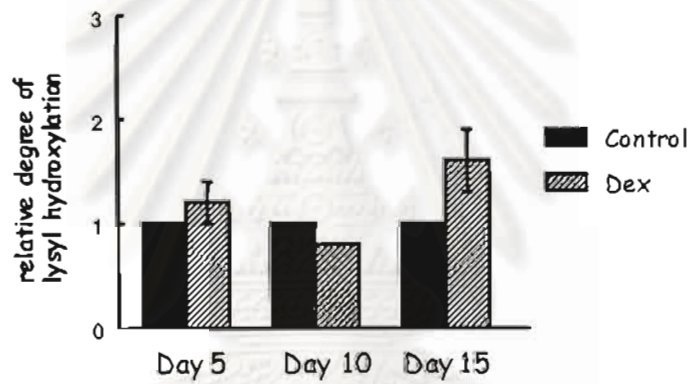


รูปที่ 5 เป็นกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนสัมพันธ์ที่สะสมใน insoluble matrix ซึ่งได้จากเซลล์ 3 กลุ่ม ไม่พบมีความแตกต่างระหว่างปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนในกลุ่มควบคุมในวันที่ 5, 10 และ 15 ภายหลังจากกระตุ้น ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยเดกซามธาโซนพบมีการสะสมของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด และปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นนี้สัมพันธ์กับระยะเวลาที่ผ่านไปด้วย การเพิ่มปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนเป็นการบ่งถึงปริมาณคอลลาเจนที่เพิ่มมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

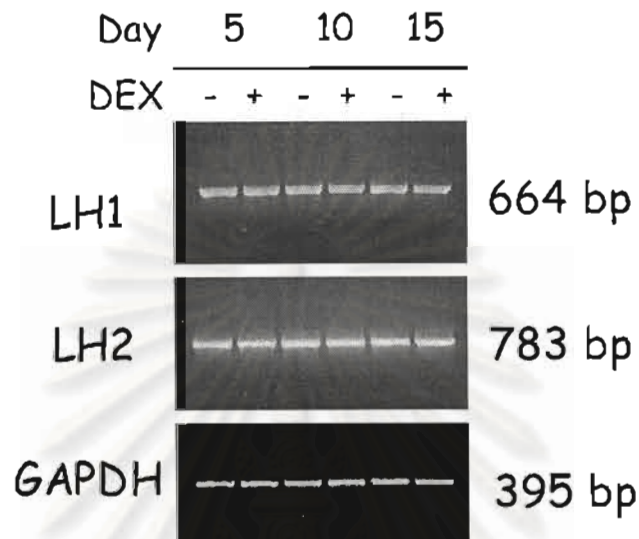


รูป 6 A



รูป 6 B

รูปที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณระดับไลซิลไฮดรอกซีเลชันสัมพันธ์ของคอลลาเจนที่เก็บได้จากนทริคีนอกเซลล์ที่เซลล์สร้างขึ้นภายหลังถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ และทำการวัดภายหลังจากกระตุ้นแล้ว 5 10 และ 15 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นโดยยาภาพ 6A เป็นการแสดงค่าของคอลลาเจนทั้งโมเลกุล ส่วนภาพ 6B เป็นการแสดงค่าระดับไลซิลไฮดรอกซีเลชันสัมพันธ์ของโมเลกุลที่ถูกตัดปลายเทโลเปปไทด์ออกไปเหลือแต่ส่วนที่เป็นเกลียว (helix)



รูปที่ 7 แสดงการแสดงออกของเอ็นไซม์ LH1 และ LH 2 เป็นผลจากการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR หลังจากทีเซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน (Days 5, 10, 15) พบว่าการแสดงออกของเอ็นไซม์ LH1 และ LH 2 ที่วันที่ 5 10 และ 15 ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีระดับการแสดงออกของ GAPDH (glyceral dehy de 3 phosphate dehydrogenase) เป็นกลุ่มควบคุมภายใน

