



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การตอบสนองของเซลล์โพรงฟันต่ออินเตอร์ลิวคิน-6

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทิพวรรณ ธราพัฒนานนท์

ประสิทธิ์ ภาวสันต์

ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล

พฤษภาคม 2550

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัยเรื่อง

การตอบสนองของเซลล์โพรงฟันต่ออินเตอร์ลิวคิน-6

The responses of pulp cells to interleukin-6

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โดย

ทิพวรรณ ธราภิวฒนานนท์ ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และ ทศนีย์ ยงชัยตระกูล

พฤษภาคม 2550

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย  
ขอบคุณ ทันตแพทย์หญิงทราย พิณใจไพฑูรย์ นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาช่องปาก และบุคลากรใน  
หน่วยปฏิบัติการเนื้อเยื่ออินทรีย์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และขอขอบคุณ  
คณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย: การตอบสนองของเซลล์โพรงฟันต่ออินเทอร์ลิวคิน-6

ชื่อผู้วิจัย: ทิพวรรณ ธราภิวัดมนานนท์ ประสิทธิ์ ภวสันต์ ทศนีย์ ยงชัยตระกูล

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ: พฤษภาคม 2550

#### บทคัดย่อ

อันตรายต่อโพรงฟัน จะเหนี่ยวนำให้มีการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และเกิดการละลายตัวของเนื้อฟันจากภายในโพรงฟัน (internal resorption) คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า อินเทอร์ลิวคิน-6 (IL-6) ที่เพิ่มขึ้นในภาวะที่มีการอักเสบของโพรงฟัน มีผลต่อเซลล์โพรงฟัน โดยรบกวนสมดุลของ รีเซปเตอร์ แอคติเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียส แฟคเตอร์ แคปปาบี ไลแกนส์ (RANKL) และออสติโอโปรติเจริน (OPG) ซึ่งมีผลกระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูก และย่อยสลายเนื้อฟัน การศึกษาด้วยอาร์ที พีซีอาร์ และเวสเทิร์นอนาไลซิส พบว่าอินเทอร์ลิวคิน-6 (1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) กระตุ้นการสร้าง RANKL ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน แต่ไม่มีผลต่อ OPG และมาโครฟาจสตีมูลेटิงแฟคเตอร์ (M-CSF) การกระตุ้น RANKL เกิดผ่านสัญญาณของ ฟอสโฟอินอซิไทด์ ไตรไคเนส (PI3K) นอกจากนี้ ยังพบว่า IL-6 เพียงลำพังก็สามารถกระตุ้น RANKL ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีการเพิ่มของรีเซปเตอร์ (sIL-6R หรือ gp80) จากภายนอกเซลล์ การที่เซลล์โพรงฟันตอบสนองต่อ IL-6 โดยการเพิ่ม RANKL น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการละลายเนื้อฟันจากภายในโพรงฟัน หลังจากฟันได้รับอันตราย

คำสำคัญ: เซลล์ โพรงฟัน อินเทอร์ลิวคิน-6 RANKL OPG

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title: The response of pulp cells to interleukin-6

Name of Investigators: Thipawan Tharapiwattananon, Prasit Pavasant,  
Tussanee Yongchaitrakul

Year: May 2007

### Abstract

Injuries to dental pulp induce the secretion of inflammatory cytokines, resulting the internal resorption of the pulps and root canals. We hypothesize that the increased interleukin-6 (IL-6) following injuries affects pulp cells by interfering the balance of the receptor of nuclear factor B ligands (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) system, which leads to osteoclastogenesis and resorption of dentin. Reverse transcription-polymerization chain reaction (RT-PCR) and Western analysis demonstrate that IL-6 (1 and 10 ng/ml) stimulates the expression of RANKL at both mRNA and protein levels. IL-6 does not exert effect on the expression of OPG and macrophage stimulating factor (M-CSF). The stimulation of RANKL occurs via the pathway of phosphoinositide 3 kinase (PI3K). In addition, IL-6 alone can stimulate the expression of IL-6 without additional effect of exogenous of soluble IL-6 receptor (sIL-6R or gp80). The response of pulp cells to IL-6 by increasing RANKL could be an important factor for internal resorption following injuries.

Key words: Cells, dental pulp, interleukin-6, RANKL, OPG

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลการวิจัย	6
สรุปและวิเคราะห์	7
เอกสารอ้างอิง	14



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพ PCR และกราฟแสดงระดับการแสดงออกของ RANKL, OPG และ M-CSF เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย IL-6 ในเซลล์โพรงฟัน	9
รูปที่ 2 ภาพและกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนของ RANKL, OPG และ M-CSF เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย IL-6 ในเซลล์โพรงฟัน	10
รูปที่ 3 ภาพและกราฟแสดงผลการกระตุ้นของ IL-6 ร่วมกับ soluble IL-6 receptor	12
รูปที่ 4 ภาพและกราฟแสดงผลการยับยั้ง RANKL ด้วยสารยับยั้งต่อ PI3K และ Akt	13



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ

โพรงประสาทฟัน เป็นโพรงที่มีลักษณะปิด เนื่องจากถูกล้อมรอบด้วยเนื้อฟัน เนื้อเยื่อภายในโพรงประสาทเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะหลวมๆ (loose mesenchymal tissue) มีหลอดเลือดหลักเพียงเส้นเดียวมาหล่อเลี้ยง โดยผ่านทางรูเปิดปลายราก (apical foramen) และอาจมีหลอดเลือดขนาดเล็กผ่านทางรูเปิดด้านข้าง (lateral canal) ช่วยในการหล่อเลี้ยงโพรงฟัน

ฟันผุเป็นสาเหตุหลักที่ทำลายเนื้อเยื่อโพรงฟัน เนื่องจากการติดเชื้อและการอักเสบของเนื้อเยื่อภายในโพรงประสาทฟัน (pulpitis) เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะสร้างสารหลังเป็นการตอบสนอง สารหลังนี้สามารถกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบภายในโพรงฟัน สารหลังที่เกี่ยวกับการอักเสบมีเป็นจำนวนมาก เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 (interleukin-6, IL-6) คอลลาจีเนส (collagenase) อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (interleukin-1 $\beta$ ) และ พรอสตาแกลนดิน (prostaglandin)

IL-6 เป็นไซโตไคน์หลักตัวหนึ่งของกระบวนการอักเสบ โดยทำหน้าที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ บีเซลล์ (B-cell) ไปเป็นพลาสมาเซลล์ (plasma cell) ที่ทำหน้าที่หลั่งอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) และกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) นอกจากนั้น IL-6 ยังมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางระบบภูมิคุ้มกันหลายโรค เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis), มัลติเพิล ไมอีโลมา (multiple myeloma) และโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) (Hirayama et al., 2002, Giuliani et al., 2004, Roodman, 1999) เซลล์ที่สามารถหลั่ง IL-6 นั้น นอกจากเซลล์อักเสบแล้ว เซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันเองก็สามารถหลั่ง IL-6 ได้เช่นกัน เช่น ในภาวะที่มีแล็คโตบาซิลลัส เคไซ (*Lactobacillus casei*) (Matsushima, 1998) ภาวะที่มีการอักเสบติดเชื้อในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน หรือมีรอยโรคปลายราก (periapical lesion) (Barkhordar et al., 1999)

IL-6 ยังมีบทบาทในการทำลายของเนื้อเยื่อแข็ง เช่น กระดูก โดยมีรายงานว่า IL-6 เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) เนื่องจาก IL-6 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ รีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ ออฟนิวเคลียสแฟคเตอร์แคปปาบี ไคเนส (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; RANKL) บนเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) โดยตรง (Nakashima et al., 2000) RANKL เป็นโปรตีนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุม



การสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยโปรตีนตัวนี้จัดอยู่ในกลุ่มของทูเมอร์เนโครสิส แฟคเตอร์ (tumor necrosis factor; TNF) และสามารถจับกับ RANK บนผิวเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก ส่งผลให้เกิดเซลล์สลายกระดูกเพิ่มขึ้น และกระตุ้นการทำลายกระดูก โดยกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยการสัมผัสกันระหว่างเซลล์สร้างกระดูก/สโตรมาเซลล์ และเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast progenitors) จึงจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้ (Jimi et al., 1996, Suda, 1999)

นอกจาก RANKL ยังมีโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายกระดูกรวมถึงการเกิด bone remodeling ด้วย คือ ออสติโอโปรเทจรีน (osteoprotegerin; OPG) โดย OPG นั้นเป็นรีเซปเตอร์ (decoy receptor) ตัวหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของ TNF receptor superfamily เป็นสารที่หลั่งออกมาแล้วสามารถจับกับ RANKL ได้อย่างเหนียวแน่น (high affinity) โดยมันจะจับกับ RANKL แล้วทำให้ RANKL ไม่สามารถไปจับกับ RANK ได้ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (Simonet et al., 1997, Yasuda et al., 1998)

การละลายของกระดูก นอกจากจะอาศัยการทำงานของ RANK/RANKL และ OPG แล้ว ยังต้องอาศัยโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีความสำคัญด้วยเช่นกันคือ มาโครฟาจ สติมูเลติง แฟคเตอร์ (macrophage colony stimulating factor; M-CSF) M-CSF เป็น soluble factor ที่สร้างโดยเซลล์สร้างกระดูก/สโตรมาเซลล์ ซึ่งจำเป็นต่อการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก โดย M-CSF จำเป็นต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก differentiation และการคงอยู่ (survival) ของเซลล์สลายกระดูก (Kodama et al., 1991, Suda et al., 1999)

สำหรับเนื้อเยื่อโพรงฟัน ในทางคลินิกพบว่า การอักเสบเรื้อรังของเนื้อเยื่อโพรงฟัน จะก่อให้เกิดการละลายตัวของผิวด้านในของโพรงฟัน (Barclay, 1993) นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงการเพิ่มขึ้นของ IL-6 ในเนื้อเยื่อโพรงฟันในภาวะที่มีการอักเสบ จึงมีความเป็นไปได้ที่การเพิ่มขึ้นของ IL-6 จะนำไปสู่การกระตุ้นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสลายเนื้อฟันในทำนองเดียวกับการสลายของกระดูก

คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า IL-6 ที่เกิดในภาวะที่มีการอักเสบของโพรงฟัน จะมีผลต่อโมเลกุลกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูก และเนื้อเยื่อแข็งของฟัน จึงต้องการศึกษาผลของ IL-6 ต่อเนื้อเยื่อโพรงฟัน ในการแสดงออกของ RANKL, OPG และ M-CSF

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เซลล์โพรงฟันจะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชา ศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ เป็นพื้นที่ที่ไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์แต่ถอน เนื่องจากเป็นฟันคุดหรือเพื่อจัดฟัน ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อของคนใช้อย่างน้อย 3 คนและทำการทดลองซ้ำสามครั้ง เตรียมเซลล์โดยผ่าฟันออกและดึงเนื้อเยื่อโพรงฟันออก ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ (Nunc, Roskilde, Denmark) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ คือ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine) 2 มิลลิโมลาร์, เพนิซิลินจี (penicillin G) 100 IU/ml และแอมโฟเทอราซินบี (amphotericin B) 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์และส่วนประกอบเป็นผลิตภัณฑ์ของ Gibco BRL, USA

เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ เริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6

### การกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-6

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 0.5 กระตุ้นเซลล์ด้วย IL-6 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป

ในการทดสอบกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์โดย IL-6 เซลล์จะได้รับ IL-6 ร่วมกับ siIL-6R 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือได้รับสารยับยั้งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนได้รับการกระตุ้นด้วย IL-6 สารยับยั้งที่ใช้ในการศึกษาคือ สารยับยั้งต่อ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K inhibitor; LY 294002) 1.4 ไมโครโมลาร์ (Cayman) หรือสารยับยั้งต่อ Akt (Akt inhibitor II) 5 ไมโครโมลาร์ (Calbiochem EMD Biosciences, La Jolla, CA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### การวิเคราะห์ระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR

อาร์เอ็นเอ (RNA) จากเซลล์ในแต่ละการทดลอง จะถูกแยกด้วย Tri reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) และวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วย UV-spectrophotometer ที่ OD 260/280 จากนั้นนำอาร์เอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลอง ไปผ่านกระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase; RT) โดยใช้เอนไซม์เอเอ็มวี (avian myeloblastosis virus; AMV) (Promega) เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

นำ cDNA ไปขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase และใช้ primer ที่จำเพาะต่อ M-CSF, RANKL, OPG และ GAPDH ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้คือ

RANKL	forward	5' CCAGCATCAAAATCCCAAGT3'
	reverse	5' CCCCTTCAGATGATCCTTC 3'
OPG	forward	5' TGCAGTACGTCAAGCAGGAG 3'
	reverse	5' TGACCTCTGTGAAAACAGC 3'
M-CSF	forward	5' CTA AGC TGG ACG CAC AGA CCA 3'
	Reverse	5' TCT CAG GCT GCA CAC CTT 3'
GAPDH	forward	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'
	reverse	5'TCACACCCATGACGAACATGG 3'

ปฏิกิริยา PCR ทำในปริมาตร 25 ไมโครลิตร denature 1 นาที 94 องศาเซลเซียส annealing 1 นาที 60 องศาเซลเซียส และ chain elongation 1.45 นาที 72 องศาเซลเซียส โดยใช้ DNA thermal cycle (Tpersonal, Whatman Biometra, Goettingen, Germany) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว PCR products ที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในแผ่นเจลอกาโรส (agarose gel) ที่มีความเข้มข้นของอกาโรสร้อยละ 2 ที่มีส่วนผสมของเอทีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลารอยด์บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet)

### การวิเคราะห์ด้วย ELISA

เมื่อครบกำหนด 48 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ M-CSF ด้วยชุด ELISA (Quantikine® R&D System Inc., MN) ตามคำแนะนำของบริษัท โดยหยอดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์ลงใน microplate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ M-CSF (mouse monoclonal antibody against human M-CSF) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง และย้อมต่อด้วย polyclonal antibody against M-CSF conjugated to horseradish peroxidase เป็นเวลาอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นใส่ substrate เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะยับยั้งปฏิกิริยาและนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสง

### การวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis

เซลล์จะถูกละลายด้วยไรบอปปิเฟออร์ (radioimmunoprecipitation; RIPA; 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0) วัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดวัดโปรตีน BCA™ (Pierce, Rockford, IL) แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าใน acrylamide gel (polyacrylamide gel electrophoresis) และเคลื่อนย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) ด้วยไฟฟ้า

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ ไปย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ RANKL, OPG หรือ  $\beta$ -actin (Chemicon International, Temecula, CA) ต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase-labeled secondary antibody) (Sigma, St. Louis, MO) และขยายสัญญาณโดยเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้ว ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (chemiluminescence detection system) (Pierce, Rockford, IL) จากนั้นจึงตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (Pierce, Rockford, IL) วิเคราะห์ความเข้มของแถบสีดำด้วย ซาฮอน (Scion Image analysis software)

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าความเข้มเป็นค่า mean  $\pm$  SD วิเคราะห์ด้วย one-way analysis of variance และใช้ LSD's test สำหรับ post-hoc analysis ค่า  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

## ผล

ผลจากการศึกษาพบว่า IL-6 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL ตามลำดับความเข้มข้นของ IL-6 เมื่อกระตุ้นเซลล์โพรงฟันด้วย IL-6 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเห็นการกระตุ้นได้ชัดที่ 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ OPG และ M-CSF ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์ในระดับโปรตีน พบว่า IL-6 กระตุ้นการสร้าง RANKL เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IL-6 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ OPG และ M-CSF แสดงให้เห็นว่า เซลล์มีการสร้าง RANKL เพิ่มขึ้นในทำนองเดียวกับการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 2

ในการทดลองขั้นต่อไป คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ IL-6 ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เห็นผลชัดเจนในการกระตุ้น RANKL และเลือกศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้าง RANKL เพิ่มขึ้น

เนื่องจากมีรายงานว่า เมื่อ IL-6 จับกับ sIL-6R (หรือ gp80) แล้วจะไปกระตุ้นการเติมฟอสเฟตในตำแหน่งของไทโรซีน (phosphorylate tyrosine) ของรีเซปเตอร์ตัวหนึ่ง คือ gp 130 ทำให้เกิดสัญญาณเข้าไปกระตุ้นการทำงานของยีน โดยผ่านทางสแตท 3 (signal transducer and activator of transcription; STAT3) (Simpson et al.,1997) คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-6 ร่วมกับ sIL-6R เนื่องจากต้องการตรวจสอบว่า ถ้า sIL-6R จับกับ IL-6 แล้ว sIL-6R จะช่วยเสริมฤทธิ์ของ IL-6 หรือให้ผลต่างไปจากการกระตุ้นด้วย IL-6 เพียงลำพังหรือไม่ ผลการทดสอบพบว่า sIL-6R ที่ความเข้มข้น 0.1-10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยลำพัง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนของ M-CSF, RANKL หรือ OPG (ไม่ได้แสดงผลไว้) และการใช้ sIL-6R ร่วมกับ IL-6 ก็ไม่มีผลในการช่วยเสริมการกระตุ้น RANKL แต่อย่างใด (เปรียบเทียบแถวที่ 2 และ 4) (รูปที่ 3)

ในการตรวจสอบกลไกการกระตุ้น คณะผู้วิจัยได้ใช้สารยับยั้ง คือ PI3K inhibitor และ Akt inhibitor ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 30 นาที ก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-6 (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ผลปรากฏว่า PI3K inhibitor สามารถยับยั้งการกระตุ้น RANKL ของ IL-6 ได้ แต่ Akt inhibitor ยับยั้งไม่ได้ (รูปที่ 4)



## สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงว่า IL-6 สามารถเพิ่มการแสดงออกของ RANKL ได้ โดยไม่มีผลต่อการแสดงออกของ OPG และ M-CSF ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ RANKL โดยอิทธิพลของ inflammatory cytokines ในเซลล์กระดูก หรือเซลล์เอ็นดोปริทันต์มาแล้ว (Fukushima et al., 2005) การเพิ่มขึ้นของ RANKL โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของ OPG และ M-CSF ก็เพียงพอในการกระตุ้นการดีฟเฟอเรนซีเอชันของเซลล์ทำลายกระดูกและเนื้อเยื่ออินทรีย์ ดังนั้น IL-6 ที่เพิ่มขึ้นในภาวะที่เกิดการอักเสบภายในโพรงฟัน จึงน่าจะมีส่วนร่วมในการละลายเนื้อฟันจากภายในโพรงฟัน (internal resorption)

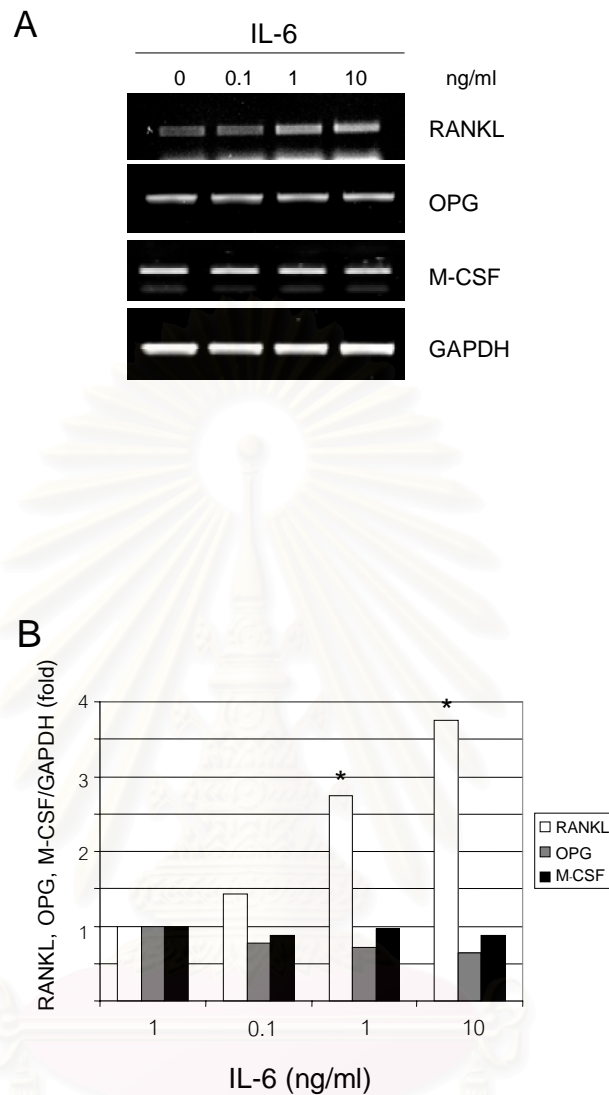
การศึกษานี้ พบว่า กลไกในการกระตุ้น เกิดผ่าน PI3K แต่ไม่ผ่าน Akt ทั้งนี้ มีความเป็นไปได้ที่กลไกอาจจะเกิดจากการกระตุ้นผ่านไซโคลออกซีจีเนส-2 (cyclooxygenase-2; COX-2) ซึ่งมีรายงานว่า IL-6 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ COX-2 เป็นผลให้มีการสร้างพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin-2; PGE-2) เพิ่มขึ้น PGE-2 เป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบซึ่งมีส่วนช่วยให้เกิดการเพิ่มเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis) โดยเพิ่มการสร้าง RANKL และลดการสร้าง OPG ในเซลล์กระดูก (Liu et al., 2005; 2006)

การตอบสนองของเซลล์ต่อ IL-6 มีรายงานว่าเกิดผ่าน IL-6R หรือ gp80 และต้องการโมเลกุลอีกตัวหนึ่งคือ gp130 การส่งสัญญาณของ IL-6 เข้าสู่เซลล์ จะเริ่มจากการจับกันระหว่าง IL-6 และ IL-6R หรือ gp80 ซึ่งไม่สามารถส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ได้ จากนั้น complex ของ IL-6-GP80 จึงจะเคลื่อนไปจับกับ gp 130 เพื่อส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ต่อไป (Rose-John and Heinrich, 1994) โดยพบว่า IL6R หรือ gp80 นั้น จะปรากฏในสองรูปแบบ คือ membrane-type และ soluble-type (Lust et al., 1992; Horiuchi et al., 1994) และมีรายงานว่า การจับกันระหว่าง IL6-gp130 นั้น ต้องการ gp-80 ในรูปของ soluble type หรือที่เรียกว่า sIL-6R เพื่อช่วยในการจับ IL-6 กับ gp130 โดยพบว่าการแสดงออกของ membrane-type gp80 ไม่เพียงพอต่อการเกิด tri-molecular complex ของ IL-6-gp80-gp130 เช่นรายงานของ Palmqvist และคณะ (2002) พบว่า IL-6 ไม่สามารถเหนี่ยวนำการสลายกระดูกถ้าไม่มี sIL-6R และรายงานของ Tamura และคณะ (1993) ที่พบว่า sIL-6R ช่วยเพิ่มการเกิดเซลล์สลายกระดูก แต่ก็มีรายงานโต้แย้งว่า soluble IL-6R นั้น ไม่มีความจำเป็น (Lowik et al., 1989; Ishimi et al., 1990)

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการแสดงออกของ gp80 ในเซลล์โพรงฟัน และพบว่า เซลล์โพรงฟันมีการแสดงออกของ gp80 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ ไม่สามารถบอกได้ว่า gp80 ที่เซลล์โพรงฟันสร้างขึ้นนั้น อยู่ในลักษณะใด ระหว่าง membrane-type และ soluble-type. แต่ผลการทดลองที่แสดงว่าเซลล์โพรงฟันสามารถตอบสนองต่อ IL-6 ได้ แสดงว่า กลไกพื้นฐานที่แสดงโพรงฟันสร้างขึ้น คือ gp80 และ gp130 เพียงพอที่จำทำให้เกิดการตอบสนองโดยไม่ต้องการ external soluble gp80 ซึ่งข้อสมมติฐานนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองที่แสดงว่า การเติม exogenous gp80 หรือ soluble receptor นั้น ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของเซลล์ต่อ IL-6

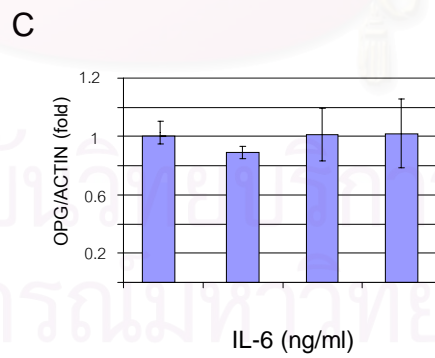
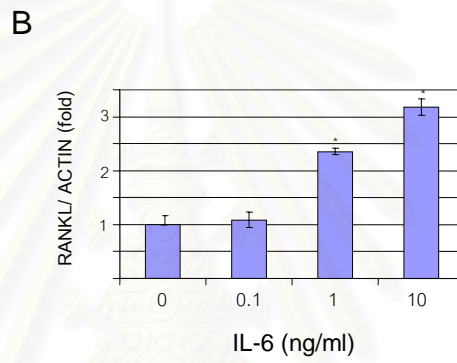
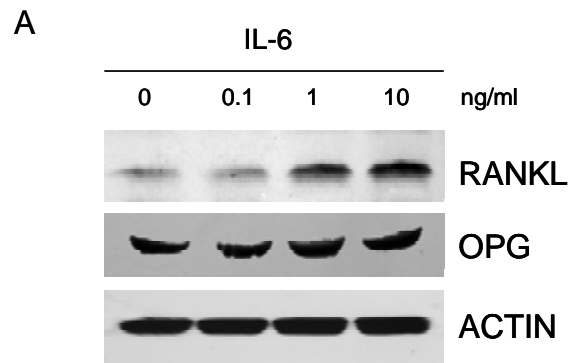
### สรุป

IL-6 สามารถเพิ่มการแสดงออกของ RANKL ได้ โดยไม่มีผลต่อการแสดงออกของ OPG และ M-CSF ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ โดยกลไกการกระตุ้นเกิดผ่าน PI3K นอกจากนี้ การเพิ่ม soluble receptor gp80 ไม่มีผลต่อการเพิ่ม RANKL การที่เซลล์โพรงฟันตอบสนองต่อ IL-6 ได้โดยลำพัง แสดงว่าในภาวะอักเสบซึ่งมีสารหลั่ง IL-6 ในโพรงฟันเพิ่มขึ้นนั้น IL-6 น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาททำให้เกิดการทำลายเนื้อฟันจากภายในโพรงฟัน รวมทั้งในคลองรากฟัน โดยกระตุ้นให้เกิดการเสียสมดุลของระบบ RANK/RANKL/OPG

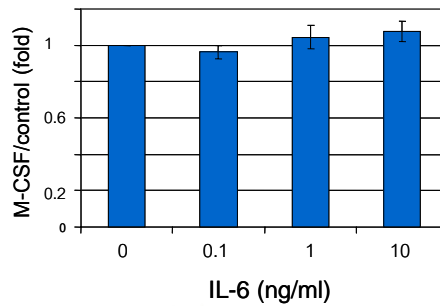


**รูปที่ 1** เซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วย IL-6 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดอาร์เอ็นเอและวิเคราะห์ด้วย RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RANKL, OPG, M-CSF โดยใช้การแสดงออกของ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน (A) กราฟในรูป B แสดงความเข้มที่อ่านได้ของ RANKL และ OPG หารต่อ GAPDH จากรูป A \* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



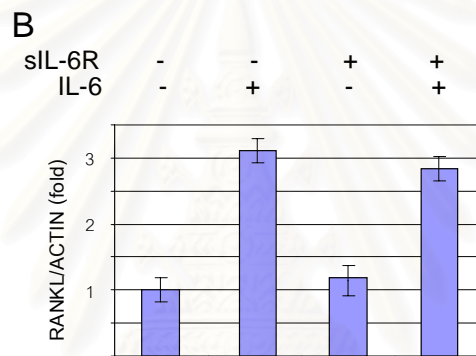
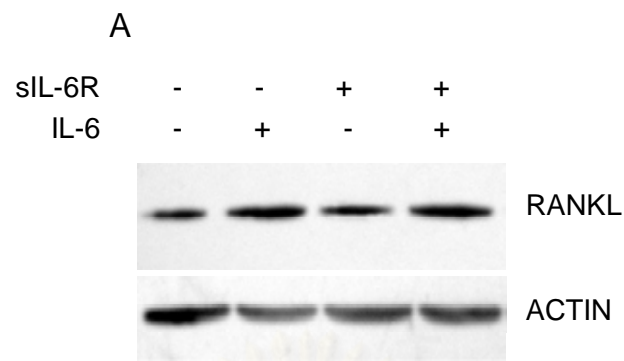


D



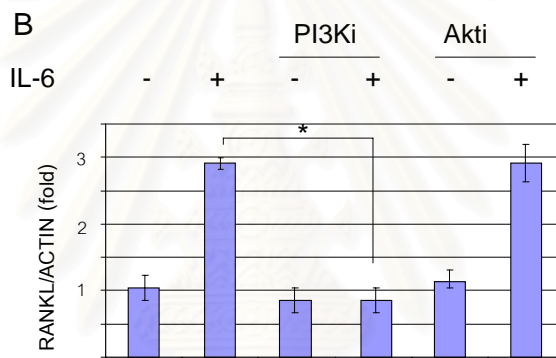
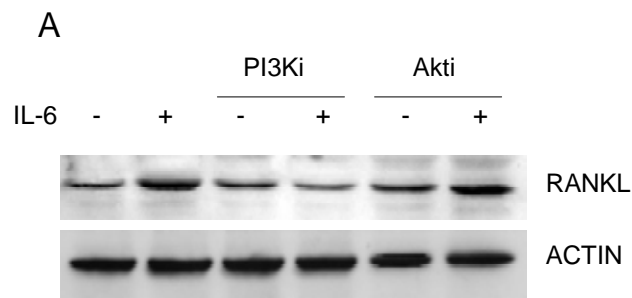
รูปที่ 2 เซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วย IL-6 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ RANKL และ OPG ด้วย Western blot analyses โดยใช้ Actin เป็นตัวควบคุมภายใน (A) กราฟในรูป B และ C แสดงความเข้มที่อ่านได้ของ RANKL และ OPG หารต่อ Actin \* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) กราฟในรูป D แสดงปริมาณของ M-CSF ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อวิเคราะห์ด้วย ELISA

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot analyses แสดงให้เห็นผลการกระตุ้นเซลล์โพรงฟันด้วย IL-6 (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โดยลำพัง หรือร่วมกับ sIL-6R (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) กราฟในรูป B แสดงความเข้มของแถบโปรตีน RANKL เทียบต่อ Actin ที่เท่ากัน - ไม่ได้ใส่สารที่ต้องการทดสอบ + ใส่สารที่ต้องการทดสอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot analyses แสดงให้เห็นผลการกระตุ้นเซลล์โพรงฟันด้วย IL-6 (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โดยลำพัง หรือร่วมกับ PI3K inhibitor (PI3Ki, 1.4 ไมโครโมลาร์) หรือ Akt inhibitor (Akti 5 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) กราฟในรูป B แสดงความเข้มของแถบโปรตีน RANKL เทียบต่อ Actin ที่เท่ากัน - ไม่ได้กระตุ้นด้วย IL-6, + กระตุ้นด้วย IL-6 \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

## เอกสารอ้างอิง

- Barclay C. Root resorption2: Internal root resorption. *Dent Update* 1993;7:292-4.
- Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:26-7.
- Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. IL-1-induced receptor activator of NF-kappa B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. *Bone* 2005;36:267-75.
- Giuliani N, Colla S, Morandi F, Rizzoli V. The RANK/RANK ligand system is involved in interleukin-6 and interleukin-11 up-regulation by human myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2004;89:1118-23.
- Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41:1232-9.
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-303.
- Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Takahashi N, Suda T. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 1996;1378:2187-90.
- Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasaki A. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* 1991;173:1291-4.
- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E2 signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kB (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 2005;146:1991-8.

- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:225-33.
- Lowik CW, van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA, Papapoulos SE. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:1546-52.
- Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992;4:96-100.
- Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulation of interleukin-6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from *Lactobacillus casei*. *J Endod*. 1998;24:252-5.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275:768-75.
- Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002;169:3353-62.
- Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27:1229-41.
- Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 1994;300:281-90.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D,

- Pattison W, Campbell P, Boyle WJ, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89:309-19.
- Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 1997;6:929-55.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-57.
- Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsug Y, Kumaki K, Taga T. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11924-8.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-37.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

