ผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเดนทีนเมทริกซ์โปรทีน 1 (Dentin matrix protein 1)ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

นางสาว พีชณิการ์ หล้าดวงดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2043-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I22486820

EFFECT OF POLYSACCHARIDE OF ALOE VERA GEL EXTRACT ON THE PROLIFERATION AND EXPRESSION OF DENTIN MATRIX PROTEIN 1 mRNA OF HUMAN PULPAL FIBROBLASTS

Miss Pechanika Lardungdee

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pediatric Dentistry

Department of Pediatric Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic year 2005

ISBN 974-53-2043-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเดนทีนเมทริกซ์โปรทีน1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์
โดย	นางสาว พีชณิการ์ หล้าดวงดี
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง พรพรรณ อัศวาณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ฐิติมา ภู่ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สมหมาย ชอบอิสระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง พรพรรณ อัศวาณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. มโน คูรัตน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. บุษยรัตน์ สันติวงศ์)

พีชณิการ์ หล้าดวงดี: ผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเดนทีนเมทริกซ์โปรทีน1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์. (EFFECT OF POLYSACCHARIDE OF ALOE VERA GEL EXTRACT ON THE PROLIFERATION AND EXPRESSION OF DENTIN MATRIX PROTEIN 1 mRNA OF HUMAN PULPAL FIBROBLASTS) อ.ที่ปรึกษา : อ. ทพญ. พรพรรณ อัศวาณิชย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ทพ. ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล, 59 หน้า. ISBN 974-53-2043-9

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์และการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเดนทีนเมทริกซ์โปรทีน1 (DMP1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยเซลล์ถูกทดสอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดี เอ็ม อี เอ็ม ที่ปราศจากซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค เอ็ม ที ที และวิเคราะห์ผลการศึกษาของทุกกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สถิติการทดสอบชนิดไม่ใช่พาราเมตริก วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียวชนิด Kruskal-Wallis ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นใช้โพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งพบว่าเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบกับเซลล์เพื่อศึกษาการแสดงออก ของอาร์เอ็นเอนำรหัสยีน DMP1 ด้วยเทคนิค อาร์ ที - พี ซี อาร์ และวิเคราะห์ความเข้มของแถบการแสดงออกของยีน และนำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยสถิติทดสอบแบบที (one sample t-test)

ผลการศึกษาพบว่าสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1 เพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP1 2.76 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ดังนั้นสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อาจส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างเส้นใยไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันได้

ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4676116432 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY

KEY WORD: ALOE VERA / HUMAN PULPAL FIBROBLAST/ DMP1/ MTT/ RT-PCR

PECHANIKA LARDUNGDEE : EFFECT OF POLYSACCHARIDE OF ALOE VERA GEL EXTRACT ON THE PROLIFERATION AND EXPRESSION OF DENTIN MATRIX PROTEIN 1 mRNA OF HUMAN PULPAL FIBROBLASTS.

THESIS ADVISOR : PORNPUN ASVANIT, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. DR. PSUTHA THUNYAKITPISAL, 59 pp. ISBN 974-53-2043-9.

The purposes of this study were to investigate the effect of polysaccharide extract from aloe vera gel on the proliferation and expression of DMP1 mRNA of human pulpal fibroblasts. The human pulpal fibroblasts were treated with polysaccharide at concentration of 0 0.25 0.5 1 2 and 4 mg/ml in serum free DMEM for 24 hours. The amount of cells were investigated by using MTT assay. The statistical significance of differences among control and treated groups were tested by non-paramertic Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance. The levels of DMP1 mRNA expression were measured by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The density of bands was quantified by computerized image processing program. The statistical significance of differences among control and treated groups were analyzed by one sample t-test.

It was found that polysaccharide from aloe vera gel extract slightly induce proliferation of human pulpal fibroblasts but not significantly as compared to the control group ($p>0.05$). However, 0.5 mg/ml of the polysaccharide significantly enhanced expression of DMP1 mRNA level up to 2.76 fold as compared to the control group ($p<0.05$) . These results suggest that polysaccharide extracted from aloe vera gel could be the agent used to induce human pulpal fibroblast proliferation and differentiation into odontoblast-like cells.

Department Pediatric Dentistry Student's signature.....

Field of study Pediatric Dentistry Advisor's signature.....

Academic year 2005 Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ. ทพญ. พรพรรณ อัศวาณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. ทพ. ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ การสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ การวิเคราะห์ด้วยสารเอ็ม ที ที และเทคนิคการทำอาร์ ที – พี ซี อาร์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ทพ. สมหมาย ชอบอิสระ ผศ. ทพ. ดร. มโน คูรัตน์ ผศ. ทพญ. ดร. บุษยรัตน์ สันติวงศ์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ อาจารย์ไพพรรณ พิทยานนท์ ที่ให้คำปรึกษาทางสถิติ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน ทพญ. นวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์ ทพญ. สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ และ คุณผกาวัลย์ มูสิกพงศ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลืออย่างดียิ่งเสมอมาในกระบวนการศึกษาทดลอง

ขอขอบพระคุณผู้ป่วยทุกท่านที่อุทิศฟันสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก ภาควิชาชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และให้ใช้สถานที่ในการศึกษาตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกมาโดยตลอด เจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา ที่ให้ความสะดวกในการจัดทำเอกสารต่างๆ ขอขอบคุณ ทพ. บุญชัย โภครุ่ง สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในการสืบค้นข้อมูล ขอบพระคุณเพื่อนผู้ร่วมเรียนรู้ทางวิชาการสาขาทันตกรรมสำหรับเด็กทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจอันมีค่ายิ่ง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอแสดงความระลึกถึงในพระคุณของบิดามารดา ผู้ซึ่งให้ความรัก สนับสนุน และเห็นความสำคัญของการศึกษาของผู้วิจัยมาโดยตลอด ประโยชน์และคุณค่าจากงานวิจัยครั้งนี้ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งที่ปรากฏและไม่ปรากฏนามที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่ 1 บทนำ.....1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

คำถามการวิจัย.....4

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....4

ขอบเขตการวิจัย.....5

รูปแบบการวิจัย.....5

ข้อจำกัดของการวิจัย.....5

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....6

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....7

ประวัติความเป็นมาของว่านหางจระเข้.....7

คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์.....9

สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้.....12

การนำว่านหางจระเข้มาใช้ในทางทันตกรรม.....12

กระบวนการสร้างเนื้อฟัน.....13

บทบาทของDMP1ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟัน.....14

กระบวนการตรวจสอบความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนเซลล์.....16

กระบวนการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารที่ทดสอบ
ด้วยการใช้สารเอ็ม ที ที.....17

กระบวนการตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนด้วยเทคนิค
อาร์ ที – พี ซี อาร์ 18

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....20
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....20
วัสดุอุปกรณ์และสารที่ใช้ในการศึกษา.....20
ระเบียบวิธีการวิจัย.....22
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....28
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล.....31
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา การอภิปราย และข้อเสนอแนะ.....43
รายการอ้างอิง.....49
ภาคผนวก.....55
ผลพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย.....56
ข้อมูลสำหรับผู้ป่วยและใบยินยอมมอบฟันเพื่อใช้ในการศึกษา.....57
ภาพเซลล์สร้างเส้นใยรุ่นแรกที่คลานออกมาจากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....58
ภาพเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....59

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับของนิวคลีโอไทด์ไพร์มเมอร์ของยีน GAPDH และ DMP1.....28

ตารางที่ 2 ปริมาณร้อยละของตัวอย่างที่ 1เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ม ที ที....32

ตารางที่ 3 ปริมาณร้อยละของตัวอย่างที่ 2 เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ม ที ที...33

ตารางที่ 4 ปริมาณร้อยละของตัวอย่างที่ 3 เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ม ที ที...34

ตารางที่ 5 ปริมาณร้อยละของเซลล์เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ม ที ที.....37

ตารางที่ 6 การแสดงออกของยีนDMP1เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์ ที – พี ซี อาร์.....41

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเอ็ม ที ที.แยกกลุ่มตัวอย่าง.....36
ภาพที่ 2 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเอ็ม ที ที.....38
ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อาร์ ที- พีซีอาร์.....40
ภาพที่ 4 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์ ที – พี ซี อาร์.....42
ภาพที่ 5 เซลล์สร้างเส้นใยรุ่นแรกที่คลานออกมาจากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....58
ภาพที่ 6 เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน 58