

บทบาทของไมโทเจน-แอกทีเวเตดโปรตีนไคเนส ต่อการแสดงออกของเดินทีนไซเอโลฟอสโฟ

โปรตีนในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยอะซีทีแมนแนน

นางสาววิสากานต์ บุญไพศาลเสรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดครินต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

The Role of Mitogen Activated Protein Kinase in Dentine sialophosphoprotein  
Expression in Human Dental Pulp Cell Stimulated with Acemannan

Miss Wisakarn Boonpaisanseree

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Endodontology

Department of Operative Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	บทบาทของไมโทเจน-แอกทีเวเตดโปรตีนไคเนส ต่อการ แสดงออกของเดินทีนไซเคิลฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เนื้อเยื่อ ในฟันของมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยอะซีแมนแนน
โดย	นางสาววิสากานต์ บุญไพศาลเสรี
สาขาวิชา	วิทยาเอ็นโดครินต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ขวัญตา จารุอำพรพรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหาร  
รักษาการแทนคณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ พิเชียร อัจฉรินทร์เพ็ญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ทันตแพทย์ ดร.ไพโรจน์ หลินศุวนนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ขวัญตา จารุอำพรพรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สิทธิชัย ชุนทองแก้ว)

วีสากานต์ บุญไพศาลเสรี : บทบาทของไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคนเนสต่อการแสดงออกของเด็นทีนไฮเอิลโฟสโฟโปรตีนในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยอะซีแมนแนน (The Role of Mitogen Activated Protein Kinase in Dentine sialophosphoprotein Expression in Human Dental Pulp Cell Stimulated with Acemannan) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ทพญ.ขวัญตา จารุอำพรพรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ทพ.ดร. พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล, 40 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเด็นทีนไฮเอิลโฟสโฟโปรตีน ในเซลล์เนื้อเยื่อใน ผ่านระดับวิถีส่งสัญญาณไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคนเนส โดยเซลล์เนื้อเยื่อในจะถูกทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน จากนั้นทำการตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของยีนเด็นทีนไฮเอิลโฟสโฟโปรตีนด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ และกระบวนการส่งสัญญาณผ่านวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดจะทำการใส่และไม่ใส่สารยับยั้งเฉพาะได้แก่ U0126 (ERK inhibitor) SP600125 (JNK inhibitor) และSB203580 (p38MAPK inhibitor) โดยจะทำการตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์นบอต จากการศึกษาพบว่าสารอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเด็นทีนไฮเอิลโฟสโฟโปรตีน ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นให้เกิดการเติมกลุ่มฟอสเฟตสูงสุดของ ERK1/2 JNK และ p38 MAPK ในช่วง 45 15 และ 15 นาที โดยเพิ่มขึ้นเป็น  $1.64 \pm 0.6$   $2.75 \pm 0.16$  และ  $3.11 \pm 0.09$  เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ การใส่สารยับยั้งเฉพาะได้แก่ U0126, SP600125 และ SB203580 ก่อนทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน มีผลยับยั้งการเหนี่ยวนำการเติมกลุ่มฟอสเฟตของโปรตีนผ่านทาง ERK1/2, JNK และ p38 MAPK ที่ระดับ 86 46 และ 51 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสารอะซีแมนแนนกระตุ้นการแสดงออกของยีนเด็นทีนไฮเอิลโฟสโฟโปรตีน และเกี่ยวข้องกับวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคนเนส

ภาควิชา..พันธุกรรมหัตถการ .....ลายมือชื่อ.....  
 สาขาวิชา.วิทยาเอ็นโดครินต์ .....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา .....2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

# #5276131732 : MAJOR ENDODONTOLOGY

KEYWORDS : Acemannan , *Aloe vera*, Human dental pulp tissue, DSPP, MAPK

WISAKARN BOONPAISANSEREE : THE ROLE OF MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE IN DENTINE SIALOPHOSPHOPROTEIN IN EXPRESSION IN HUMAN DENTAL PULP CELL STIMULATED WITH ACEMANNAN. ADVISOR : ASSOC. PROF. KWANTA JARU-AMPORN PAN, CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PASUTHA THUNYAKITPISAL, 40 pp.

### Abstract

In this study, effect of acemannan on dentine sialophosphoprotein expression in human dental pulp cell via mitogen activated protein kinase (MAPK) signal pathway were investigated. Primary human dental pulp fibroblasts were treated with acemannan. The expression of DSPP mRNA was determined by Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique. The phosphorylation of MAPK, with and without specific MAPK inhibitor namely U0126(ERK inhibitor), SP600125(JNK inhibitor) and SB203580 (p38MAPK inhibitor), were determined by western blot analysis. Acemannan, at 4 mg/ml, significantly stimulated DSPP mRNA expression. Treated with acemannan, the phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 MAPK were reached maximum level at 45, 15 and 15 minutes of incubation, respectively. At these times of incubation, acemannan stimulated phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 MAPK up to  $1.64 \pm 0.6$ ,  $2.75 \pm 0.16$  and  $3.11 \pm 0.09$  fold compared with the untreated group, respectively. Pretreated with specific inhibitors of MAPK (U0126, SP600125 and SB203580) resulted in 86, 46 and 51 percentage reduction of the phosphorylation levels of ERK1/2, JNK and p38 MAPK, respectively, compared with these of acemannan-treated group. In conclusion, with this study, acemannan was able to enhance the DSPP mRNA expression in human dental pulp cells and involved with MAPK signaling pathway.

Department : Operative Dentistry

Student's Signature .....

Field of Study : Endodontology

Advisor's Signature .....

Academic Year : 2011 .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ทพญ.ขวัญฤตา จารุอำพรพรพรณ และรศ.ทพ.ดร. พสุธา รัญญะกิจไพศาล ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบต้นฉบับแก้ไขปรับปรุง ตลอดจนแนะนำวิธีในการพัฒนางานวิจัย สำนวนการใช้ภาษาในการเขียน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย อ.ทพ.ดร.ไพโรจน์ หลินสุวรรณนท์ ที่เป็นประธานควบคุมวิทยานิพนธ์ ศ.ทพ.ดร.สิทธิชัย ขุนทองแก้ว ที่เป็นกรรมการคุมสอบวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ อีกทั้งยังสอบถามและให้แง่คิดในการทำวิจัยตลอดมา ขอขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมหัตถการสาขาวิชาเอ็นโดดอนต์ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ทางวิชาการให้แก่ผู้วิจัยจนประสบผลสำเร็จในการศึกษา ขอขอบคุณหน่วยวิจัยและบัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ในการทำวิจัย อีกทั้งขอขอบพระคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนส่งเสริมวิจัยเงินกองทุนเพื่อการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2554 ให้แก่ผู้วิจัย

สุดท้ายวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยจากความช่วยเหลือและกำลังใจจากหลายๆท่าน ขอขอบคุณคุณคุณแพพงา มณฑนะพิศุทธิ., คุณนภาพร พัฒนาเจริญชัย นักวิทยาศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยแนะนำ และสอนการทำวิจัยในแบบต่าง ๆ ขอขอบคุณ ทพญ.กมลพรพรณ ภัคดี ที่คอยให้กำลังใจและคอยตรวจบทความภาษาอังกฤษ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และที่สำคัญคือคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดเวลาจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
คำสำคัญ.....	2
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
แนวคิดและทฤษฎี.....	3
เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อใน.....	3
กลไกที่สำคัญต่อการสร้างเนื้อเยื่อซ่อมเสริม.....	6
การแปรสภาพของเซลล์ต่อการส่งสัญญาณผ่านวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตด โปรตีนไคเนส.....	8
ความสำคัญในทางการแพทย์และทันตแพทย์ของว่านหางจระเข้.....	10

	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
ตัวอย่าง.....	12
ตัวแปรในการทดลอง.....	12
วิธีการดำเนินการ.....	12
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	15
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	16
5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	26
อภิปรายผลการวิจัย.....	26
สรุปผลการวิจัย.....	28
ข้อเสนอแนะ.....	29
รายการอ้างอิง.....	30
ภาคผนวก.....	36
ภาคผนวก ก.แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารอะซีแมนแนนต่อ เกิดปฏิกิริยาของ ERK1/2.....	37
ภาคผนวก ข.แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารอะซีแมนแนนต่อ เกิดปฏิกิริยาของ JNKs.....	38
ภาคผนวก ค.แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารอะซีแมนแนนต่อ เกิดปฏิกิริยาของ p38MAPK.....	39
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	40



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลำดับเบสของยีนดีเอสพีพี และGADPH.....	14

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างยีนดีเอสพีพี.....	5
2	แสดงวิธีการส่งสัญญาณของไมโทเจน-แอกทีเวเตดโปรตีนไคเนส.....	9
3	แสดงการสรุปขั้นตอนการทำงาน.....	15
4	การแสดงผลของยีนดีเอสพีพีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนในเนื้อเยื่อ ในฟันของมนุษย์ โดยวิธีรีเวิร์สทรานส์คริปเทส ( คอลัมน์ 1-6 แสดงถึงกลุ่ม ควบคุม และกลุ่มอะซีแมนแนน ในความเข้มข้นที่ 0.5,1,2,4 และ 8 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ).จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย.....	16
5	แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ของการแสดงผลของยีนดีเอสพีพีที่ถูกกระตุ้น โดยสารอะซีแมนแนน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....	16
6	ผลของสารอะซีแมนแนนต่อระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ ERK 1/2 (คอลัมน์1-5 แสดงระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ p-ERK1/2, ERK1/2 และแอกติน ที่ 5, 15, 30, 45 และ60 นาที)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย.....	17
7	ผลของสารอะซีแมนแนนต่อระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ JNK (คอลัมน์1-5 แสดงระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ p-JNK, JNK และ แอกตินที่ 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย.....	18
8	ผลของสารอะซีแมนแนนต่อระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของp38MAPK (คอลัมน์1-5 แสดงระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ p-p38MAPK, p38 MAPK และแอกตินที่ 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย...	19
9	แสดงการยับยั้งการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ ERK1/2 เมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะ ปริมาณ 10 ไมโครโมลาร์ (U0126) และทำการใส่สารอะซีแมนแนนความ เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีเวสเทินบอต (คอลัมน์ 1-4 แสดงถึงกลุ่ม ควบคุม กลุ่มอะซีแมนแนน กลุ่มที่ใส่ตัวยับยั้งที่ตามด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวยับยั้งเท่านั้น ตามลำดับ)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย.....	20
10	แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์การเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ ERK1/2.....	21

ภาพที่		หน้า
11	แสดงการยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK เมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะปริมาณ 10 ไมโครโมลาร์ (SP600125) และทำการใส่สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีเวสเทินบอต (คอลัมน์ 1-4 แสดงถึงกลุ่มควบคุม กลุ่มอะซีแมนแนน กลุ่มที่ใส่ตัวยับยั้งที่ตามด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวยับยั้งเท่านั้น ตามลำดับ)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย.....	22
12	แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์การเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK.....	23
13	แสดงการยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK เมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะปริมาณ 10 ไมโครโมลาร์ (SB203580) และทำการใส่สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีเวสเทินบอต (คอลัมน์ 1-4 แสดงถึงกลุ่มควบคุม กลุ่มอะซีแมนแนน กลุ่มที่ใส่ตัวยับยั้งที่ตามด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวยับยั้งเท่านั้น ตามลำดับ)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย.....	24
14	แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์การเกิดฟอสโฟริเลชันของ p38 MAPK.....	25
15	แสดงสรุปปฏิริยาการส่งสัญญาณวิถีไมโทเจน-แอกติเวเตดโปรตีนไคนเนสในสารอะซีแมนนต่อการสร้างเนื้อเยื่อฟันซอมเมริม.....	27
16	แสดงแนวคิดวิจัยเพิ่มเติมของปฏิริยาการส่งสัญญาณวิถีไมโทเจน-แอกติเวเตดโปรตีนไคนเนสในสารอะซีแมนนต่อการสร้างเนื้อเยื่อฟันซอมเมริม...	29

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคฟันผุเป็นปัญหาทางทันตกรรมที่สำคัญ และเป็นสาเหตุหลักของการสูญเสียฟัน โดยกระบวนการเกิดฟันผุเกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุจากชั้นเคลือบฟันลุกลามเข้าสู่เนื้อฟัน และเนื้อเยื่อใน ตามลำดับ แต่ในกรณีที่ฟันผุลุกลามจนไม่สามารถควบคุมได้จะนำไปสู่การตายของเนื้อเยื่อใน และก่อพยาธิสภาพรอบปลายรากฟัน จนเกิดการสูญเสียฟันได้ในที่สุด<sup>[1]</sup> เพื่อป้องกันการลุกลาม และคงความมีชีวิตของฟัน ร่างกายจะสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม(reparative dentine) โดยเซลล์สร้างเนื้อฟัน หรือโอโดนต์โตบลาสต์ไลค์เซลล์ (odontoblast like cell) ในบริเวณที่ได้รับอันตราย ซึ่งการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม จะพบโปรตีนที่สำคัญและเป็นเครื่องหมายเฉพาะ (specific marker) ของเนื้อฟัน คือ ดีเอสพีพี (DSPP : dentine sialophosphoprotein)<sup>[2]</sup> ซึ่งจะมีส่วนสำคัญต่อการพอกแร่ธาตุกลับคืนสู่เนื้อฟัน แต่อย่างไรก็ตาม การสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม บางครั้งอาจล่าช้า หรือเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเพื่อป้องกันอันตรายก่อน ที่จะถึงชั้นเนื้อเยื่อใน

ว่านหางจระเข้เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่นการรักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก จากการศึกษาพบสารอะซีแมนแนนซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลแมนนอส และน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ในส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ในทางทันตกรรมได้นำอะซีแมนแนนมาใช้ป้องกันการเกิดการอักเสบของกระดูกงูฟันภายหลังการถอนฟัน<sup>[3]</sup> เรงการหายของบาดแผลที่เพดานปากของหนูทดลอง รวมทั้งสารอะซีแมนแนนยังมีผลเร่งการสร้างเนื้อฟันในฟันกรามหนูแรท<sup>[4]</sup>

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบสารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการสร้างอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของดีเอสพีพี และ ดีเอ็มพี -1 (DMP-1 : dentine matrix protein -1)<sup>[5]</sup> , คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งในเซลล์สร้างเส้นใย<sup>[6]</sup> ถึงแม้จะมีการศึกษาถึงคุณสมบัติที่สำคัญของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อเยื่อซ่อมสร้างของเนื้อฟันและเหงือก แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงกระบวนการส่งสัญญาณสำคัญของสารอะซีแมนแนนที่นำไปสู่การกระตุ้นการแสดงออกของดีเอสพีพีต่อการกระตุ้นการสร้างเนื้อฟันมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาถึงกระบวนการส่งสัญญาณของสารอะซีแมนแนนต่อการกระตุ้นการแสดงออกของดีเอสพีพี ในเซลล์เนื้อเยื่อใน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำมาใช้อธิบายกลไกการทำงานของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันในระดับชีวโมเลกุลต่อไป

### คำถามของการวิจัย (Research Question)

สารอะซีแมนแนน สามารถกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสดีเอสพีพีในเซลล์เนื้อเยื่อใน และเกี่ยวข้องกับวิถีไมโทเจน-แคคทิเวเตดโปรตีนไคเนส หรือไม่

### วัตถุประสงค์(Objective)

เพื่อศึกษากระบวนการส่งสัญญาณของสารอะซีแมนแนนที่มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสดีเอสพีพีของเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์

### สมมติฐาน (Hypothesis)

สารอะซีแมนแนน สามารถกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสดีเอสพีพีของเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ และมีความเกี่ยวข้องกับวิถีไมโทเจนแคคทิเวเตดโปรตีนไคเนส

### ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดลองในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ ที่ไม่มีโรคปริทันต์ และไม่พบฟันผุ ในผู้ป่วยอายุ 16-25 ปี จำนวน 5 ซี่ เพื่อศึกษาถึงกระบวนการส่งสัญญาณวิถีไมโทเจนแคคทิเวเตดโปรตีนไคเนส

### คำสำคัญ (Key words)

สารอะซีแมนแนน (Acemanan) , ว่านหางจระเข้ (Aloe vera) , เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ (human dental pulp cell), ไมโทเจนแคคทิเวเตดโปรตีนไคเนส (MAPK) , เติ้นทีนไซเอิลโฟสโฟโปรตีน (DSPP)

### ข้อจำกัดของงานวิจัย(Limitation of research)

เนื่องจากงานวิจัยเป็นการศึกษาเชิงทดลองโดยเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อใน จำเป็นต้องจำกัดการใช้รุ่นของเซลล์ในการทดลองเพื่อลดการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และพฤติกรรมการแสดงออกของเซลล์

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Benefit of the study)

สามารถนำองค์ความรู้ในเชิงลึกอธิบายถึงกลไกของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมผ่านการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสดีเอสพีพี

### วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

การศึกษานี้เป็นการศึกษากลไกของสารอะซีแมนแนนต่อการกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเคตินทินไซเคโลฟอสโฟโปรตีน ผ่านวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนสในเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ ดังนั้นการทบทวนวรรณกรรมจะเป็นเรื่องเกี่ยวข้องกับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อใน กลไกที่สำคัญต่อการสร้างเนื้อเยื่อฟันซ่อมเสริม การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต่อการส่งสัญญาณผ่านวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนส และความสำคัญในทางการแพทย์ และทันตแพทย์ของว่านหางจระเข้

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### 1. เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อใน

เนื้อเยื่อในเป็นเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจากเอกโตมีเซนไคลล์มอลเซลล์ (Ectomesenchymal cell) โดยประกอบด้วย เส้นประสาท หลอดเลือด เซลล์ภูมิคุ้มกัน เซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblast) , เนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue) และ เมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix)

1.1 เซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblast) เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเอกโตมีเซนไคลล์มอลเซลล์ที่พัฒนาเป็นปุ่มเนื้อกำเนิดฟัน (dental papilla) โดยมีบทบาทสำคัญในการสร้างเนื้อฟันทั้งในระยะเวลาการสร้างฟัน และระยะเวลาการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม ซึ่งจะมีการเรียงตัวเป็นแถวชิดกับชั้นปริเดนทิน (predentin) โดยจำนวนเซลล์จะสัมพันธ์กับจำนวนของท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) ซึ่งจะพบเซลล์จำนวนมากที่บริเวณส่วนตัวฟัน และลดลงในส่วนของรากฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟันจะสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ ได้แก่ เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) โปรทีโอไกลแคน (proteoglycan) และกลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (NCPs : non-collagenous proteins) ได้แก่ ดีเอสพี (DSP : dentin sialoprotein) และ ดีพีพี (DPP : dentin phosphoprotein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเนื้อฟัน แต่มีรายงานการแสดงออกของดีเอสพี และ ดีพีพี ในกระดูกซึ่งพบมีปริมาณที่ต่ำกว่าที่พบในเนื้อฟันประมาณ 400 เท่าโดยมวล<sup>[2]</sup>

1.2 เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เป็นเซลล์พบมากที่สุดของเนื้อเยื่อในฟัน พบเซลล์สามารถแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์อื่น เช่น โอดอนโตโบลาสต์ไลท์เซลล์ คาดว่าเซลล์สร้างเส้นใยทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อใน และเนื้อฟัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งและสาม ดังนั้นเมื่อเกิด

อันตรายต่อโพรงฟัน เซลล์สร้างเส้นใยจะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนสภาพเป็นโอดอนโตโอบลาสต์ไลท์เซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำงานคล้ายกับเซลล์สร้างเนื้อฟันและมีส่วนสำคัญต่อขบวนการซ่อมสร้างเนื้อฟัน<sup>[7]</sup>

1.3 เซลล์ภูมิคุ้มกัน (Immunocompetence cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อใน ได้แก่ แมกโครเฟจ (macrophage), เซลล์ใยประสาทนำเข้า (dendritic cell), แมสต์เซลล์ (mast cell) และ พลาสมาเซลล์ (plasma cell)

1.3.1 แมกโครเฟจ (macrophage) เป็นโมโนไซต์ที่อยู่ในกระแสเลือดและเนื้อเยื่อ มีหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่แมกโครเฟจกลืนเข้าไปจะถูกทำลายโดยไลโซโซมอลเอนไซม์ (lysosomal enzyme) อีกทั้งช่วยในการนำเสนอแอนติเจนต่อเม็มโมรีทีเซลล์ (CD<sub>4</sub> T-cell)

1.3.2 เซลล์ใยประสาทนำเข้า (Dendritic cell) เป็นเซลล์ชนิดเดียวกับแลงเกอร์ฮานเซลล์ (Langerhans cell) ในผิวหนังชั้นนอกสุด (epidermis) โดยพบใน lymphoid tissue และในเนื้อเยื่อยึดต่อ รวมถึงเนื้อเยื่อใน เซลล์ใยประสาทนำเข้าเป็น antigen presenting cell ที่มีบทบาทสำคัญในภูมิคุ้มกันแบบ T-cell dependent immunity คล้ายแมกโครเฟจ

1.3.3 แมสต์เซลล์ (mast cell) เป็นเซลล์ที่พบตามทางผ่านของหลอดเลือดในส่วนของโพรงเนื้อเยื่อใน ส่วนบน โดยจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเนื้อเยื่อในเกิดการอักเสบ

1.3.4 พลาสมาเซลล์ (plasma cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี โดยจะพบมากระหว่างมีการอักเสบเรื้อรังของเนื้อเยื่อใน

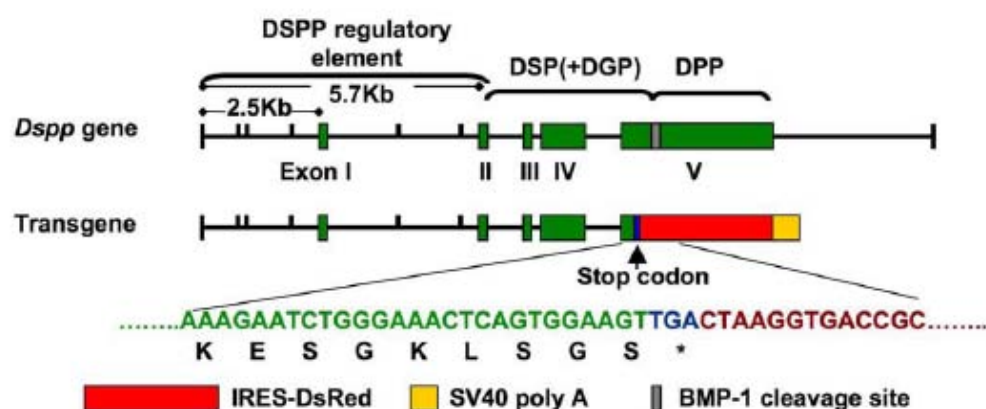
1.4 เมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประกอบไปด้วยเซลล์เส้นใย และเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนได้แก่

1.4.1 เส้นใย (Fiber) ประกอบด้วย คอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง และสาม เป็นส่วนใหญ่ โดยมีการเรียงตัวเป็นร่างแหกระจายทั่วไป คอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง จะเป็นโปรตีนหลักที่ผลิตโดยเซลล์สร้างเนื้อฟันที่ถูกปล่อยออกมาสู่ extracellular space ที่บริเวณด้านที่ติดกับพีรีเดนทีน สำหรับ คอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง และสาม จะสังเคราะห์จากเซลล์สร้างเส้นใย และมีจำนวนมากที่สุดที่พบในโพรงเนื้อเยื่อใน เมื่ออายุมากขึ้นคอลลาเจนทั้งหมดจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และรวมตัวกันเป็นมัดเส้นใย (fiber bundles) โดยพบมากที่สุดที่บริเวณส่วนปลายของเนื้อเยื่อใน

1.4.2 สารระหว่างเซลล์ (Ground substance) มีหน้าที่ช่วยพยุงเซลล์ และเป็นตัวกลางในการขนส่งสารอาหารจากเลือดไปยังเซลล์ และจากเซลล์กลับเข้ามาในหลอดเลือด โดยสารระหว่างเซลล์ ประกอบด้วย โปรทีโอไกลแคน ไกลโคซามิโนไกลแคน ฟอสโฟโปรตีน และ

โปรตีนอาร์คาร์บอกซีกลูตามีน (r-carboxy glutamine – containing protein) โดยจะถูกสังเคราะห์และปล่อยออกมาจากเซลล์สร้างเนื้อฟัน

สำหรับกลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช้คอลลาเจนเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ ที่สำคัญต่อการสร้างเนื้อฟันซึ่งประกอบด้วย โปรตีนโอไกลแคน ไฟโบรเนกติน และ ดีเอสพีพี ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช้คอลลาเจนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟัน โดย ดีเอสพีพี จะถูกถ่ายสัญญาณและแปลสัญญาณเป็น ดีเอสพี และ ดีพีพี (หรือที่เรียกว่า phosphophoryn)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างยีนดีเอสพีพี<sup>[8]</sup>

ดีพีพี ถูกค้นพบโดย Veis และคณะ ซึ่งสกัดได้จาก dentin extracellular matrix เกิดจากการหลั่งของเซลล์สร้างเนื้อฟันในช่วงการสะสมแร่ธาตุในส่วนของ predentin-dentin border (mineralization front) โดยจะพบปริมาณ 50% ของกลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช้คอลลาเจน ดีเอสพีพี มีความสามารถในการจับกับแคลเซียมและ กระตุ้นการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite crystallite) เมื่อได้จับร่วมกับเส้นใยคอลลาเจน ที่ gap region <sup>[8-11]</sup>

ดีเอสพีพี พบว่ามีระดับคาร์โบไฮเดรตสูง และมีส่วนของกรดซาลิไซลิก โดยพบว่ามีปริมาณ 5-8% ของกลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช้คอลลาเจนของเนื้อฟันซึ่งน้อยกว่าดีพีพี และหลังที่ขึ้นพีรีเดนทีน<sup>[12]</sup>

จากการศึกษาถึงความสามารถในการสะสมแร่ธาตุของเซลล์เนื้อเยื่อใน และเครื่องหมายมีความเฉพาะเจาะจงต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดยศึกษาถึงการแสดงออกของ ดีเอสพีพี และ ALP activity ในเซลล์เนื้อเยื่อใน พบว่าจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และสูงสุดที่ 21วัน<sup>[13]</sup> ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ดีเอสพีพี เป็นตัวควบคุมที่สำคัญต่อการคืนแร่ธาตุกลับของเนื้อฟันในเซลล์เนื้อเยื่อใน โดย ดีเอสพีพี จะมีความสำคัญในการควบคุมการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟันในระยะเริ่มต้น ขณะที่ ดีพีพี เกี่ยวข้องกับการคืนกลับของแร่ธาตุในเนื้อฟันที่สมบูรณ์<sup>[2, 8, 14]</sup> แต่ในกรณีที่เกิดความผิดปกติของวิถีอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของดีเอสพีพี จะทำให้เกิดความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟัน จาก



การศึกษาในมนุษย์ และสัตว์ทดลองพบว่าการเกิดความผิดปกติของวิถีอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของดีเอ็นเอพีพี จะทำให้เกิดเนื้อฟันกำเนิดไม่สมบูรณ์ชนิดที่ สองและสาม (Dentinogenesis Imperfecta type II, III )และ ภาวะเนื้อฟันเจริญผิดปกติชนิดที่ 2 และ 3 (Dentin Dysplasia type II, III) <sup>[15-18]</sup> ซึ่งจะส่งผลต่อความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟัน

## 2. กลไกที่สำคัญต่อการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม

การซ่อมเสริมเนื้อฟัน เริ่มต้นเมื่อมีการกำจัดเซลล์ที่ตายโดยแมกโครเฟจ และทำการสร้างคอลลาเจน ที่เป็นกระบวนการสำคัญต่อการเกิดการซ่อมสร้าง เนื่องจากหลอดเลือดจะนำเอาเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิดต่างๆ เข้ามายังบริเวณที่ได้รับอันตราย และนำเซลล์สร้างเส้นใยรวมถึงสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์คอลลาเจน แต่เนื่องจากเนื้อเยื่อในไม่มี collateral circulation ทำให้การซ่อมสร้างดีไม่เท่ากับเนื้อเยื่ออื่น ดังนั้นการมีเซลล์จำนวนมากในฟันที่ปลายรากเปิด จะทำให้เกิดการหายได้ดีกว่า โดยเนื้อฟันที่ถูกสร้างเมื่อเกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน จะเกิดการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin) โดย Goldberg และ Smith <sup>[19]</sup> ได้ให้คำนิยามการสร้างเนื้อฟันชนิดต่าง ๆ ดังนี้

2.1 เนื้อฟันปฐมภูมิ (Primary dentine) เป็นการสร้างเนื้อฟันในช่วงที่ฟันมีการพัฒนาการสร้างส่วนตัวฟันและรากฟัน โดยส่วนนอกจะมีลักษณะบางและในส่วนที่ใกล้กับ amelo-dentinal junction จะมีเซลล์สร้างเนื้อฟันอยู่ในท่อเนื้อฟัน

2.2 เนื้อฟันทุติยภูมิ (Secondary dentin) สร้างขึ้นหลังจากฟันขึ้นในช่องปาก โดยจะมีการสร้างรอบเนื้อเยื่อในอย่างช้าๆ ตลอดชีวิตของฟันขึ้นนั้น การตอบสนองจะทำให้ภายในโพรงฟันแคลบง(calcification) ซึ่งเป็นลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological) มากกว่าทางพยาธิวิทยา (pathological)

2.3 เนื้อฟันตติยภูมิ (Tertiary dentin) จะหลังเมื่อมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นภายนอก เช่น ฟันผุ การสึกของฟัน เพื่อเป็นการปกป้องเนื้อเยื่อในจากภัยอันตรายภายนอก โดยการตอบสนองต่อสิ่งอันตรายที่ไม่รุนแรงมากจะมีการสร้างเนื้อฟันจากเซลล์สร้างเนื้อฟันที่ยังมีชีวิตอยู่เพื่อทำการเนื้อฟันซ่อมเสริม เรียกว่า Reactionary dentine ในตรงข้ามเมื่อได้รับอันตรายจากสิ่งกระตุ้นภายนอกในระดับรุนแรง เมื่อเซลล์สร้างเนื้อฟันเกิดการตาย โอโดนต์โตบลาสต์ไลท์เซลล์จะทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมแทน เรียกการสร้างนี้ว่า Reparative dentine ซึ่งจะทำการสร้างเนื้อต่อท่อเนื้อฟันที่ติดกับบริเวณที่ได้รับอันตรายเท่านั้น

Dramon RD. และคณะ รายงานการเตรียมโพรงฟันในการอุดฟัน ไม่ได้ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์สร้างเนื้อฟัน หรือทำให้เกิดการสร้าง reparative dentin ยกเว้นกรณีโพรงฟันลึกมาก ดังนั้น เนื้อฟันซ่อมเสริม น่าจะสร้างจาก โอโดนต์โตบลาสต์ไลท์เซลล์ โดยเมื่อเกิดการทำลายเซลล์

สร้างเนื้อฟันจะทำให้เกิด mitotic activity ของเซลล์สร้างเส้นใย ใน cell rich zone และเซลล์ที่แบ่งตัวออกมาจะไปแทนที่เซลล์สร้างเนื้อฟันเดิมที่ถูกทำลาย<sup>[20]</sup>

กระบวนการซ่อมสร้างของเนื้อเยื่อในนอกจากจำเป็นต้องอาศัยเซลล์สร้างเนื้อฟัน และเมทริกซ์นอกเซลล์เพื่อให้เกิดการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมแล้วยังต้องอาศัย growth factors ในการช่วยส่งสัญญาณเมื่อเกิดอันตรายต่อเซลล์ก่อนทำการซ่อมสร้างส่วนต่าง ๆ โดย growth factor จะทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์แล้วกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ growth factor ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ได้แก่ บีเอ็มพี (BMPs : Bone morphogenic proteins) ซึ่งเป็น growth factor ที่อยู่ในกลุ่มของทีจีเอฟเบต้า (TGF- $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$  superfamily) โดยพบว่า บีเอ็มพี -2 เป็น cytokine ที่ควบคุม epithelial-mesenchymal interaction และการแสดงออกของ primary enamel knot<sup>[21]</sup> อีกทั้งยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูก และฟัน ผ่านทาง serine /Threonine kinase receptor โดยเกิดฟอสโฟริเลชันผ่านทาง Smad pathway (canonical BMP pathway) และวิถีส่งสัญญาณอื่น ๆ (non-canonical pathway) ได้<sup>[22]</sup> พบว่า บีเอ็มพี -2 มีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาของฟันโดยสามารถส่งสัญญาณควบคุมการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี ระหว่างการพัฒนาของฟัน จากการศึกษาพบความสัมพันธ์ของบีเอ็มพี-2 และการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี โดยพบว่า บีเอ็มพี -2 จะเกิดการหลั่งในช่วง bell stage ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับการพัฒนาการสร้างเนื้อฟัน และจะมีจำนวนมากขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างเนื้อฟัน รวมถึงกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ ดีเอสพีพี<sup>[23]</sup> จะเห็นได้ว่า บีเอ็มพี -2 เป็น growth factor ที่สำคัญต่อการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างเนื้อฟัน อีกทั้งมีความสัมพันธ์ต่อการแสดงออกของเดินทีนไซโซโลฟอสโฟโปรตีน ในการสร้างเนื้อฟันอีกด้วย<sup>[24]</sup>

นอกจากการแสดงออกของวิถีอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของดีเอสพีพี ที่เกิดจากการกระตุ้นของ บีเอ็มพี จากการศึกษาผ่านวิถีต่างๆแล้วกระบวนการสร้างโปรตีนที่เกิดขึ้นจำเป็นต้องอาศัย transcription factor ในการยึดเกาะกับสายดีเอ็นเอ เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอเข้ารหัส และโปรตีนต่อไป จากการศึกษาพบ NF- $\kappa$ B และ RunX2<sup>[25]</sup>มีส่วนสำคัญต่อการแสดงออกของ ดีเอสพีพี ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อการสะสมแร่ธาตุในการสร้างเนื้อฟัน

แต่อย่างไรก็ตามการใช้ growth factor ในการทำการปิดแผลเนื้อเยื่อใน (pulp capping) โดยตรงเพื่อให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเนื้อฟันยังมีข้อจำกัดในด้านราคาที่สูง และมีอายุสั้น อีกทั้งในทางทันตกรรมยังไม่ได้รับการยอมรับต่อการนำมาใช้ในมนุษย์ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ในทางคลินิกได้

### 3. การแปรสภาพของเซลล์ต่อการส่งสัญญาณผ่านวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนส (MAPK)

วิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนส (Mitogen Activated Protein Kinase Pathway : MAPK) เป็นวิถีการส่งสัญญาณที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ในหลายด้าน ได้แก่ ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (differentiation) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และการตายของเซลล์ (cell death) การควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้องอาศัย external growth factor รอบ ๆ เซลล์ โดย MAPK เป็นหนึ่งของ protein kinase cascades ที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ [26] เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานโดยกระตุ้นการทำงานของโปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะภายในเซลล์ โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปยังโปรตีนเป้าหมาย ณ ตำแหน่งกรดอะมิโน Serine หรือ Threonine ที่จำเพาะ MAPK จึงจัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า Serine/Threonine kinase การส่งสัญญาณในวิถี MAPK มีความจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ การส่งทอดของสัญญาณโมเลกุลในวิถีนี้เกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ จากผิวเซลล์ด้านนอกผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์โดยการส่งทอดสัญญาณโมเลกุลในลักษณะที่มีความสลับซับซ้อนมากน้อยแตกต่างกัน และในที่สุดสัญญาณโมเลกุลแต่ละชนิดจะกระตุ้นต่อโปรตีนไคเนส ซึ่งทำหน้าที่เป็นสัญญาณโมเลกุลตัวหลักในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ให้เป็นไปตามบทบาทของสัญญาณโมเลกุลที่มากกระตุ้น

วิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตด โปรตีนไคเนส เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเพื่อนำไปสู่การแบ่งเซลล์ ซึ่งแบ่งเป็น 3 สายปฏิกิริยาหลัก อันได้แก่ JNKs, ERKs, และ p38 [26-28] (รูปที่ 1)

#### 1. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs)

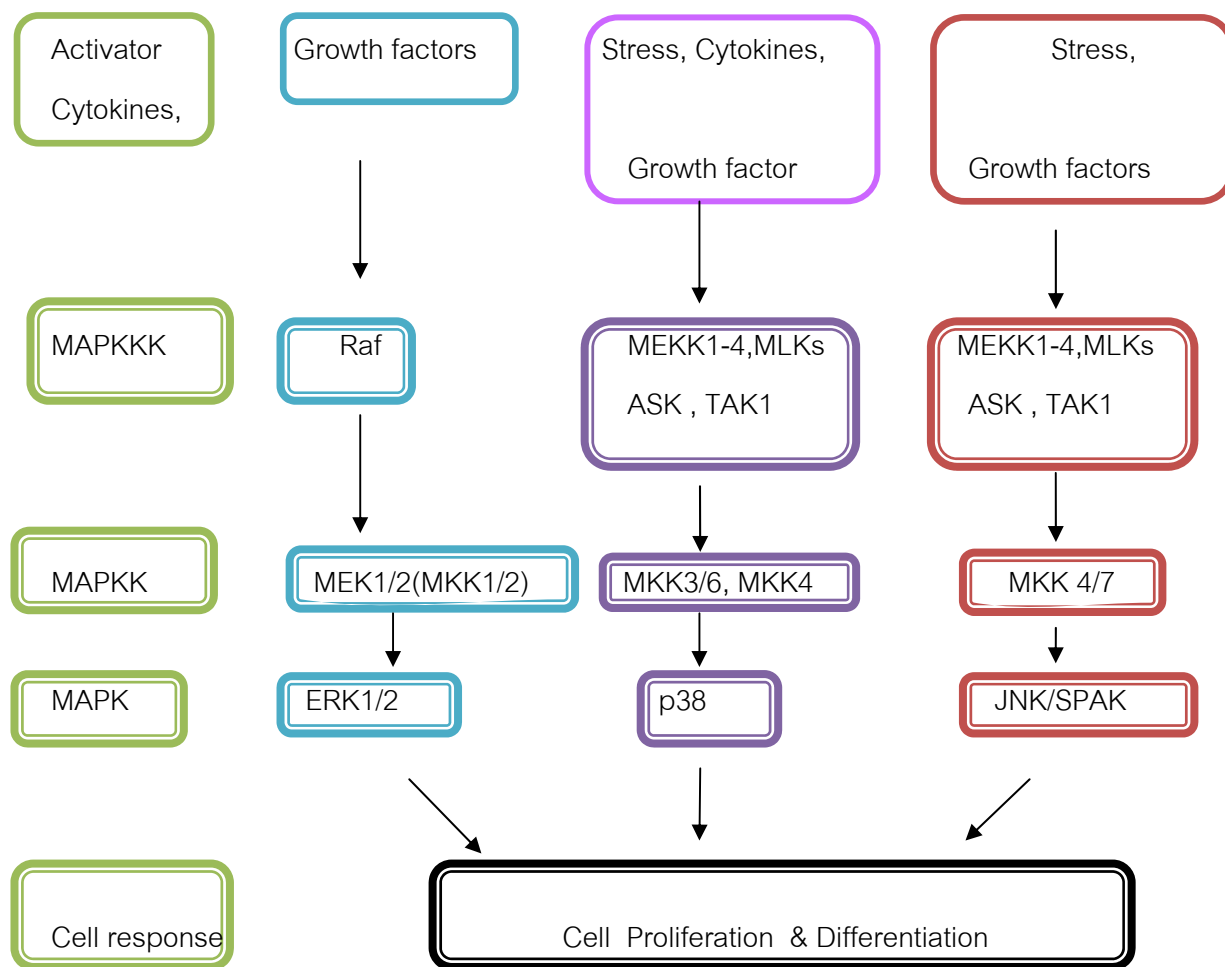
ทำหน้าที่ตอบสนองต่อปัจจัยของการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ตามหน้าที่เฉพาะ โดยพบว่า ERK1/2เป็นส่วนประกอบหลักที่พบในการควบคุมกลไกพื้นฐานและการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งจะควบคุมการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตภายในเซลล์ โปรตีนทั้งสองชนิดมีการส่งสัญญาณแตกต่างกันคือ ERK2 มีบทบาทในการควบคุมพื้นฐานและการส่งสัญญาณต่อโปรตีนในการแบ่งเซลล์ และ ERK1 มีผลต่อสัญญาณทั้งหมดที่ส่งออกมาของเซลล์และต่อต้านการกระตุ้นของ ERK2

#### 2. C-Jun N-terminal kinases (JNKs) เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยความเครียด

3. p38 isoforms (p38) มี 4 กลุ่มคือ p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\delta$  และ p38 $\gamma$  โดย p38 จะเกี่ยวข้องกับ การติดเชื้ การแบ่งเซลล์ การแปรสภาพของเซลล์ และการตายของเซลล์

วิธีการส่งสัญญาณของไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนสประกอบด้วยการกระตุ้น 3 ลำดับ ดังนี้

สัญญาณจากภายนอกกระตุ้น MAPKKK เติมหมู่ฟอสเฟตให้ MAPKK บริเวณ serine และ threonine MAPKK จะทำการกระตุ้น MAPK โดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้ MAPK และทำการส่งสัญญาณต่อไป



ภาพที่ 2 แสดงวิธีการส่งสัญญาณของไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนส<sup>[26]</sup>

จากศึกษาหาความเกี่ยวข้องของ การส่งสัญญาณของ MAPK กับการกระตุ้น thrombin (thrombin) ในเซลล์เนื้อเยื่อใน โดยทดลองวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR) และวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ด้วยวิธี <sup>3</sup>(H)-thymidine incorporation assay และ western blot analysis และดูระดับการเกิดฟอสโฟริเลชัน และวัด ALP activity พบว่า thrombin สามารถกระตุ้นผ่าน MAPK ในเซลล์เนื้อเยื่อในได้<sup>[29]</sup> จากศึกษา p38 MAPK ต่อความเกี่ยวข้องในการแสดงออกถึงการสร้างเนื้อเยื่อ

แข็งในเซลล์เนื้อเยื่อใน พบว่ากระบวนการตอบสนองของเซลล์ในการซ่อมสร้างเนื้อฟันสามารถเกิดผ่านทาง p38 MAPK ได้<sup>[30]</sup> อีกทั้งการตอบสนองต่อการหลังของ Hepatocyte growth factor ในเซลล์เนื้อเยื่อในต่อการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี ที่มีส่วนสำคัญต่อการสร้างเนื้อฟัน สามารถเกิดผ่านวิถีสัญญาณ ERK/MAPK ได้<sup>[31]</sup> และการเกิด Mechanical stress (MS) เช่น แรงจากการจัดฟัน หรือแรงจากการบดเคี้ยวสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดยฮีมออกซิจีเนสวัน (Heme oxygenase-1 : HO-1) เป็นสารสื่อกลาง (mediators) สำคัญที่พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งการศึกษาถึงวิถีการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยการดูการแสดงออกของ HO-1 ในเซลล์เนื้อเยื่อใน พบว่า การเกิด MS สามารถเพิ่มการแสดงออกของ HO-1, โอพีเอ็น (OPN : Osteopontin), บีเอสพี (BSP : Bone sialoprotein), ดีเอสพีพี และ ดีเอ็มพี-1 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผ่าน ERK, p-38, NF-kB และ P13K<sup>[32]</sup>

#### 4. ความสำคัญในทางการแพทย์และทันตแพทย์ของว่านหางจระเข้

ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง โดยว่านหางจระเข้เป็นพืชเมืองร้อนชื้น ที่มีกว่า 300 สายพันธุ์ มีรายงานการศึกษาพบว่า ว่านหางจระเข้มีส่วนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันการเกิดการอักเสบ ป้องกันแสงอุลตราไวโอเล็ต และมีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อปรสิต รวมทั้งช่วยในเรื่องการหายของบาดแผล<sup>[33]</sup> ว่านหางจระเข้จะประกอบไปด้วย 2 ส่วนสำคัญ ได้แก่ ส่วนวุ้น ซึ่งได้จากส่วน Pericyclic cell ของเปลือกว่านหางจระเข้ และส่วนเยื่อเมือกซึ่งได้จากผนังของส่วน Mucilaginous cell ในส่วนของ Inner central zone ของใบว่านหางจระเข้โดยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ประกอบไปด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น โกลโคโปรตีน โพลีแซกคาไรด์ และโพลีเปปไทด์ เป็นต้น<sup>[34-35]</sup> Yagi, A. และคณะ ทำการศึกษาคุณลักษณะของโกลโคโปรตีนในว่านหางจระเข้ โดยทำการวัดการเพิ่มจำนวนของ human normal dermal and baby hamster kidney cells โดยพบว่า โกลโคโปรตีนในว่านหางจระเข้ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้<sup>[36]</sup>

ว่านหางจระเข้มีการศึกษาและนำมาใช้ในการรักษาการอักเสบของบาดแผลโดยเฉพาะแผลที่เกิดจากไฟไหม้ น้ำร้อนลวก และแมลงสัตว์กัดต่อย การรักษาทางผิวหนังโดยการใช้ว่านหางจระเข้นั้นเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย การสังเคราะห์คอแลลาเจนเพื่อให้เกิดขบวนการหายของบาดแผลอีกทั้ง ว่านหางจระเข้มีผลต่อการต้านการเกิดการอักเสบ โดยพบว่าสาร cinnamic acid ester มีฤทธิ์ต่อการต้านการอักเสบ และยับยั้ง arachidonic acid pathway ผ่านทาง cyclooxygenase<sup>[37]</sup> จากการศึกษาพบว่า ว่านหางจระเข้สามารถกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของ rat neuron-like cell<sup>[38]</sup> ส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ สามารถ

กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย กระตุ้นการสร้างของเซลล์เอ็นดอทีลียัล และเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์เนื้อเยื่อใน<sup>[39]</sup> มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T\_E1<sup>[40]</sup> มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในพินหนูโดยพบว่ามีการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้น<sup>[41]</sup> อีกทั้งสารสำคัญอันได้แก่ สารอะซีแมนแนนซึ่งพบว่าเป็นสารสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน ด้านการอักเสบและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล<sup>[35]</sup> โดยพบว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เส้นใยประสาทนำเข้าที่ยังไม่สมบูรณ์ (immature dendritic cells) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเริ่มต้น<sup>[42]</sup> กระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใย ให้เกิดการเพิ่มจำนวน กระตุ้นเคอราติโนไซต์โกรทแฟคเตอร์-1 (KGF-1 : keratinocyte growth factor-1) , วัสดุคูล่าเอ็นโดทีเรียลโกรทแฟคเตอร์ ( VEGF : vascular endothelial growth factor) และ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งมีผลต่อการหายของบาดแผล<sup>[6]</sup> กระตุ้นการสังเคราะห์บีเอ็มพี-2 ในโพรงเนื้อเยื่อใน เซลล์สร้างเส้นใย และเอ็นดอทีลียัล<sup>[4, 43]</sup> และกระตุ้นการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี และ ดีเอ็มพี-1 ในระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัสของเซลล์เนื้อเยื่อในของพินมนุษย์<sup>[4-5]</sup> อีกทั้งการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยดูการตอบสนองของเนื้อเยื่อใน ของพินกรามหนูแรทพบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเกิดการสร้างเนื้อพินซ่อมเสริมและลดการเกิดการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อะซีแมนแนนมีความสามารถในการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อใน ซึ่งให้ผลที่มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้จากการใช้อะซีแมนแนนในการรักษาการอักเสบของเบ้ากระดูกพิน<sup>[3]</sup>

ว่านหางจระเข้มีความสำคัญในการรักษาทางทันตกรรม คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในการรักษาพบว่าสามารถรักษาการหายของบาดแผล เพิ่มการสร้างคอลลาเจนไฟเบอร์ กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าว่านหางจระเข้เป็นสมุนไพรที่หาได้ง่าย และพบมากในประเทศไทย สามารถนำมาพัฒนาให้เป็นยาที่มีคุณภาพในการช่วยกระตุ้นการสร้างเนื้อพิน อีกทั้งสามารถนำมาประยุกต์เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อการรักษาในอนาคต และเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### ตัวอย่าง

การวิจัยครั้งนี้ใช้เซลล์เนื้อเยื่อในที่ได้จากพันกรมคุณชื้อ 8 ที่ไม่ผู้ ปราศจากการอักเสบ และโรคทางปริทันต์ของอาสาสมัครอายุ 16-25 ปี จำนวน 5 ชื้อ

#### ตัวแปรในการทดลอง

ตัวแปรต้น คือ สารอะชื้อแมนแนนในส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้

แปรตาม คือ DSPP , MAPK, ERK , JNK, p38

#### วิธีการดำเนินการ

##### 1. การเตรียมสารสกัดส่วนวุ้นและสารอะชื้อแมนแนนจากวุ้นหางจระเข้

นำใบวุ้นหางจระเข้ที่มีขนาดความกว้างของใบบริเวณโคนต้นอย่างน้อย 7 เซนติเมตร มาล้างให้สะอาด และทำการลอกผิวสีเขียวส่วนนอกให้เหลือแต่ส่วนวุ้นใส นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อทำการกำจัดส่วนยางที่ติดมากับส่วนวุ้น จากนั้นทำการหั่นส่วนวุ้นใสเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำให้ละเอียดโดยเครื่อง homogenizer แล้วทำการกรองผ่านผ้าขาวบาง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการผ่านกระดาษกรองไนโตรเซลลูโลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร สารอะชื้อแมนแนนได้จากการตกตะกอนของสารสกัดส่วนวุ้นวุ้นหางจระเข้ ด้วยการปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 10,000 รอบ/นาที 30 นาที นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส สารอะชื้อแมนแนนจะถูกเตรียมโดยการละลายในน้ำกลั่น และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave สารอะชื้อแมนแนนจะทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธี HPLC และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy อย่างที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้<sup>[5]</sup>

##### 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในจากพัน

นำพันชื้อ 8 ที่ไม่ผู้ ปราศจากการอักเสบ และโรคปริทันต์ของผู้ป่วยที่มารับการผ่าพันกรมคุณ จากสาเหตุจากการจัดฟันหรือผ่าพันคุณ ณ คลินิกทันตกรรมบริการพิเศษ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับการยินยอมจากผู้ป่วย พันและเหงือกที่ติดมากับพันจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายน์ (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อ ทำการตัดส่วนตัวพันในแนวอนระดับ CEJ จากนั้นนำส่วนของเนื้อเยื่อในพันตัดออกมาทำการตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1×1×1 มิลลิเมตร และนำเนื้อเยื่อที่ได้ไปเลี้ยงแยกบนจานเพาะเลี้ยง (ขนาด 35 มิลลิเมตร) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM: Dulbecco Modified Eagle's Medium) ซึ่งประกอบไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ คือ ซีรัม ( fetal bovine serum ) ความเข้มข้นร้อยละ 10, แอล-กลูตามีน( L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลิน-จี

(penicillin –G) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน บี(amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเนื้อเยื่อจะถูกเลี้ยงในตู้บคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เริ่มเจริญออกจากชั้นเนื้อจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ก็จะถูกนำไปหว่าน(subculture) ในจานเพาะเลี้ยงใหม่ และนับเซลล์ที่หว่านเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์จะถูกหว่านใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-6<sup>[5]</sup> เซลล์ที่เหลือจะต้องถูกทำลายหลังเสร็จสิ้นการทดลอง

### 3. การสกัดอาร์เอ็นเอ และ ปฏิกริยาอาร์ทีพีซีอาร์ (Total RNA preparation and reverse transcription – polymerase chain reaction : RT-PCR)

ทำการทดลองโดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อใน ในรุ่นที่ 3-6 เลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM ที่มี 10 % FBS และ 1% antibiotic เมื่อเซลล์เจริญเติบโต ได้ร้อยละ 80 ของพื้นที่ จะทำการหว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร ความหนาแน่น  $2 \times 10^6$  เซลล์ต่อเพลท ทำการเพาะเลี้ยง เซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะจานเลี้ยงเชื้อ และเจริญเติบโต หลังจากนั้นทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ และทำการเติมอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้น 0 ,0.5 ,1 ,2 ,4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ทำการแยกสายอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยการสกัด RNA จากเซลล์ ด้วย Total RNA mini kit (Geneaid, [Theera Trading. Co.,Ltd](http://Theera_Trading.Co.,Ltd),Thailand) นำ RNA มาใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในปฏิกริยา reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ cDNA และอาศัยความจำเพาะของ primer ในลำดับเบสของยีน ที่กำหนดการสังเคราะห์ยีนดีเอสพีพี โดยใช้ไพรเมอร์ 2 กลุ่มดังตารางที่ 1



ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ cDNA ที่สนใจด้วยปฏิกิริยา PCR วิเคราะห์ผลของปฏิกิริยาด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

	Sequence (5'→3')	Size (bp)
DSPP	CATTTGGGCAGTAGCATGGGCCA TGTGTCCCCATTCCAGCCCTCAAT	316 bp
GAPDH	ATCACCATCTTCCAGGAG ATCGACTGTGGTCATGAG	318 bp

GADPH : Glyceraldehyde-3-phosphohate dehydrogenase

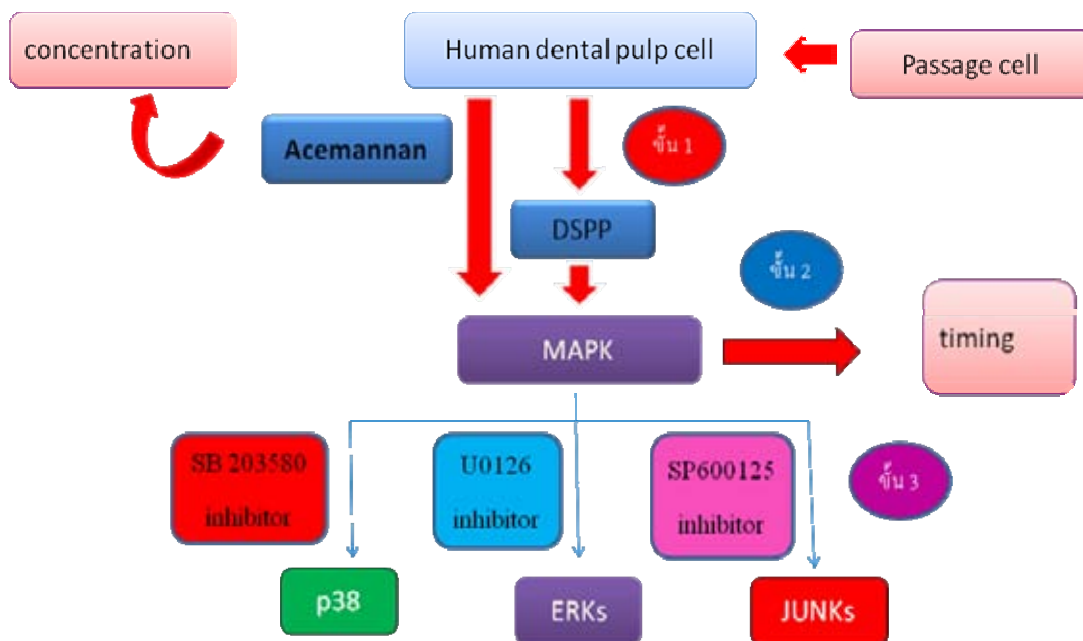
DSPP : Dentinsialophosphoprotein

**ตารางที่ 1** แสดงลำดับเบสของยีนดีเอสพีไฟโบรตีนและGADPH

#### 4. การวิเคราะห์โดยวิธีเวสเทินบอด (Western blot analysis)

เลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อใน รุ่นที่ 3-6 ใน DMEM ที่มี 10 % FBS และ 1% antibiotic เมื่อเซลล์เจริญเติบโต 80% ทำการหว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร ความหนาแน่น  $2 \times 10^6$  เซลล์ต่อเพลท ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และใส่สารยับยั้ง (MAPK inhibitor) โดยทำการใส่ยับยั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลาต่างๆกัน<sup>[44]</sup> ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และแยกโปรตีนโดยใช้ radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer ที่มี phosphatase inhibitors (1 mM sodium vanadate, 50 mM NaF) ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนจะทำการวัดโดยใช้ Bicinchonic acid assay (BCA kit, PIERCE.USA) และทำการต้มโปรตีนเป็นเวลา 5 นาทีก่อนทำ gel electrophoresis โดยใช้ 12% polyacrylamide gel ทำการ transferred สู่นีโตรเซลลูโลส แล้วนำมา incubated ใน 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาใส่ primary antibody ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (Primary antibodies สำหรับ MAPK : phosphorylated p38 MAPK , non-phosphorylated p38 MAPK(1:500 dilution) (Cell signaling Technology, Cell signaling, MA, USA), phospho-JNK (1 : 1,000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), total JNK (1 : 1,000)( Cell signaling Technology, Cell signaling, MA, USA), phospho-ERK1/2 (1 : 1,000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), total ERK1/2 (1 : 1,000) (Cell signaling Technology, Cell signaling, MA, USA). ทำการล้างและใส่ secondary

antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแผ่นเมมเบรนมาข้อมด้วย chemiluminescent reagent และนำมาทำการวิเคราะห์ band



ภาพที่ 3 แสดงการสรุปขั้นตอนการทำงาน

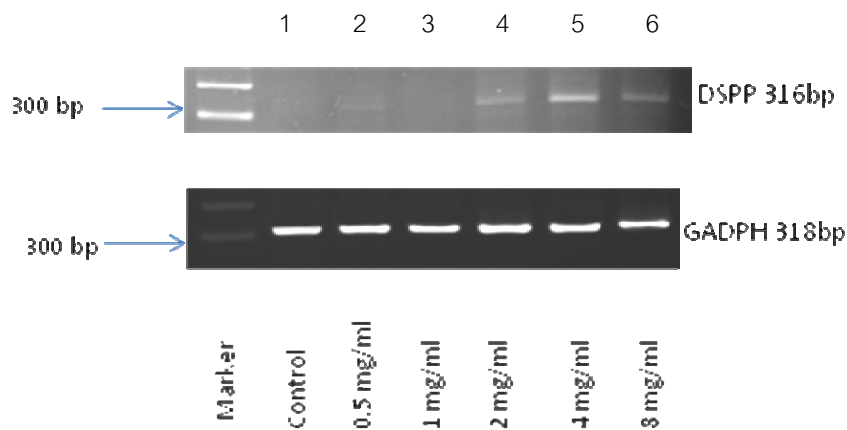
### การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้จะทำการทดลองสามซ้ำ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป StatsDirect version 2.7.8 และ Graph pad Prism 5 ทำการกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่  $p=0.05$  วิเคราะห์ด้วยสถิติ One way ANOVA และทำการวิเคราะห์ถึงความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ Bonferroni's Multiple Comparison Test

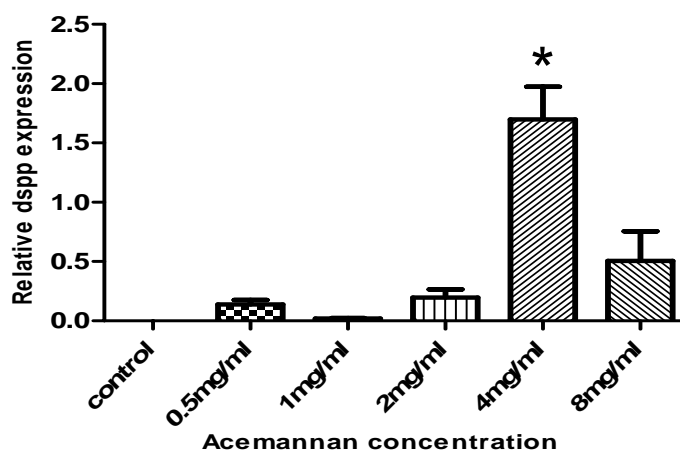
## บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

### ผลการวิเคราะห์

1. ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของดีเอสพีพีของเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์



**ภาพที่ 4** การแสดงออกของยีนดีเอสพีพีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนในเนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ โดยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปเทส (คอลัมน์ 1-6 แสดงถึงกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ใส่สารอะซีแมนแนน ในความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย

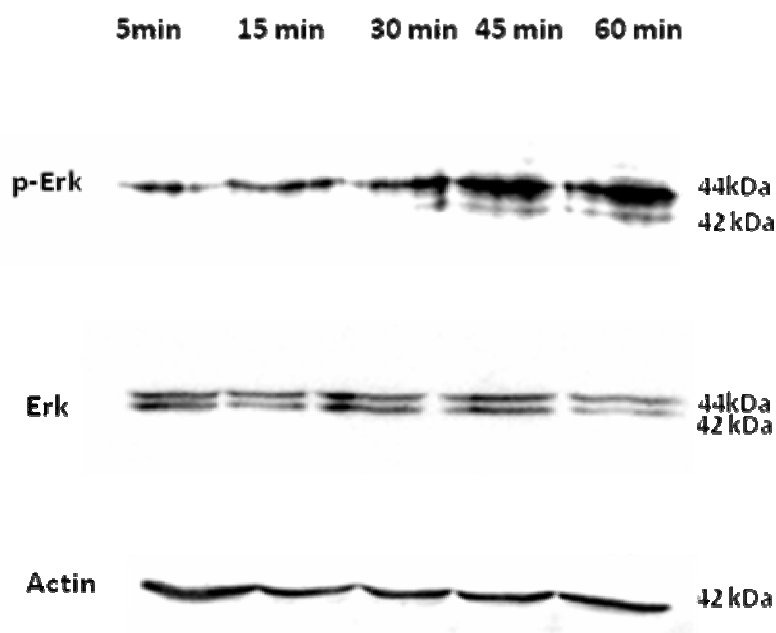


**ภาพที่ 5** แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนดีเอสพีพีที่ถูกกระตุ้นโดยสารอะซีแมนแนน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่  $p < 0.05$

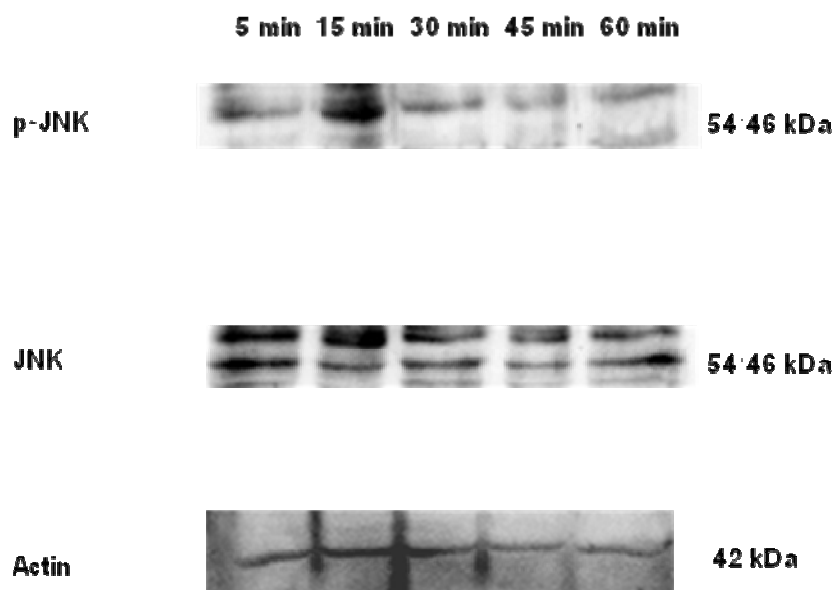
จากผลการทดลองพบว่า การสารอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอของดีเอสพีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## 2. ระยะเวลาการเกิดฟอสโฟริเลชันในวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตด โปรตีนไคเนส



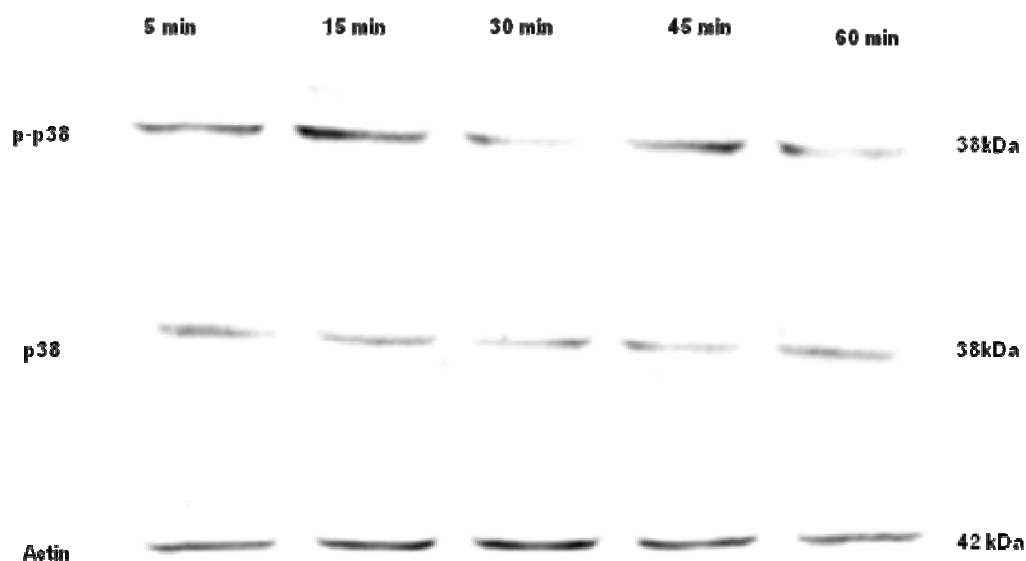
**ภาพที่ 6** ผลของสารอะซีแมนแนนต่อระยะเวลาการเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 (คอลัมน์ 1-5 แสดงระยะเวลาการเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 และแอกติน ที่ 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที) จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย

เมื่อทำการใส่สารอะซีแมนแนนเพื่อสังเกตระยะเวลาการเกิดฟอสโฟริเลชันในช่วงเวลา 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่าการเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 จะเริ่มเห็นที่เวลา 5 นาที และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 60 นาที โดยจะพบว่าที่เวลา 45 และ 60 นาที การเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 มากที่สุด



**ภาพที่ 7** ผลของสารอะซีแมนแนนต่อระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ JNK (คอลัมน์ 1-5 แสดงระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p-JNK, JNK และแอคตินที่ 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที) จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย

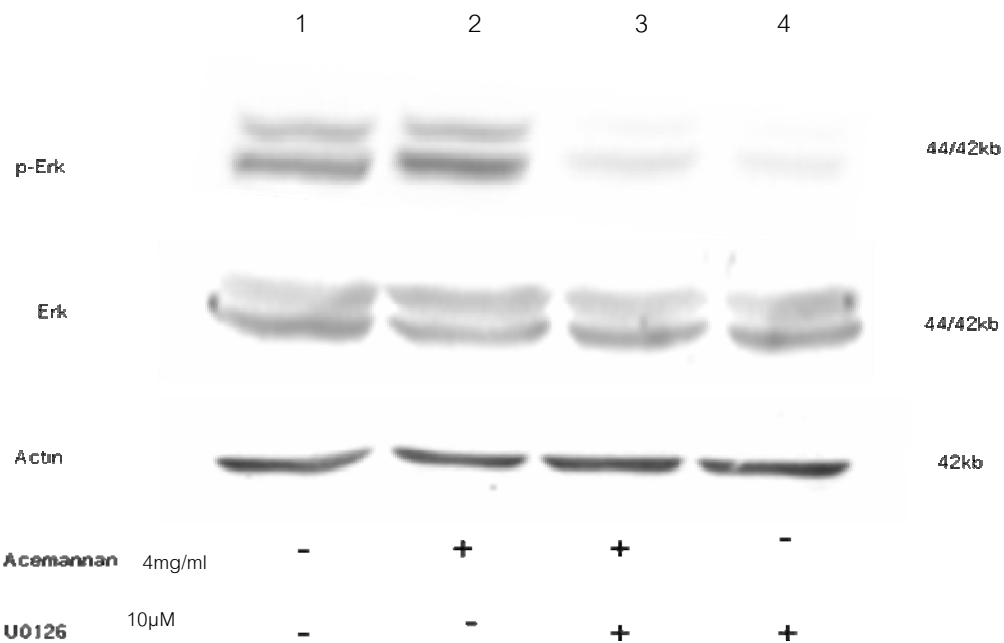
เมื่อทำการใส่สารอะซีแมนแนนเพื่อสังเกตระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชันในช่วงเวลา 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่าการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ JNK สามารถเห็นได้ตั้งแต่ในช่วง 5 นาที และจะพบการเกิดฟอสโฟรีเลชันมากที่สุดที่ 15 นาที และจะลดลงในช่วง 30 ถึง 60 นาที ตามลำดับ



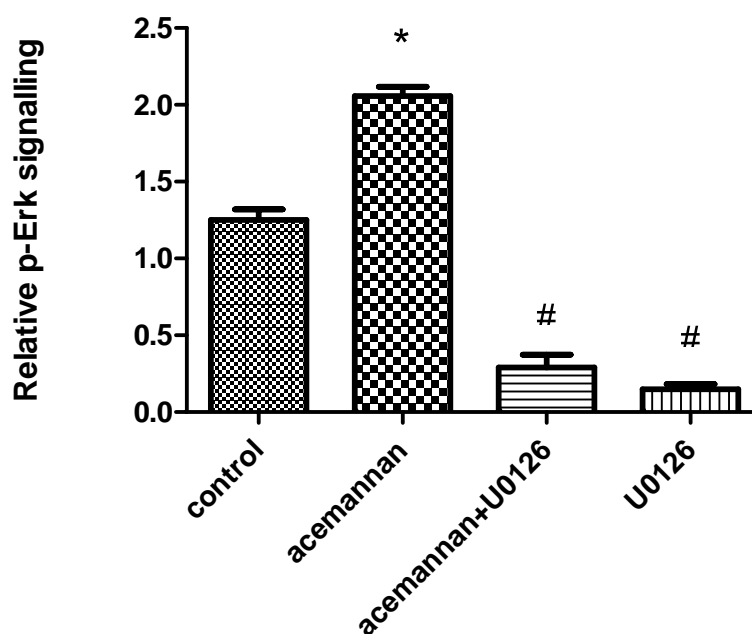
**ภาพที่ 8** ผลของสารอะซีแมนแนนต่อระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p38MAPK (คอลัมน์ 1-5 แสดงระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p-p38MAPK, p38 MAPK และแอกตินที่ 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที) จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย

เมื่อทำการใส่สารอะซีแมนแนนเพื่อสังเกตระยะเวลาการเกิดฟอสโฟรีเลชันในช่วงเวลา 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่าการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p38 MAPK สามารถเห็นได้ตั้งแต่ในช่วง 5 นาที และพบจะเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p38 MAPK มากที่สุดในช่วง 15 นาที และลดลงในช่วง 30 ถึง 60 นาที ตามลำดับ

### 3. สารอะซีแมนแนนกับการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันของวิถีไมโทเจน-แอคทีเวเตดโปรตีนไคเนส



**ภาพที่ 9** แสดงการยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 เมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะ ปริมาณ 10 ไมโครโมลาร์ (U0126) และทำการใส่สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยวิธีเวสเทิร์นบอด (คอลัมน์ 1-4 แสดงถึงกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน กลุ่มที่ใส่ตัวยับยั้งที่ตามด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวยับยั้งเท่านั้น ตามลำดับ)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย



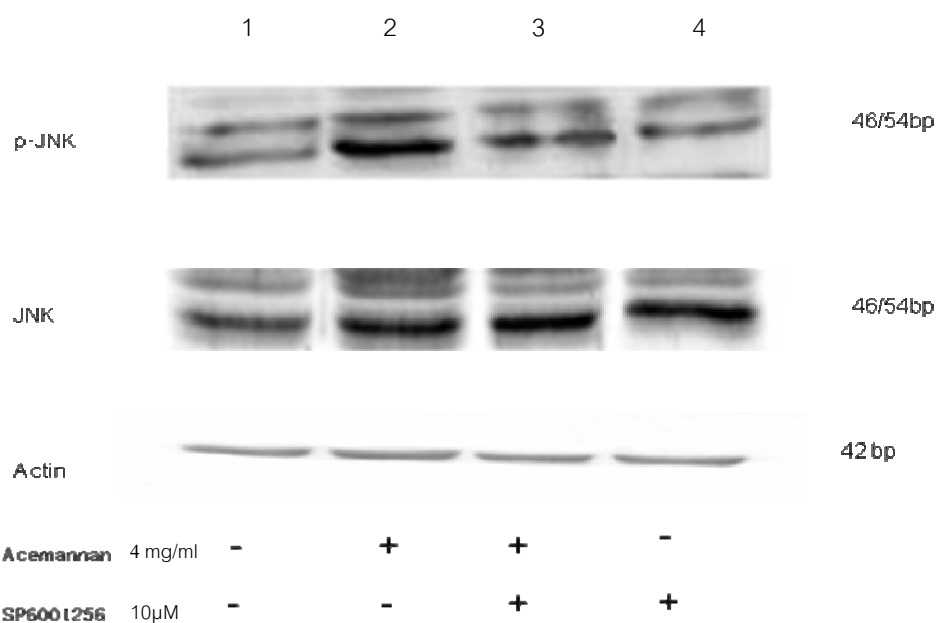
ภาพที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์การเกิดฟอสโฟรีเลชันของ ERK 1/2

\*แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่  $p < 0.05$

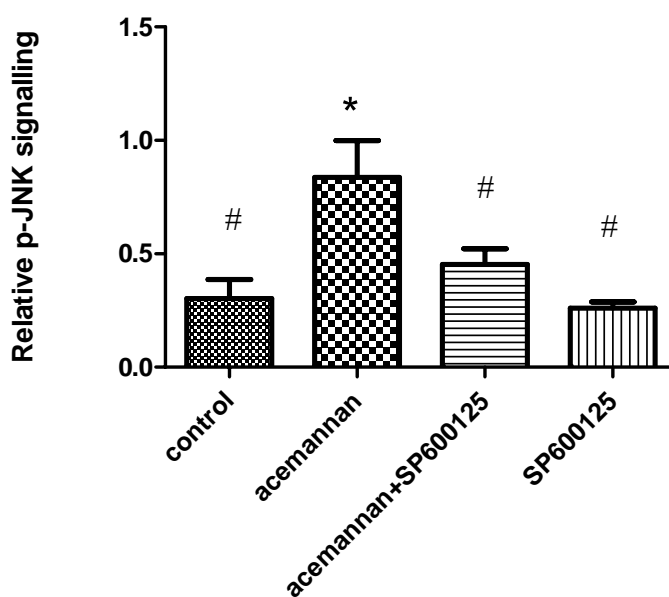
#แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน ที่  $p < 0.05$

จากรูปที่ 9 แสดงให้เห็นการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ ERK1/2 เมื่อทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่าสารอะซีแมนแนนกระตุ้นการเกิดฟอสโฟรีเลชัน ERK1/2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) และเมื่อทำการเติมสารยับยั้งเฉพาะการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ ERK1/2 (U0126) ก่อนทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่า U0126 สามารถยับยั้งการเติมกลุ่มฟอสเฟตที่เกิดจากสารอะซีแมนแนนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงปริมาณร้อยละ 86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน แสดงให้เห็นว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเกิดปฏิกิริยาผ่านทาง ERK1/2 ได้





**ภาพที่ 11** แสดงการยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK เมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะปริมาณ 10 ไมโครโมลาร์ (SP600125) และทำการใส่สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยวิธีเวสเทินบอต(คอลัมน์ 1-4 แสดงถึงกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน กลุ่มที่ใส่ตัวยับยั้งที่ตามด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวยับยั้งเท่านั้น ตามลำดับ)จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย

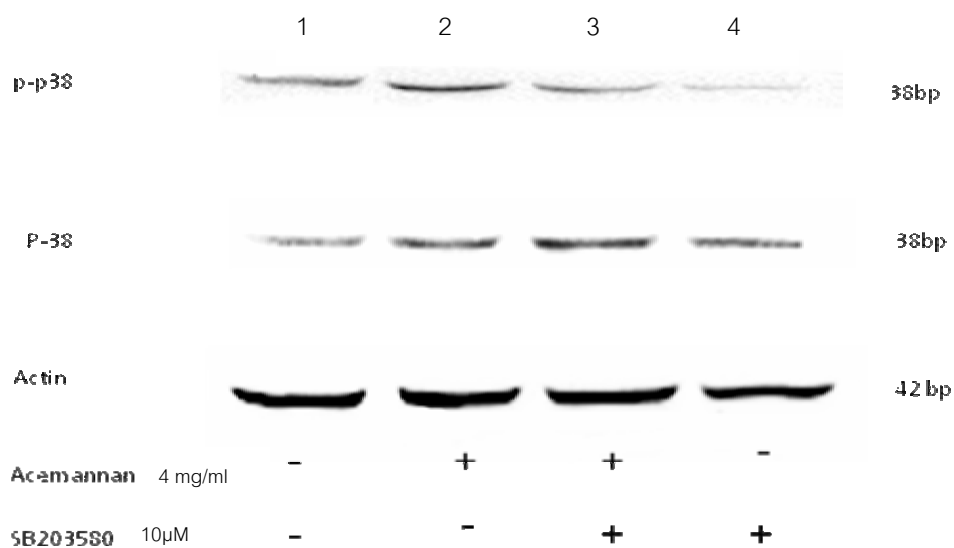


ภาพที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์การเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK

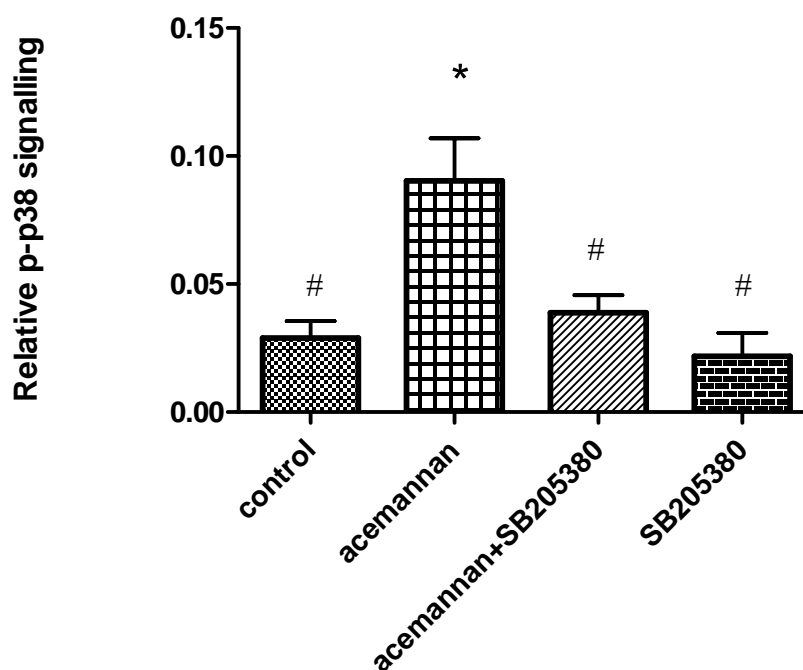
\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่  $p < 0.05$

# แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน ที่  $p < 0.05$

จากรูปที่ 11 แสดงให้เห็นการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK เมื่อทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนพบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเกิดฟอสโฟริเลชัน JNK ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) และเมื่อทำการเติมสารยับยั้งเฉพาะการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK (SP600125) ก่อนทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่า SP600125 ที่มีการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนจะมีการลดลงของปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันได้ 46 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน โดยจะพบการแสดงออกของโปรตีนที่ลดลง



**ภาพที่ 13** แสดงการยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของ p-38 MAPK เมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะ ปริมาณ 10 ไมโครโมลาร์ (SB203580) และทำการใส่สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีเวสเทิร์นบอต (คอลัมน์ 1-4 แสดงถึงกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน กลุ่มที่ใส่ตัวยับยั้งที่ตามด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวยับยั้งเท่านั้น ตามลำดับ) จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย



ภาพที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์การเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p38 MAPK

\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่  $p < 0.05$

# แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน ที่  $p < 0.05$

จากรูปที่ 13 แสดงให้เห็นการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p38 MAPK เมื่อทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนพบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเกิดฟอสโฟรีเลชัน p38 MAPK ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทำการเติมสารยับยั้งเฉพาะการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ p38 MAPK (SB203580) ก่อนทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่า SB203580 ที่มีการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนจะมีการลดลงของปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน 51 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน โดยจะพบการแสดงออกของโปรตีนที่ลดลง

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

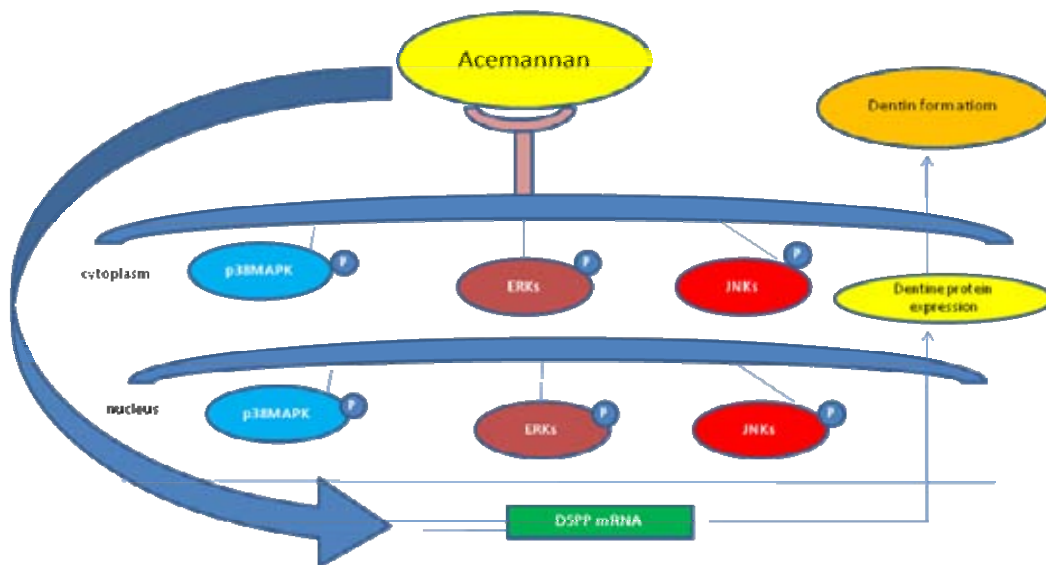
ว่านหางจระเข้เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในทางการแพทย์ โดยมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่พบว่าสารจากว่านหางจระเข้มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคหลายชนิด<sup>[45]</sup> การศึกษาที่ผ่านมาพบคุณสมบัติของส่วนว่านหางจระเข้ที่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์คอลลาเจน และสามารถทำให้เกิดการหายของบาดแผลได้<sup>[41]</sup> สารอะซีแมนแนนเป็นสารที่สกัดได้จากส่วนว่านหางจระเข้ และมีส่วนประกอบหลักของคาร์โบไฮเดรต โดยพบว่าสารอะซีแมนแนนมีส่วนช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนสภาพ รวมถึงสามารถทำการพอกแร่ธาตุให้เซลล์สามารถกลับมาทำงานได้ปกติอีกครั้ง ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงกลไกของสารอะซีแมนแนนต่อการกระตุ้นการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเนิร์ทส์ของดีเอสพีพี ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญต่อการสร้างเนื้อพินซอมเสริมผ่านวิถีไมโทเจน-แอคติเวเทด โปรตีนไคเนส ในเซลล์เนื้อเยื่อในของพินมนุษย์ โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ และเวสเทิร์นบลอต

จากการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าความเข้มข้นของสารอะซีแมนแนน 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเนิร์ทส์ของดีเอสพีพีได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพีชนิการ์ และนวรภรณ์<sup>[4-5]</sup> ที่พบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของดีเอสพีพี ซึ่งแม้ว่าความเข้มข้นที่ใช้มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องจากเซลล์ได้จากผู้ป่วยที่แตกต่างกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์เนื้อเยื่อใน เนื่องจากพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อใน และเซลล์สร้างเส้นใยสามารถเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อพิน และสร้างเนื้อพินซอมเสริมเพื่อทดแทนเนื้อพินที่ถูกทำลายไป โดยเซลล์เนื้อเยื่อในจะคงสภาพการเป็นเซลล์สร้างเนื้อพินเมื่อเพาะเลี้ยงถึงรุ่นที่ 6

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเพิ่มสัญญาณการเพิ่มกลุ่มฟอสเฟตของ ERK1/2 JNK และ p38 MAPK ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยการใช้สารยับยั้งเฉพาะ ได้แก่ U0126 SP600125 และ SB 203580 ตามลำดับ ซึ่งทำให้ระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเนิร์ทส์ของดีเอสพีพีลดลงสู่ระดับใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่อะซีแมนแนน และเมื่อทำการใส่สารยับยั้งร่วมกับสารอะซีแมนแนนพบว่า ERK1/2 สามารถลดการเกิดฟอสไฟริเลชันได้อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก ERK1/2 เป็นส่วนประกอบหลักที่พบในการควบคุมกลไกพื้นฐานและ

การแบ่งเซลล์ของเซลล์ซึ่งจะควบคุมการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตภายในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถเกิดการเพิ่มจำนวน และทำงานได้อย่างต่อเนื่อง<sup>[46]</sup> ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาถึงวิธีการส่งสัญญาณของ mineral trioxide aggregate (MTA) ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์สร้างเนื้อฟันผ่านวิถีวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตด โปรตีนไคเนส ที่พบว่าสามารถเกิดการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมผ่านทาง ERK1/2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน<sup>[47]</sup> สำหรับ JNK และ p38 MAPK พบว่าสามารถลดการเกิดฟอสโฟริเลชันได้ 46 และ 51 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องด้วยว่าวิถี JNK และ p38 MAPK เกี่ยวข้องกับการตอบสนองจากความเครียดของเซลล์ และการตายของเซลล์ มากกว่าการเกิดการแบ่งตัว และการแปรสภาพของเซลล์<sup>[48]</sup> แต่จากการศึกษา BMP-2 ต่อการกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์สร้างเนื้อฟันผ่าน p38a MAPK พบว่าสามารถเกิดผ่าน p38a MAPK ได้ เมื่อเซลล์เนื้อเยื่อในได้รับการกระตุ้นการแปรสภาพเซลล์ด้วย BMP-2 และจะพบว่าเกิดการแสดงออกการนำรหัสอาร์เอ็นเอของยีน ดีเอสพี , ดีเอ็มพี-1 และโอพีเอ็น เช่นกัน<sup>[49]</sup> อีกทั้งจากการศึกษาเพื่อดูผลของ p38MAPK ต่อการเกิด alkaline phosphatase ในเซลล์เนื้อเยื่อในมนุษย์พบว่าเมื่อใส่ตัวยับยั้งเฉพาะ (SB203580) ลงไปในเซลล์เนื้อเยื่อใน จะพบว่าเกิดการลดลงของปฏิกิริยา ALPase ผ่าน p38MAPK<sup>[30]</sup> จากการวิจัยครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เนื้อเยื่อในเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน JNK และ p38 MAPK เพียงบางส่วน แต่อาจมีปฏิกิริยาการส่งสัญญาณไปในวิถีอื่นร่วมด้วย(crosstalk)



ภาพที่ 15 แสดงสรุปปฏิกิริยาการส่งสัญญาณวิถีไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคเนสในสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อเยื่อฟันซ่อมเสริม

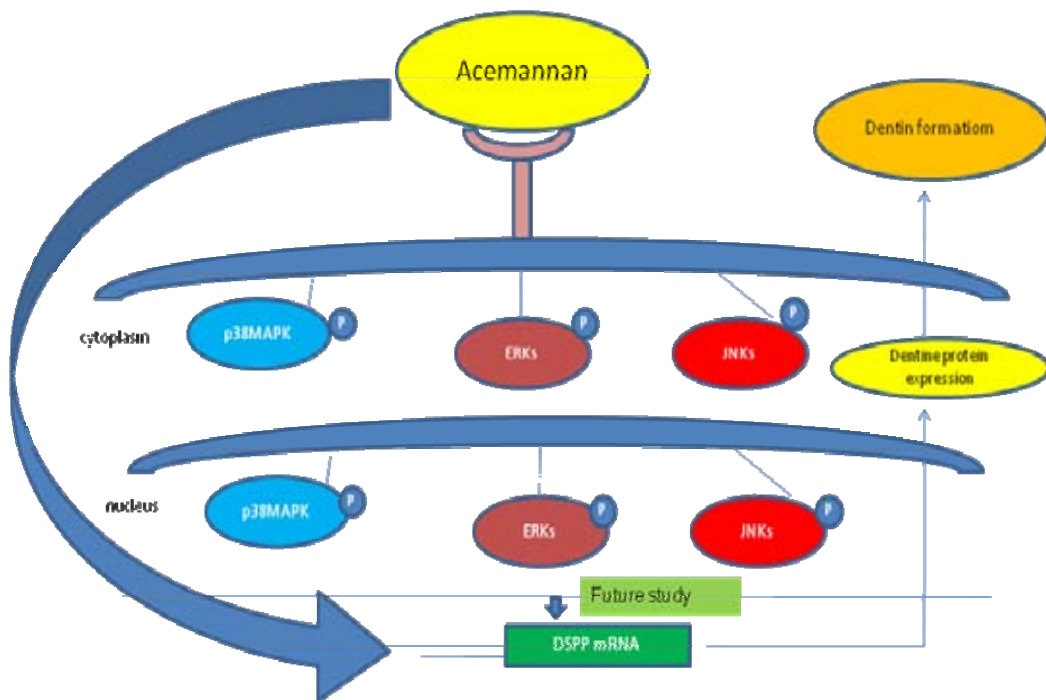
## สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารอะซีแมนแนนต่อการกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของเดินทีนไซเอโดฟอสโฟโปรตีนและกลไกการกระตุ้นของสารอะซีแมนแนนผ่านวิถีไมโทเจน-แอกติเวตเตดโปรตีนไคเนส ในเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์โดยสารอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของเดินทีนไซเอโดฟอสโฟโปรตีน ในเนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อทำการหาระยะเวลาการเกิดฟอสโฟริเลชันที่เหมาะสมต่อการทำงานของวิถีไมโทเจน-แอกติเวตเตดโปรตีนไคเนส ได้แก่ ERK1/2, JNK และ p38 MAPK พบว่าในเวลา 45 นาทีที่สามารถเห็นการเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 ได้ชัดเจนที่สุด และในช่วงเวลา 15 นาทีจะพบว่า JNK และ p38 MAPK สามารถเกิดฟอสโฟริเลชันได้มากที่สุด และจะลดลงตามลำดับ เมื่อนำผลความเข้มข้น และระยะเวลาการเกิดฟอสโฟริเลชันเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการกลไกของวิถีไมโทเจน-แอกติเวตเตด โปรตีนไคเนส ต่อสารอะซีแมนแนนที่กระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอเนื้องอกของเดินทีนไซเอโดฟอสโฟโปรตีน พบว่า สารอะซีแมนแนนสามารถเกิดฟอสโฟริเลชัน ERK1/2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) และเมื่อทำการเติมสารยับยั้งเฉพาะการเกิดฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2 (U0126) ก่อนทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนพบว่า U0126 ที่มีการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนจะมีการลดลงของปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันได้ 86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารอะซีแมนแนน สำหรับผลการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK พบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถเกิดฟอสโฟริเลชัน JNK ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) และเมื่อทำการเติมสารยับยั้งเฉพาะการเกิดฟอสโฟริเลชันของ JNK (SP600125) ก่อนทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่า SP600125 ที่มีการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนจะมีการลดลงของปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันได้ 46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน และการเกิดฟอสโฟริเลชันของ p38MAPK พบว่าสามารถเกิดฟอสโฟริเลชัน p38MAPK ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) และเมื่อทำการเติมสารยับยั้งเฉพาะการเกิดฟอสโฟริเลชันของ p38MAPK (SB203580) ก่อนทำการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่า SB203580 ที่มีการกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนจะมีการลดลงของปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน 51 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารอะซีแมนแนน

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสารอะซีแมนแนนกระตุ้นการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี และมีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านวิถีไมโทเจน-แอกติเวตเตดโปรตีนไคเนส

## ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงวิถีไมโทเจน-แอกติเวเตด โปรตีนไคเนส แต่จากปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์อาจเกิดได้จากหลายวิถีที่ส่งสัญญาณที่เชื่อมโยงได้เช่นกัน อาทิเช่น Smad pathway ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมสามารถเกิดการกระตุ้นและส่งสัญญาณผ่านทางวิถีนี้ได้เช่นกัน อีกทั้งการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้พบว่าสารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอของยีนที่ไซโตโลฟอสโฟโปรตีน ในเนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ และมีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านวิถีไมโทเจนแอกติเวเตด โปรตีนไคเนส ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่การแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอของยีนที่ไซโตโลฟอสโฟโปรตีน จะสามารถถูกกระตุ้นด้วยสารอะซีแมนแนนผ่านวิถีไมโทเจนแอกติเวเตดโปรตีนไคเนสได้ จึงอาจต้องทำการยืนยันด้วยการทำการทดลองการแสดงออกของยีนดีเอสพีด้วยการทำอาร์ทีพีซีอาร์เพื่อดูการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีนดีเอสพีที่ต่อการส่งสัญญาณวิถีไมโทเจนแอกติเวเตดโปรตีนไคเนส



ภาพที่ 16 แสดงแนวคิดวิจัยเพิ่มเติมของปฏิกิริยาการส่งสัญญาณวิถีไมโทเจน-แอกติเวเตดโปรตีนไคเนสในสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อเยื่อฟันซ่อมเสริม



## รายการอ้างอิง

- [1] Smith A. J. Pulpal responses to caries and dental repair. Caries Res. 36(4) (Jul-Aug 2002): 223-232.
- [2] Prasad M.; Butler W. T., Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. Connect Tissue Res. 51(5) (Oct 2010): 404-417.
- [3] Poor M. R.; Hall J. E., Poor A. S. Reduction in the incidence of alveolar osteitis in patients treated with the SaliCept patch, containing Acemannan hydrogel. J Oral Maxillofac Surg. 60(4) (Apr 2002): 374-379; discussion 379.
- [4] Jittapiromsak N.; Sahawat D.; Banlunara W.; Sangvanich P., Thunyakitpisal P. Acemannan, an extracted product from Aloe vera, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. Tissue Eng Part A. 16(6) (Jun 2010): 1997-2006.
- [5] Lardungdee P.; Asvanit P., Thunyakitpisal P. Effect of acemannan on the dentinsialophosphoprotein and dentin matrix protein 1 mRNA expressions in primary human pulpal cells. . CU Dent J. 31 (2008): 407-414.
- [6] Jettanacheawchankit S.; Sasithanasate S.; Sangvanich P.; Banlunara W., Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. J Pharmacol Sci. 109(4) (Apr 2009): 525-531.
- [7] Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. J Dent Res. 64 Spec No (Apr 1985): 530-540.
- [8] Suzuki S.; Sreenath T.; Haruyama N.; Honeycutt C.; Terse A.; Cho A., et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. Matrix Biol. 28(4) (May 2009): 221-229.

- [9] MacDougall M.; Zeichner-David M., Slavkin H. C. Production and characterization of antibodies against murine dentine phosphoprotein. Biochem J. 232(2) (Dec 1985): 493-500.
- [10] Veis A., Perry A. The phosphoprotein of the dentin matrix. Biochemistry. 6(8) (Aug 1967): 2409-2416.
- [11] Dimuzio M. T., Veis A. The biosynthesis of phosphophoryns and dentin collagen in the continuously erupting rat incisor. J Biol Chem. 253(19) (Oct 1978): 6845-6852.
- [12] Ritchie H. H.; Pinero G. J.; Hou H., Butler W. T. Molecular analysis of rat dentin sialoprotein. Connect Tissue Res. 33(1-3) (1995): 73-79.
- [13] Wei X.; Ling J.; Wu L.; Liu L., Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. J Endod. 33(6) (Jun 2007): 703-708.
- [14] Couble M. L.; Farges J. C.; Bleicher F.; Perrat-Mabillon B.; Boudeulle M., Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. Calcif Tissue Int. 66(2) (Feb 2000): 129-138.
- [15] Qin C.; Baba O., Butler W. T. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 15(3) (2004): 126-136.
- [16] MacDougall M.; Dong J., Acevedo A. C. Molecular basis of human dentin diseases. Am J Med Genet A. 140(23) (Dec 2006): 2536-2546.
- [17] MacDougall M. Refined mapping of the human dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene within the critical dentinogenesis imperfecta type II and dentin dysplasia type II loci. Eur J Oral Sci. 106 Suppl 1 (Jan 1998): 227-233.
- [18] Zhang X.; Zhao J.; Li C.; Gao S.; Qiu C.; Liu P., et al. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. Nat Genet. 27(2) (Feb 2001): 151-152.
- [19] Goldberg M., Smith A. J. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 15(1) (2004): 13-27.

- [20] Dramond R.D. S. H. R., Swerdlow H. Reparative dentin formation resulting from the cavity preparation. J prosthet Dent 16 (1966): 1127.
- [21] Nadiri A.; Kuchler-Bopp S.; Perrin-Schmitt F., Lesot H. Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar. Cell Tissue Res. 324(1) (Apr 2006): 33-40.
- [22] Chen D.; Zhao M., Mundy G. R. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. 22(4) (Dec 2004): 233-241.
- [23] Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. J Dent Res. 73(9) (Sep 1994): 1515-1522.
- [24] Lianjia Y.; Yuhao G., White F. H. Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. Clin Orthop Relat Res(295) (Oct 1993): 305-312.
- [25] Camilleri S., McDonald F. Runx2 and dental development. Eur J Oral Sci. 114(5) (Oct 2006): 361-373.
- [26] Zhang W., Liu H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 12(1) (Mar 2002): 9-18.
- [27] Rubinfeld H., Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. Mol Biotechnol. 31(2) (Oct 2005): 151-174.
- [28] Cobb M. H. MAP kinase pathways. Prog Biophys Mol Biol. 71(3-4) (1999): 479-500.
- [29] Gruber R.; Jindra C.; Kandler B.; Watzak G.; Fischer M. B., Watzek G. Proliferation of dental pulp fibroblasts in response to thrombin involves mitogen-activated protein kinase signalling. Int Endod J. 37(2) (Feb 2004): 145-150.
- [30] Wang F. M.; Hu T., Zhou X. p38 mitogen-activated protein kinase and alkaline phosphatase in human dental pulp cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 102(1) (Jul 2006): 114-118.
- [31] Ye L.; Peng L.; Tan H., Zhou X. HGF enhanced proliferation and differentiation of dental pulp cells. J Endod. 32(8) (Aug 2006): 736-741.

- [32] Lee S. K.; Lee C. Y.; Kook Y. A., Kim E. C. Mechanical stress promotes odontoblastic differentiation via the heme oxygenase-1 pathway in human dental pulp cell line. Life Sci. 86(3-4) (Jan 2010): 107-114.
- [33] Hamman J. H. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. Molecules. 13(8) (2008): 1599-1616.
- [34] Grindlay D., Reynolds T. The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. J Ethnopharmacol. 16(2-3) (Jun 1986): 117-151.
- [35] Chung S. C. a. M.-H. A review on the relationship between Aloe vera components and hir biologic effects. Seminars in Integrative Medicine 1(1) (2003): 53-62.
- [36] Yagi A.; Egusa T.; Arase M.; Tanabe M., Tsuji H. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells in vitro from Aloe vera gel. Planta Med. 63(1) (Feb 1997): 18-21.
- [37] Beatriz Vfizquez G. A., David Segura ,Bruno Escalante. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. Journal of Ethnopharmacology. 55 (1996): 69-75.
- [38] Bouthet CF S. V., Winter WD. Stimulation of neuron like cell growth by aloe substances. Phytother Res. 9 (1995): 185-188.
- [39] กนกนั้ดา ตะเวทีกุล; กุลวดี เหมกฤษกร, พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล. สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นดอทีทนต์ และเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน. วทันต จุฬา. 27 (2003): 47-57.
- [40] Vipismakul V., Thunyakitpisal, P . Effect of aloe vera gel extract and exudate on the proloferation of osteoblasts isolated from rat bone marrow and osteoblastic cell line MC3T3-E1. CU Dent J. 28 (2005): 127-136.
- [41] Wongwerawinit L. In vitro Effect of Aloe vera on cell proliferation and collagen synthesis of rat dental pulp cells. . Bangkok: Mahidol university; 2004.

- [42] Lec JK L. M., Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, et al. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cell. Int Immunopharmacol (2001): 1275-1285.
- [43] Jittapiromsak N. J. S., Lardungdee P., Sangvanich P., Thanyakitpibal P. Effect of Acemannan on BMP-2 Expression in Primary Pulpal Fibroblasts And Periodontal Fibroblasts, in vitro Study. J Oral Tissue Engin. 4(3) (2007): 149-154.
- [44] Yongchaitrakul T., Pavasant P. Transforming growth factor-beta1 up-regulates the expression of nerve growth factor through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in dental pulp cells. Eur J Oral Sci. 115(1) (Feb 2007): 57-63.
- [45] Final report on the safety assessment of Aloe Andongensis Extract, Aloe Andongensis Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Extract, Aloe Arborescens Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Protoplasts, Aloe Barbadensis Flower Extract, Aloe Barbadensis Leaf, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Aloe Barbadensis Leaf Polysaccharides, Aloe Barbadensis Leaf Water, Aloe Ferox Leaf Extract, Aloe Ferox Leaf Juice, and Aloe Ferox Leaf Juice Extract. Int J Toxicol. 26 Suppl 2 (2007): 1-50.
- [46] Liu S.; Ding J.; Fan Q., Zhang H. The activation of extracellular signal-regulated kinase is responsible for podocyte injury. Mol Biol Rep. 37(5) (Jun 2010): 2477-2484.
- [47] Zhao X.; He W.; Song Z.; Tong Z.; Li S., Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. Mol Biol Rep. 39(1) (Jan 2011): 215-220.
- [48] Herlaar E., Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. Mol Med Today. 5(10) (Oct 1999): 439-447.

- [49] Qin W.; Lin Z. M.; Deng R.; Li D. D.; Song Z.; Tian Y. G., et al. p38a MAPK is involved in BMP-2-induced odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. Int Endod J. 45(3) (Mar 2012): 224-233.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารอะซีแมนแนนต่อเกิดปฏิกิริยาของ ERK1/2

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		control	acemannan	acemannan.U01 26	U0126
N		3	3	3	3
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	12.517780	20.578600	2.899367	1.486167
	Std. Deviation	1.1950010	1.0400828	1.4637957	.5708392
Most Extreme Differences	Absolute	.222	.291	.362	.352
	Positive	.189	.291	.362	.352
	Negative	-.222	-.211	-.261	-.252
Kolmogorov-Smirnov Z		.385	.505	.627	.610
Asymp. Sig. (2-tailed)		.998	.961	.827	.851

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
control vs acemannan	-8.061	8.849	Yes	***	-11.23 to -4.892
control vs acemannan+U0126	9.618	10.56	Yes	***	6.449 to 12.79
control vs U0126	11.03	12.11	Yes	***	7.863 to 14.20
acemannan vs acemannan+U0126	17.68	19.41	Yes	***	14.51 to 20.85
acemannan vs U0126	19.09	20.96	Yes	***	15.92 to 22.26
acemannan+U0126 vs U0126	1.413	1.551	No	ns	-1.756 to 4.582



ภาคผนวก ข. แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารอะซีแมนแนนต่อเกิดปฏิกิริยาของ JNKs

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		control	acemanna n	acemannan. SP600125	SP600125
N		3	3	3	3
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.303200	.836395	.453260	.261195
	Std. Deviation	.1443406	.2826498	.1188357	.0460568
Most Extreme Differences	Absolute	.338	.350	.359	.356
	Positive	.338	.350	.359	.356
	Negative	-.242	-.251	-.258	-.256
Kolmogorov-Smirnov Z		.586	.606	.621	.617
Asymp. Sig. (2-tailed)		.882	.856	.835	.842

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
control vs acemannan	-0.5332	3.819	Yes	*	-1.019 to - 0.04744
control vs acemannan+SP600125	-0.1501	1.075	No	ns	-0.6358 to 0.3357
control vs SP600125	0.04200	0.3008	No	ns	-0.4437 to 0.5277
acemannan vs acemannan+SP600125	0.3831	2.744	No	ns	-0.1026 to 0.8688
acemannan vs SP600125	0.5752	4.119	Yes	*	0.08944 to 1.061
acemannan+SP600125 vs SP600125	0.1921	1.376	No	ns	-0.2937 to 0.6778

ภาคผนวก ค. แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารอะซีแมนแนนต่อเกิดปฏิกิริยาของ p38MAPK

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		control	acemannan	acemannan. SB203580	SB203580
N		3	3	3	3
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.028967	.090284	.045431	.021746
	Std. Deviation	.0114895	.0287765	.0222435	.0157748
Most Extreme Differences	Absolute	.382	.309	.253	.337
	Positive	.280	.309	.253	.337
	Negative	-.382	-.222	-.196	-.240
Kolmogorov-Smirnov Z		.662	.535	.438	.583
Asymp. Sig. (2-tailed)		.773	.937	.991	.886

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
control vs acemannan	-0.06129	3.638	Yes	*	-0.1199 to -0.002676
control vs acemannan+SB20538	-0.01647	0.9776	No	ns	-0.07508 to 0.04214
control vs SB20538	0.007229	0.4291	No	ns	-0.05138 to 0.06584
acemannan vs acemannan+SB20538	0.04482	2.660	No	ns	-0.01380 to 0.1034
acemannan vs SB20538	0.06852	4.067	Yes	*	0.009905 to 0.1271
acemannan+SB20538 vs SB20538	0.02370	1.407	No	ns	-0.03491 to 0.08231

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิสาภานต์ บุญไพศาลเสรี เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน 2521 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโทแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 ได้เข้ารับราชการใน ตำแหน่ง อาจารย์ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี ในปี พ.ศ. 2548-2551

ปัจจุบันศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย