



รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

ผลของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเดกซาเมทาโซน
ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

โดย

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิ์ ภาสันต์
ทัศนีย์ ตรงค์สุวรรณ

มีนาคม 2542

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ผลของ $1,25(OH)_2D_3$ และเตกซาเมทาโซนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

โดย

ประสิทธิ์ ภาสตันต์

ทัศนีย์ ตรงค์สุวรรณ

มีนาคม 2542

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรของภาควิชาสัตยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย รวมทั้งขอขอบคุณ Dr. Charles B. Underhill, Georgetown University ที่กรุณาให้เนื้อเยื่อฟันหนู และโมนิโคลนัลแอนติบอดีต่อซีดี44ของหนู และท้ายที่สุดขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ชื่อโครงการวิจัย : ผลของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และ เดกซาเมทาโซนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์
- ชื่อผู้วิจัย : ประสิทธิ์ ภาวสันต์
ทัศนีย์ ตรงศรีสุวรรณ
- เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ : มีนาคม 2542

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ต่อ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเดกซาเมทาโซน โดยเฉพาะในแง่ของการเปลี่ยนแปลงของซีดี 44 และอัลฟา 5 เบตา 1 อินติกริน ทั้ง $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเดกซาเมทาโซนสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ แต่ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จะลดการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในขณะที่เดกซาเมทาโซนจะเพิ่มการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 เมื่อกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 12 วัน ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างของระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์หลังการกระตุ้น นอกจากนี้ ระดับของซีดี 44 และ อัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินจะลดลงเมื่อกระตุ้นด้วยสารทั้งสองเป็นเวลา 12 และ 28 วัน ผลที่ได้สอดคล้องกับการลดลงของซีดี 44 ในเซลล์สร้างเนื้อฟันของหนูเมื่อวิเคราะห์ด้วยการย้อมด้วยแอนติบอดี และสอดคล้องกับการลดลงของซีดี 44 และอัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินในเนื้อเยื่อโพรงฟัน เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อกลางโพรงฟัน โดยใช้การวิเคราะห์แบบเวสเทอรัล โดยสรุป $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเดกซาเมทาโซนสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันในเซลล์เพาะเลี้ยง และสามารถใช้ในการลดลงของซีดี 44 และอัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินเป็นตัวกำหนดในการเปลี่ยนแปลงนี้ได้

Project Title : The effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dexamethasone on human pulpal fibroblasts *in vitro*.

Name of Investigators : Prasit Pavasant

Tussanee Darongsuwan

Year : March 1999

Abstract

The purpose of this investigation is to study the response of cultured human pulpal fibroblasts to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dexamethasone, especially the changes in CD44 and alpha5beta1 integrin. Both $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dexamethasone can increase the level of alkaline phosphatase activity in these cells, but, while dexamethasone increases collagen type I synthesis, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ decreases the synthesis of collagen type I after 12-day period of incubation. This result indicates the different stages of differentiation in these cells after incubated with either $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or dexamethasone. In addition, both $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dexamethasone decrease the level of CD44 and alpha5beta1 integrin expression in these cells after 12 and 28-day period of incubation. The decrease of CD44 and alpha5beta1 integrin corresponds with the absence of CD44 from odontoblasts in mouse tooth germs, as judged by immunohistochemical study, and with the decrease of CD44 and alpha5beta1 integrin in the extract from peripheral and central portions of human pulp, as judged by Western analysis. In conclusion, both $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dexamethasone can alter the differentiation stage of pulpal cells in culture and the decreased level of CD44 and alpha5beta1 integrin can be used as a marker of differentiation in these cells.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการ	4
ผลการทดลอง	11
สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	14
เอกสารอ้างอิง	18



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. ซีดี44ในหน่อพื้ของหนู	24
2. ผลการวิเคราะห์แบบเวสเตอร์แมนแสดงซีดี44 และอัลฟา5เบตา1อินติกรินของเนื้อเยื่อโพรงพื้	25
3. ภาพถ่ายแสดงเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงพื้	26
4. กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอดหลังการถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่	27
5A กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับการย้อมสีเมทิลีนบลู	28
5B กราฟแสดงอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงพื้	29
6. กราฟแสดงระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงพื้	30
7. การวิเคราะห์ปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยการวิเคราะห์แบบดอท-บลอต	31
8. การเปลี่ยนแปลงของซีดี44ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงพื้	32
9. การเปลี่ยนแปลงของอัลฟา5เบตา1อินติกรินในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงพื้	33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (pulpal fibroblasts) เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการดิฟเฟอเรนซิเอต (differentiate) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างและซ่อมแซมเนื้อฟัน (dentin) เมื่อมีอันตรายเกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อโพรงฟัน¹⁻² ความเข้าใจในกลไกของกระบวนการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์เหล่านี้ในการเปลี่ยนหน้าที่จากเซลล์สร้างเส้นใยไปเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ (calcified tissue) จะเป็นส่วนสำคัญที่สามารถนำมาช่วยในการปรับปรุงประสิทธิภาพในการรักษาทางทันตกรรม อย่างไรก็ตาม งานวิจัยเกี่ยวกับเซลล์โพรงฟันส่วนใหญ่ยังคงเน้นการแสดงถึงศักยภาพของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดยที่ยังไม่มีการศึกษามากนักในแง่ของดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์

คุณสมบัติประการหนึ่งที่สนับสนุนความสามารถของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ คือความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase)³ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการจับกลุ่มฟอสเฟต และพบได้มากในเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast)¹⁰⁻¹³ โดยมีรายงานว่าเซลล์ที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะมีความสามารถสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม¹⁴ ดังนั้น ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสนี้ จึงกลายเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งในการวัดความสามารถของเซลล์ในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์

เซลล์จากโพรงฟัน ยังสามารถเพิ่มระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) บางชนิด และ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁵⁻⁹ ซึ่งเป็นความสามารถที่คล้ายคลึงกับที่มีรายงานในเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูก¹⁰⁻¹³ และจากเนื้อเยื่อไขกระดูก (bone marrow)¹⁵⁻¹⁶ (เซลล์ไขกระดูกจะประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถดิฟเฟอเรนซิเอตเป็นเซลล์กระดูก) ซึ่งสนับสนุนคุณลักษณะของเซลล์โพรงฟันที่คล้ายกับเซลล์กระดูก

เพื่อเป็นการแสดงว่าเซลล์เหล่านี้ สามารถสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ได้จริงในหลอดทดลอง Kasugai และคณะ¹⁷ ได้ทำการเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันไปเป็นเวลาประมาณ 28-30 วันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม และพบว่าเซลล์เหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียม

ฟอสเฟตโดยรอบเซลล์ได้ ซึ่งเป็นรายงานสำคัญที่ยืนยันความสามารถของเซลล์เหล่านี้ในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์

รายงานที่สนับสนุนถึงความสามารถของเซลล์โพรงฟันในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ที่กล่าวถึงข้างต้น น่าจะสนับสนุนความสามารถของเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน ในการเป็นตัวแทนของเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับดีฟเฟอเรนซ์เอชชันของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยมุ่งไปที่การเปลี่ยนแปลงของรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ (cell surface receptor) บางชนิด ที่อาจนำมาใช้เป็นตัวกำหนด (marker) ระดับของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้

รีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ที่คณะผู้วิจัยเลือกศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ มีอยู่ 2 ชนิดคือ ซีดี44 (CD44) และอัลฟา5เบตา1อินติกริน (alpha5beta1 integrin) โดยที่ซีดี44 เป็นรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ที่พบในเซลล์เกือบทุกชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์สร้างกระดูก¹⁸⁻²⁰ และยังมีหลักฐานว่าระดับของซีดี44จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเซลล์กระดูกมีการเปลี่ยนระดับของแมตูเรชัน (maturation stage) คือในระยะที่ยังคงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก (osteoprogenitor cells) จะพบซีดี44บนผิวเซลล์²⁰ แต่จะหายไปเมื่อเซลล์ดีฟเฟอเรนซ์เอชชันเข้าสู่ระยะที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกที่สมบูรณ์ (mature osteoblast) และจะกลับปรากฏขึ้นอีกครั้งหนึ่งเมื่อเซลล์ดีฟเฟอเรนซ์เอชชันเป็นเซลล์ออสติโอไซต์ (osteocytes) ที่อยู่ภายในเนื้อกระดูก¹⁹⁻²⁰ และเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับของแมตูเรชันที่คล้ายคลึงกับในกระดูก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบการเปลี่ยนแปลงของซีดี44 ในลักษณะที่คล้ายคลึงกันด้วย

ส่วนอัลฟา5เบตา1อินติกริน ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของกลุ่มโปรตีนอินติกรินที่ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ต่อเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) หลายชนิด โดยอัลฟา5เบตา1อินติกริน จะทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ต่อไฟโบรเนกติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในเมทริกซ์นอกเซลล์โดยทั่วไป²¹ และแม้ว่าจะมีรายงานในเซลล์กระดูก ว่าระดับของการสร้างไฟโบรเนกตินจะลดลงเมื่อเซลล์กระดูกเปลี่ยนแปลงเข้าใกล้ระยะที่สามารถสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์²¹ ในขณะที่ยังไม่มีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของอัลฟา5เบ

ตา1อินติกรินในระหว่างกระบวนการดังกล่าวในระหว่างการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาการเปลี่ยนแปลงของของรีเซพเตอร์ตัวนี้ควบคู่ไปกับการเปลี่ยนแปลงของซีดี44

นอกจากการเปลี่ยนแปลงของรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แล้ว คณะผู้วิจัยจะได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I (collagen type I) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในเนื้อฟันและในกระดูก¹ ควบคู่ไปกับการเปลี่ยนแปลงของซีดี44และอัลฟา5เบตา1อินติกรินที่คาดว่าจะเกิดขึ้นด้วย

ในการศึกษากลไกการเกิดเนื้อเยื่ออินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ เซลล์เพาะเลี้ยงจะต้องได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งคณะผู้วิจัยเลือกใช้สารสองชนิด คือ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเตกซาเมทาโซนมาใช้ในการกระตุ้นเซลล์โพรงฟัน ในส่วนของเตกซาเมทาโซนนั้น จะเป็นสารสเตียรอยด์สังเคราะห์ (synthetic steroid) ในกลุ่มของกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) ที่มีรายงานว่าจำเป็นสำหรับการกระตุ้นแมทูเรชันของเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูก²²⁻²⁵, ไขกระดูก²⁶, และเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cells)²⁷⁻²⁹ ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดถึงกลไกการกระตุ้นแมทูเรชันของเซลล์ดังกล่าวข้างต้น แต่จากการที่เซลล์โพรงฟันมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์กระดูกและเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ในแง่ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่สร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่เซลล์โพรงฟันจะสามารถตอบสนองต่อเตกซาเมทาโซนในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

ส่วน $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ นั้น เป็นแอคทีฟเมตาโบไลต์ (active metabolite) ของวิตามินดี ที่มีบทบาทอย่างมากในการควบคุมสมดุลย์ของระดับแคลเซียม (calcium homeostasis) ในร่างกาย การกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast)³⁰⁻³¹ และมีบทบาทในเมแทบอลิซึม (metabolism) ของกระดูกและฟัน โดยเฉพาะในการตกตะกอนของสารอินทรีย์ในกระดูกและฟัน³¹⁻³⁵ ผลของการขาดวิตามินดี นอกจากจะก่อให้เกิดโรคกระดูกอ่อน (rickets) แล้ว ยังทำให้เกิดสภาวะพร่องของการตกตะกอนของสารอินทรีย์ (hypocalcification) ของเนื้อฟันด้วย ในขณะที่ระดับที่สูงเกินไปของ $1,25$

(OH)₂D₃ จะทำให้เกิดความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟันและการเรียงตัวของเดนทินออลทิวบูล (dental tubule)³⁴

ความสำคัญของ 1,25(OH)₂D₃ ที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์โพรงฟัน ได้จากรายงานทั้งในสัตว์ทดลองและในห้องปฏิบัติการ โดยรายงานในสัตว์ทดลอง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันน่าจะเป็นเซลล์หลักกลุ่มหนึ่งในการตอบสนองต่อ 1,25(OH)₂D₃ เนื่องจากพบการสะสมของ 1,25(OH)₂D₃ ที่ถูกฉีดเข้าสู่ร่างกาย³⁵⁻³⁷ และรายงานในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารตัวนี้จะสามารถเพิ่มการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส⁸⁻⁹ และออสติโอพอนทินในเซลล์โพรงฟัน³⁸ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์

วัสดุและวิธีการทดลอง

การเตรียมเนื้อเยื่อฟันจากหนู

เนื้อเยื่อฟันเตรียมจากหนูสายพันธุ์ CF1 (Charles River, USA) ที่มีอายุได้ 4 วัน หนูจะถูกฆ่าโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก่อนที่จะแยกส่วนขากรรไกรล่างออกไปแช่ในฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 3.7 เป็นเวลา 1 ชม เมื่อครบกำหนดเวลา เนื้อเยื่อขากรรไกรล่างถูกนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายด์ (Phosphate buffer saline) 3-4 ครั้ง จากนั้นจึงแช่ในสารละลายอีดีทีเอ (EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 7 วัน เพื่อกำจัดแคลเซียมออกจากกระดูกและฟัน จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) และฝัง (embedded) ในโพลีเอสเตอร์แว็กซ์ (polyester wax) (BDH, UK) ชิ้นเนื้อที่ฝังเสร็จแล้วจะถูกนำไปตัดเป็นแผ่น (sectioning) หนา 5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และซ้อนทับบนแผ่นกระจก (glass slide) ที่เคลือบด้วยอัลบูมิน (albumin) จากนั้นจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

การย้อมแผ่นเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีต่อซีดี 44

นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้มาแช่ในอัลกอฮอล์ เพื่อกำจัดโพลีเอสเตอร์แว็กซ์ แล้วแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อกำจัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสภายในเซลล์ (endogenous peroxidase) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะนำไปย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อซีดี 44 ที่ติดสลาไกไบโอติน (rat monoclonal biotinylated-antibody, clone KM201) ที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมต่อด้วยสเตรปตาวิดินที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (HRP-peroxidase) จากนั้นจึงหยดสารละลาย 3-อะมิโน-9-เอทิล-คาร์บาโซล (3-amino-9-ethyl-carbazole) ในไดเมทิลฟอร์มามายด์ (N,N'-Dimethyl formamide) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เกิดเป็นสีแดงบนแผ่นเนื้อเยื่อ จากนั้นจึงย้อม (counterstaining) ด้วยฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) แล้วเคลือบด้วยคริสตัลเมาท์ (Crystal Mount; Biomed, USA) ก่อนจะปิดทับด้วยแผ่นแก้ว (cover glass)

แผ่นเนื้อเยื่ออีกแผ่นหนึ่งจะนำมาย้อมด้วยไอจีจีของหนู (mouse IgG) ที่ความเข้มข้นเท่ากับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ และย้อมต่อด้วยวิธีการเดียวกับข้างต้น เพื่อแสดงระดับของสีแดงที่อาจเกิดขึ้นจากการผลของแอนติบอดีทุติยภูมิและสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

การเตรียมเนื้อเยื่อฟันจากคนไข้

เนื้อเยื่อโพรงฟันได้จากผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเป็นการถอนฟันคุดหรือถอนฟันกรามน้อยเพื่อการจัดฟัน และไม่พบรอยโรคทั้งของฟันและเหงือกรอบฟันที่ถอนนั้น

ฟันที่ได้มาจะถูกล้างด้วยเซลาซันด์ฟลูออไรด์ 2-3 ครั้ง แล้วจึงตัดส่วนรากฟันออกจากตัวฟัน เนื้อเยื่อโพรงฟันที่อยู่ในส่วนของตัวฟันจะถูกดึงออกมาด้วยปากคีบ (forcep) แล้วนำไปบดด้วยแท่งแก้วในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารละลายเอสดีเอสร้อยละ 5 (5% SDS) จากนั้นจึงนำไปเข้า

เครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ละลายในสารละลายเอสตีเอสออกมา แล้วเก็บเฉพาะส่วนที่ละลายไว้ และจะเรียกโปรตีนในส่วนนี้ว่า เนื้อเยื่อกลางโพรงฟัน (central pulp)

ภายหลังจากที่ดึงเอาเนื้อเยื่อกลางโพรงฟันออกไปแล้ว ส่วนของโพรงฟัน (pulp chamber) จะถูกนำมาขูดด้วยเครื่องมือทางทันตกรรม (Curette) เพื่อขูดส่วนของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ยังคงติดอยู่กับเนื้อฟัน (dentin) แล้วนำมาละลายในสารละลายเอสตีเอส เช่นเดียวกับข้างต้น และจะเรียกโปรตีนในส่วนนี้ว่า เนื้อเยื่อผิวโพรงฟัน (peripheral pulp)

การวิเคราะห์ปริมาณ ซีตี44 และ อัลฟา5เบตา1อินติกริน จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

โปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อโพรงฟันทั้งสองส่วนดังกล่าวข้างต้น จะถูกแบ่งออกมาส่วหนึ่งเพื่อนำมาวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน DC Protein Assay (Bio Rad, USA) โดยใช้โปรตีนอัลบูมิน (albumin) เป็นมาตรฐาน

โปรตีนอีกส่วนหนึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์หาระดับของซีตี44 และอัลฟา5เบตา1อินติกริน ด้วยเทคนิควิเคราะห์แบบเวสเทอร์น (Western analysis) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ การแยกโปรตีนที่ได้ด้วยด้วยไฟฟ้า (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) ในแผ่นอะคริลามายด์เจล (acrylamide gel) ที่มีปริมาณอะคริลามายด์ร้อยละ 7.5 แล้วย้ายโปรตีนจากแผ่นอะคริลามายด์เจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose-1; Gibco, USA) ด้วยไฟฟ้า นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาย้อมด้วยด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อซีตี44 (rat monoclonal antibody, clone 1M7.8.1, Zymed, USA) ที่ความเข้มข้น 1:1,000 หรือโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลฟา5เบตา1อินติกริน (rabbit polyclonal antibody, Gibco, USA) ที่ความเข้มข้น 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้อมต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดสลากไบโอติน (biotinylated secondary antibody against rat or rabbit IgG, Zymed, USA) ที่ความเข้มข้น 1:4,000 และสเตรปตาวิดินที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (HRP-streptavidin) ที่ความเข้มข้น 1:500 อีกครั้งละ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำมาแช่สารละลาย 3-อะมิโน-9-เอทิล-

คาร์บาโซล เช่นเดียวกับข้างต้น เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกิดเป็นสีแดงบนแผ่นใน
 โตรเซลล์โลส

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เนื้อเยื่อโพรงฟันได้จากฟันของผู้ป่วยที่มาถอนดังกล่าวแล้วข้างต้น ส่วนของรากฟันจะถูกตัด
 ออก แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง จากนั้นใช้ปากคีบที่ปราศจาก
 เชื้อดึงเอาเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมา หั่นออกเป็นชิ้นเล็กๆ และวางลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง
 กลาง 6 เซนติเมตร (60 mm-Nunc tissue culture dish, Denmark) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มเอ็ม
 เอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ
 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotic) และเพาะเลี้ยง
 ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ
 ร้อยละ 5

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนเซลล์สร้างเส้นใยเคลื่อนตัวออกจากชั้นเนื้อที่เลี้ยงไว้
 และเจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ (confluence) แล้วจึงทำการถ่าย (subculture) เซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์
 ใหม่ โดยถ่ายที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2.5×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร และเริ่มบันทึกวันที่ของ
 เซลล์ โดยเริ่มจากรุ่นที่ 1

การศึกษาอัตราการตายจากการถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงใหม่ และ อัตราการเจริญของเซลล์

เซลล์ในแต่ละรุ่นจะถูกนำไปวิเคราะห์หาอัตราการตายจากการถ่ายเซลล์ โดยการย้อมด้วยสีทริป
 แพนบลู (trypan blue) ซึ่งจะย้อมติดเฉพาะเซลล์ตายเท่านั้น โดยมีวิธีการเริ่มจากการใช้เอนไซม์ทริป
 ซิน (trypsin) แยกเซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงแบ่งเซลล์
 ส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสารละลายของสีทริปแพนบลูความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ในแอ่งคัลบาลานส์ซอลโซลูชัน

(Hank's balance salt solution) เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างเซลล์ที่ติดสีกับเซลล์ทั้งหมดที่นับได้

นำเซลล์รื้อที่มีอัตราการตายจากการถ่ายเซลล์ที่ต่ำและสม่ำเสมอ มาศึกษาอัตราการเจริญ โดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene Blue)³⁹ ซึ่งมีวิธีการเริ่มด้วยการถ่ายเซลล์ที่ทราบจำนวน ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24 wellplate, Nunc, Denmark) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นตรึง (fixed) เซลล์ในจานเลี้ยง ด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 3.7 เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (Borate buffer) หลายๆ ครั้ง แล้วย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูความเข้มข้นร้อยละ 1 ในบอเรตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ และละลายสีที่ติดเซลล์ออกด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและอัลกอฮอล์สัดส่วน 1:1 สารละลายสีนี้จะถูกนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, model UV-1201V, shimadzu) ที่ความยาวคลื่นแสง 667.5 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มากำหนดเป็นกราฟมาตรฐาน

ในการทดลอง เซลล์จำนวน 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร จะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมและเลี้ยงไปเป็นเวลา 1-4 วัน แล้วจึงหาจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิคข้างต้น เพื่อศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ การทดลองทั้งหมดจะทำในลักษณะซ้ำสาม (TriPLICATE) และแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และ เดกซาเมทาโซน

เซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันถูกถ่ายในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร/หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนข้างต้น จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อหยุดกิจกรรม (activity) ของเซลล์ แล้วจึงกระตุ้นเซลล์เป็นระยะเวลาต่างๆกัน โดยการเติม $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือเดกซาเมทาโซน ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^{-8} โมลาร์ และ 250 นาโนกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้จะมีปริมาณซีรัมร้อยละ 5 และมีปริมาณของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) 50

ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุม จะถูกเลี้ยงในลักษณะเดียวกัน โดยเติมสารละลายที่ใช้ทำละลายสารกระตุ้นทั้งสองตัวข้างต้นในปริมาณที่เท่ากัน

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายและถูกกระตุ้นตามวิธีการข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity assay) โดยใช้วิธีการที่รายงานโดย Orly และคณะ⁴⁰ ซึ่งมีวิธีการโดยย่อ คือ ล้างเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer) ที่เตรียมจากส่วนผสมของทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton-X-100) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และมีความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 10 ลงในแต่ละหลุมพร้อมทั้งขูดก้นหลุม (scrape) หลายๆ ครั้งเพื่อให้เซลล์ละลายได้ดีขึ้น

นำสารละลายเซลล์นี้มาทำการวัดเอนไซม์โดยการผสมกับสารละลายของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate) ที่ประกอบด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต, 0.1 โมลาร์ของ 2-อมีโน-2-เมทิล-1-โพรพานอล (2-amino-2-methyl-1-propanol), 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ และมีความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 10.5 โดยที่พาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตจะเป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส หลังจากนั้นจึงนำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตรฟีนิล (p-nitrophenol) ที่เป็นสารที่มีสี เมื่อสังเกตว่าสารละลายที่บ่มไว้มีความเข้มของสีที่เหมาะสม (โดยเปรียบเทียบกับสีของสารละลายพาราไนโตรฟีนิลที่ใช้เป็นมาตรฐาน) ปฏิกริยาจะถูกหยุดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเป็นค่าการทำงานของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ สารละลายพาราไนโตรฟีนิลที่ใช้เป็นมาตรฐาน ค่าการทำงาน

ของเอนไซม์จะคำนวณเป็นนาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที แล้วปรับเป็นร้อยละโดยให้เอนไซม์ของกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100

การวัดปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ I

เซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มี $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือ เดกซาเมทาโซนตามที่อธิบายไว้ข้างต้นเป็นเวลา 7 และ 12 วัน จากนั้นสกัดเมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยสารละลายกาวอนิตินไฮโดรคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 4 โมลาร์ (4 M Gaunidine hydrochloride) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

สารละลายส่วนหนึ่งถูกแบ่งออกมาเพื่อนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดวัดโปรตีน BCA Protein Assay (Pierce, USA) สารละลายส่วนที่เหลือจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ I ด้วยวิธีดอท-บลอต-อานาไลซิส (dot-blot analysis) โดยการนำเอาสารละลายนี้ มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสในเครื่อง Bio-Dot Apparatus (Bio-Rad, USA) จากนั้นย้อมแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อคอลลาเจนชนิดที่ I (mouse monoclonal antibody, clone COL-1; Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดสลาไกโอตินและสเตรปตาวิดินที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตามวิธีคล้ายกับที่กล่าวถึงแล้วข้างต้น ปริมาณของคอลลาเจนจะถูกวิเคราะห์โดยการอ่านความเข้มของสีด้วยเครื่องอ่านความเข้ม (densitometer)

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของซีตี 44 และ อัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินในเซลล์โพรงฟัน

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือ เดกซาเมทาโซนเป็นเวลา 12 และ 28 วัน จากนั้นทำละลายเซลล์ด้วยสารละลายเอสตีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณซีตี 44 และ อัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินตามวิธีการที่อธิบายไว้ข้างต้น ปริมาณของซีตี 44 และ อัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินจะถูกเปรียบเทียบบนฐานของโปรตีนที่เท่ากัน โดยการแบ่งสารละลายเซลล์ไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีที่อธิบายไว้แล้ว

ผลการทดลอง

ตำแหน่งของซีตี44ในเนื้อเยื่อฟัน

รูปที่ 1 เป็นภาพของเนื้อเยื่อฟันจากขากรรไกรล่างของหนูอายุ 4 วัน ย้อมด้วยโมโนโคลนัล แอนติบอดีเพื่อแสดงตำแหน่งของซีตี44 ตำแหน่ง p ในรูปเป็นตำแหน่งของเนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งประกอบด้วยเซลล์สร้างเส้นใยจำนวนมาก และตำแหน่ง o จะเป็นตำแหน่งของเซลล์สร้างเนื้อฟัน ซึ่งเป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (columnar cells) ที่เรียงตัวอยู่ชั้นเดียว และจะทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อฟัน จากรูป 1A จะพบว่าเซลล์ในโพรงฟันจะย้อมติดสีแดง ในขณะที่เซลล์สร้างเนื้อฟันจะย้อมไม่ติด ซึ่งแสดงว่าพบซีตี44ในเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟันแต่ไม่พบในเซลล์สร้างเนื้อฟัน และในรูป 1B จะแสดงความจำเพาะของการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อซีตี44 โดยการย้อมด้วยไอจีจีของหนู ซึ่งจะเห็นว่าไม่มีการติดสีในเนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งเป็นการยืนยันถึงผลของการติดสีในเซลล์โพรงฟัน

ปริมาณของซีตี44 และ อัลฟา5เบตา1อินทิกริน ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เนื้อเยื่อโพรงฟันจากทั้งตอนกลางโพรงฟันและจากส่วนที่ติดผิวโพรงฟันจะถูกทำละลายในสารละลายเอสดีเอส แล้วนำมาผ่านกระบวนการแยกโปรตีนและถ่ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยไฟฟ้า จากนั้นจึงย้อมด้วยแอนติบอดีต่อซีตี44 หรือ อัลฟา5เบตา1อินทิกริน และปรากฏผลดังแสดงในรูปที่ 2A และ 2B

ผลในรูปที่ 2A สอดคล้องกับผลในรูปที่ 1 โดยจะเห็นว่าระดับของซีตี44จากเนื้อเยื่อกลางโพรงฟันจะสูงกว่าระดับที่พบในเนื้อเยื่อผิวโพรงฟันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับระดับโปรตีนที่เท่ากัน ส่วนผลในรูปที่ 2B แสดงถึงความแตกต่างของอัลฟา5เบตา1อินทิกริน ระหว่างเนื้อเยื่อทั้งสองบริเวณที่เป็นไปในการทำงานเดียวกัน คือระดับของโปรตีนอัลฟา5เบตา1อินทิกรินจะลดลงในเนื้อเยื่อผิวโพรงฟัน

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

การเตรียมเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันทำโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อ (explant) จะพบว่าเซลล์เคลื่อนตัวออกจากชิ้นเนื้อภายในเวลา 4-7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3A จากนั้นเซลล์จะเพิ่มจำนวนขึ้นจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายในเวลา 2-3 สัปดาห์ถัดมา และเซลล์ที่ได้ทั้งหมดจะมีลักษณะคล้ายกับเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) คือจะมีรูปร่างเป็นรูปกระสวย (spindle shaped) (รูปที่ 3B) และมีแขนงยื่นออกทางขั้วทั้งสองของเซลล์

เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์แล้ว ก็จะถูกถ่ายไปใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในสัดส่วน 1:3 โดยการถ่ายเซลล์ประมาณ 1 ใน 3 ของเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์เดิมลงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ เซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่จะถูกกำหนดให้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 (passage 1) และเมื่อเซลล์ในรุ่นที่ 1 เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ ก็จะมีการถ่ายใหม่ในลักษณะเดิม ได้เป็นเซลล์รุ่นที่ 2 โดยเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อแต่ละรุ่นจะถูกถ่ายใหม่ไปจนกว่าจะพบว่าเซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป คือจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเริ่มแผ่เป็นแผ่นบาง และมีแขนงมากขึ้น ซึ่งจะผิดไปจากรูปร่างเดิมอย่างชัดเจน โดยจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างนี้ จะเกิดขึ้นในเซลล์ถ่ายใหม่ตั้งแต่รุ่นที่ 9-12 ขึ้นกับรุ่นของเนื้อเยื่อที่ใช้เตรียมเซลล์ และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจะใช้จนถึงรุ่นที่ 7 เท่านั้น

อัตราการตายจากการถ่ายเซลล์ลงจานเลี้ยงใหม่และอัตราการเจริญของเซลล์

เมื่อทำการศึกษาถึงอัตราการตายของเซลล์เมื่อทำการถ่ายเซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยจะทำการศึกษาในการถ่ายเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่เซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์ทั้งหมดประมาณ 1.2-1.3 ล้านเซลล์ พบว่าในเซลล์รุ่นที่ 1 และ 2 จะมีอัตราการตายมากกว่าเซลล์ในรุ่นที่ 3 ถึง 7 เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4 คือเซลล์จะมีการตายประมาณร้อยละ 25-30 ในรุ่นที่ 1 และ 2 ในขณะที่เซลล์รุ่นที่ 3-7 จะมีอัตราการตายประมาณร้อยละ 10-15 ขึ้นกับรุ่นของเนื้อเยื่อที่ใช้

รูปที่ 5A เป็นกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดจำนวนเซลล์ด้วยการย้อมสีเมทิลีนบลู โดยในแกนนอนเป็นจำนวนเซลล์ และแกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 667.5 นาโนเมตร จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แล้วจะมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง โดยมีค่ายกกำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of determination) หรือ r^2 เท่ากับ 0.99

ในการทดลองหาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์จะเริ่มทำในเซลล์รุ่นที่ 3 เป็นต้นไปเนื่องจากเซลล์ในรุ่นที่ 1 และ 2 ยังมีจำนวนไม่มากพอ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองจะนำกลับมาคำนวณจากกราฟมาตรฐานเพื่อให้ได้เป็นจำนวนเซลล์และแสดงผลในรูปที่ 5B จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราการเจริญของเซลล์ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อแต่ละรุ่นจะใกล้เคียงกันมาก โดยเซลล์จะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนขึ้นหนึ่งเท่าตัวเกือบ 48 ชั่วโมงหลังการถ่ายลงจานเลี้ยงใหม่ จากนั้นเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นหนึ่งเท่าตัวใน 24 ชั่วโมงถัดมา อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี เซลล์ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อบางรุ่นจะมีอัตราการเจริญที่ค่อนข้างช้า ซึ่งในกรณีดังกล่าวเซลล์เหล่านั้นจะไม่นำมาใช้ในการทดลอง

ผลของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเดกซาเมทาโซนต่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากรูปที่ 6 จะเห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์ที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อที่มีการตกตะกอนของสารอนินทรีย์

นอกจากนี้เซลล์เพาะเลี้ยงเหล่านี้ยังสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือเดกซาเมทาโซน โดยการเพิ่มระดับของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน จากรูปที่ 6 จะเห็นว่า การตอบสนองที่ 48 ชั่วโมงต่อสารกระตุ้นทั้งสอง จะมีระดับของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก คือมีระดับของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 60 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อกระตุ้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากการกระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซนจะเพิ่มขึ้นมากกว่าสามเท่า ในขณะที่การกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จะเพิ่มระดับของเอนไซม์ประมาณ 2 เท่าจากกลุ่มควบคุมเท่านั้น

ผลของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และ เดกซาเมทาโซนต่อคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ในสภาวะที่มีกรดแอสคอร์บิกในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันจะสามารถสร้างเมทริกซ์ที่มีคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในระดับที่สามารถวัดได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์แบบคอป-บลอท ดังแสดงในรูปที่ 7 จะพบว่า ปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะเพิ่มมากขึ้นจากทั้งในวันที่ 7 และ 12 ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซน โดยจะมีปริมาณเพิ่มมากกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 1.4 เท่า ในขณะที่ผลของการกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จะทำให้เซลล์มีการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ลดลงเหลือเพียงประมาณร้อยละ 30-60 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่การลดลงของคอลลาเจนนี้ จะเห็นผลได้ไม่ชัดเจนในวันที่ 7 แต่จะเห็นได้อย่างชัดเจนในวันที่ 12

การเปลี่ยนแปลงของซิติ44และอัลฟา5เบตา1อินติกรินในเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และ เดกซาเมทาโซนจะมีระดับของซิติ44ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 8 โดยระดับของซิติ44จะลดลงตั้งแต่วันที่ 12 หลังการกระตุ้น และยังคงลดลงเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลานาน 28 วัน และเดกซาเมทาโซนจะให้ผลในการลดระดับของซิติ44 มากกว่า $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

ระดับของอัลฟา5เบตา1อินติกรินในเซลล์เหล่านี้ จะลดลงเมื่อถูกกระตุ้นเช่นเดียวกับซิติ44 ดังแสดงในรูปที่ 9 อย่างไรก็ตาม ผลของการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 12 นั้นยังเห็นได้ไม่ชัดเจน โดยจะเห็นการลดลงได้ชัดเจนขึ้นเมื่อเลี้ยงไปนาน 28 วัน

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในส่วนแรกของงานวิจัยนี้ แสดงถึงความแตกต่างของซิติ44 ซึ่งเป็นโปรตีนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ต่อเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิด ในเนื้อเยื่อฟันของหนู ผลการวิเคราะห์โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อซิติ44 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ในโพรงฟันจะมีซิติ44บนผิวเซลล์ ส่วนเซลล์สร้างเนื้อฟันจะไม่พบซิติ44 การหายไปของซิติ44ในเซลล์สร้างเนื้อฟันอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของ

เซลล์ และอาจสะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงระดับของคิฟเฟอเรนซิเอชันในเซลล์เหล่านี้ด้วย เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนี้ คล้ายกับการเพิ่มปริมาณของซีดี44ในแอกทีฟลิมโฟไซท์ (active lymphocytes)⁴¹ หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน (antigen) ซึ่งเชื่อกันว่าซีดี44ในลิมโฟไซท์จะทำหน้าที่ในการเกาะของลิมโฟไซท์กับผนังของหลอดเลือด¹⁸

ในกรณีของเซลล์โพรงฟัน ซีดี44ที่พบในเซลล์เหล่านี้ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับซีดี44ที่พบในเซลล์สร้างเส้นใยทั่วไป¹⁸ และอาจเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ การหายไปของซีดี44ในเซลล์สร้างเนื้อฟันอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณของเมทริกซ์นอกเซลล์ เนื่องจากเซลล์สร้างเนื้อฟันนั้น นอกจากจะทำหน้าที่แตกต่างจากเซลล์โพรงฟันทั่วไปแล้ว เซลล์เหล่านี้ยังมีรูปร่างและการเรียงตัวที่ต่างออกไปด้วย โดยจะมีรูปร่างเป็นเซลล์เหลี่ยม (columnar cells) และเรียงตัวเป็นแถวคล้ายกับเซลล์บุผิว (epithelial cells) การเปลี่ยนแปลงนี้น่าจะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนผิวเซลล์เพื่อให้สอดคล้องกับสภาวะแวดล้อมและหน้าที่ที่เปลี่ยนแปลงไป

เพื่อเป็นการยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงของซีดี44ในเซลล์สร้างเนื้อฟัน คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์แบบเวสเทอร์น เพื่อเปรียบเทียบระดับของซีดี44ในเนื้อเยื่อกลางโพรงฟัน และเนื้อเยื่อผิวโพรงฟัน โดยวิธีการแยกเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนนี้ออกจากกัน ได้ตัดแปลงจากรายงานของ Chadha และ Bishop⁴² ที่แสดงว่าการดึงเนื้อเยื่อโพรงฟันด้วยเครื่องมือดึงนั้น จะดึงออกมาเฉพาะเนื้อเยื่อบริเวณตอนกลางเท่านั้น ในขณะที่เนื้อเยื่อและเซลล์ที่อยู่ติดกับเนื้อฟัน รวมทั้งเซลล์สร้างเนื้อฟันจะยังคงติดอยู่ในโพรงฟัน ดังนั้นแม้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ที่ยังคงติดกับผิวเนื้อฟันจะประกอบด้วยเซลล์โพรงฟันทั่วไปปะปนอยู่บ้าง แต่ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนจากเซลล์สร้างเนื้อฟัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อเซลล์ในบริเวณตอนกลางโพรงฟัน ผลที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าระดับของซีดี44ในกลุ่มเซลล์จากเนื้อเยื่อผิวโพรงฟันจะมีระดับที่ต่ำกว่าอย่างมาก นอกจากนี้ เซลล์จากเนื้อเยื่อผิวโพรงฟันยังมีระดับของอัลฟา5เบตา1อินทิกรินต่ำลงด้วย ซึ่งอาจจะอธิบายได้ในทำนองเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของซีดี44ข้างต้น ในแง่ของการเปลี่ยนแปลงของเมทริกซ์นอกเซลล์พร้อมๆกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์ ดังนั้นการลดลงของระดับของโปรตีนผิวเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ น่าจะใช้เป็นตัวกำหนดการ

เปลี่ยนแปลงระดับดิวเฟอเรนซีเอชันของเซลล์โพรงฟันได้ อย่างไรก็ตาม ข้อเสนอนี้ ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะการหาความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของซีดี44 กับการเปลี่ยนแปลงของเมทริกซ์นอกเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ต่อไป

ในส่วนที่สองของงานวิจัย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์จากโพรงประสาทฟันสามารถจะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยได้โดยวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในทางทันตกรรมเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดประการหนึ่งในวิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้ คือเรื่องของเวลา เนื่องจากปริมาณของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ได้มาแต่ละครั้งจะมีไม่มากเพียงพอที่จะใช้วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้เซลล์สำหรับการใช้งานทันที ดังนั้นจึงต้องใช้การเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรอให้เซลล์เคลื่อนตัวออกจากก้อนเนื้อและขยายตัวเพิ่มจำนวนจนได้มากเพียงพอในการนำมาใช้ ซึ่งใช้เวลานานกว่า

คุณสมบัติของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันที่เพาะเลี้ยงในงานวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับผลของกลุ่มวิจัยอื่นๆ ที่แสดงว่าเซลล์เพาะเลี้ยงได้จากโพรงประสาทฟันสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส⁹ และจากรายงานที่ว่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์นี้ จะพบเฉพาะในเซลล์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนของสารอินทรีย์ในเมทริกซ์ที่มันสร้างขึ้น¹⁴ ดังนั้นคุณสมบัตินี้จึงสอดคล้องกับความสามารถของเซลล์ภายในโพรงประสาทฟันในการสร้างเนื้อฟัน

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเตกซาเมทาโซน ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ตัวนี้ได้ในเซลล์ไลน์ที่สร้างจากเนื้อเยื่อของกระดูก¹⁰⁻¹³ และเซลล์เพาะเลี้ยงจากไขกระดูก (ซึ่งสามารถดิวเฟอเรนซีเอทเป็นเซลล์กระดูกได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเตกซาเมทาโซน¹⁵⁻¹⁶) ความสามารถในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเตกซาเมทาโซนของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน จึงน่าจะมีความคล้ายคลึงกับความสามารถของเซลล์เพาะเลี้ยงจากไขกระดูกที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ได้

นอกจากการตอบสนองต่อเตกซาเมทาโซนในแง่ของการเพิ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแล้ว เซลล์เหล่านี้ยังสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยเตกซาเมทาโซนเป็นเวลา 12 วัน การเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนนี้ สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูก ซึ่งมีรายงาน

ว่าสามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงได้เป็น 4 ระยะ⁴³ คือ ในระยะที่หนึ่ง เป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดแล้วจึงเข้าสู่ระยะที่สองที่จะพบการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเข้าสู่ระยะที่สาม ปริมาณการสร้างคอลลาเจนจะลดลงพร้อมๆกับการเพิ่มการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่ไม่ใช่คอลลาเจน (noncollagenous proteins) และระยะสุดท้ายคือระยะที่เริ่มการตกตะกอนของสารอนินทรีย์ในเมทริกซ์ โดยเดกซามेटาโซนอาจมีผลในการกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันคิฟเฟอเรนซิเอทเข้าสู่ระยะที่สอง ที่มีการเพิ่มการสร้างคอลลาเจน

ในขณะเดียวกัน ผลของการกระตุ้นด้วยเดกซามेटาโซนยังทำให้เกิดการลดลงของระดับซีตี 44 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย ซึ่งน่าจะแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับคิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย การลดลงของซีตี 44 จะเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 12 หลังการกระตุ้นและจะคงอยู่ไปจนวันที่ 28 หลังการกระตุ้น อย่างไรก็ตาม ระดับของซีตี 44 ที่ลดลงนั้นคงจะไม่สามารถเปรียบเทียบกับระดับของซีตี 44 ที่สกัดจากเนื้อเยื่อฟันได้ เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งในส่วนนี้จะสะท้อนให้เห็นได้จากระดับของอัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินที่แม้ว่าจะมีการลดลง แต่ระดับที่ลดลงจะน้อยและเห็นการลดลงในวันที่ 28 มากกว่าวันที่ 12 หลังการกระตุ้น คำอธิบายที่อาจเป็นไปได้คือระดับของโปรตีนไฟโบรเนกตินในเซลล์เพาะเลี้ยงที่อยู่ในระดับที่สูงและคงอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน (ผลการทดลองอีกส่วนหนึ่งซึ่งไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้) ดังนั้น ระดับของอัลฟา 5 เบตา 1 อินติกรินซึ่งเป็นไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์จึงมีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ไม่ชัดเจนเท่าซีตี 44

ส่วนการกระตุ้นเซลล์ด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ นั้น จะให้ผลแตกต่างในแง่ของการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จะลดการสร้างคอลลาเจนลงอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 12 ในขณะที่ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของซีตี 44 และอัลฟา 5 เบตา 1 อินติกริน จะคล้ายกับผลที่ได้จากการกระตุ้นด้วยเดกซามेटาโซน

ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ น่าจะเกิดจากผลของการกระตุ้นเซลล์ไปสู่ระดับคิฟเฟอเรนซิเอชันที่แตกต่างกัน โดยผลการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงจากไขกระดูก¹⁵⁻¹⁶ แสดงให้เห็นว่าเดกซามेटาโซนกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่ออนินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ โดยการกระตุ้นคิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ไข

กระดูกเป็นเซลล์กระดูกที่สมบูรณ์ (mature osteoblasts) ซึ่งน่าจะมีผลให้เซลล์ผ่านเข้าสู่ระยะต่างๆตามลำดับขั้น และทำให้พบการเพิ่มการสร้างคอลลาเจน ในขณะที่ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จะกระตุ้นการสร้างโปรตีน ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ในเซลล์กระดูก^{44,45} ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างโดยเซลล์กระดูกที่เข้าสู่ระยะที่เกิดการตกตะกอนอินทรีย์ซึ่งเป็นระยะเซลล์ลดการสร้างคอลลาเจนลงแล้ว⁴³ ดังนั้น หากผลของการกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน คล้ายกับผลต่อเซลล์กระดูก ก็จะสามารถอธิบายถึงการลดลงของการสร้างคอลลาเจนได้

โดยสรุป เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน สามารถตอบสนองต่อเดกซาเมทาโซนและ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และผลของการตอบสนองนั้นจะทำให้ระดับของซีตี44และอัลฟา5เบตา1อินติกรินลดลง สอดคล้องกับการลดลงของโปรตีนทั้งสองในเนื้อเยื่อโพรงฟัน เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อกลางโพรงฟัน ดังนั้น การลดลงของโปรตีนทั้งสองน่าจะใช้เป็นตัวกำหนดในการบอกระดับตีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ten Cate AR. Oral histology: development, structure, and function. St. Louis: Mosby, 1994:456-468.
2. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. J Dent Res 1985;64:530-40.
3. Inoue T, Chen SH, Usuda J, Morohoshi Y, Shimoto M. Osteogenic activity of cells from dental pulp, periodontal ligament, bone marrow and muscle *in vitro*: an ultrastructural study and alkaline phosphatase activity. Bull Tokyo Dent Coll 1992;33:7-12.
4. Messer HH, Tate G, Reade PC. Distribution of Ca^{2+} -, Mg^{2+} -ATPase activity in bovine dental pulp. J Dent Res 1978;57:865.

5. Liang RF, Nishimura S, Murayama S, Hanazawa S, Kitano S, Sato S. Effects of transforming growth factor- β and epidermal growth factors on clonal rat pulp cells. *Arch Oral Biol* 1990;35:7-11.
6. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 1992;37:231-6.
7. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Nakashima K, Noshiro M, et al. Transforming growth factors- β 1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res* 1994;73:1509-14.
8. Tsukamoto Y, Fukutani S, Takeuchi S, Tanaka Y, Mori M. Cultivation of fibroblast-like cells derived from human dental pulp, demonstrated $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sensitive alkaline phosphatase. *Jpn J Oral Biol* 1988;30:851-4.
9. Kido JI, Ishida H, Nagata T, Hamasaki A, Nishikawa S, Wakano Y. Effects of parathyroid hormone, $1,25$ dihydroxyvitamin D_3 , and prostaglandin E_2 on alkaline phosphatase activity in cultured dental pulp and gingiva cells of bovine calf. *J Endod* 1991;17:161-4.
10. Majeska RJ, Rodan GA. The effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1982;257:3362-5.
11. Mulkins MA, Manolagas SC, Deftos LJ, Sussman HH. $1,25$ dihydroxyvitamin D_3 increases bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in human osteogenic sarcoma cells. *J Biol Chem* 1983;258:6219-25.
12. Kurihara N, Ishizuka S, Kiyoki M, Haketa Y, Ikeda K, Kumekawa M. Effects of $1,25$ dihydroxyvitamin D_3 on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinology* 1986;118:940-7.

13. Bonewald LF, Kester MB, Schwart Z, Swain LD, Khare A, Johnson TL, et. al. Effects of combining transforming growth factor- β and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on differentiation of a human osteosarcoma (MG-63). *J Biol Chem* 1992;267:8943-9.
14. Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986;39:382-5.
15. Rickard DJ, Kazhdan I, Leboy PS. Importance of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the nonadherent cells of marrow for osteoblast differentiation from rat marrow stromal cells. *Bone* 1995;16:671-8.
16. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarker G, Spelberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Min Res* 1996;11:312-24.
17. Kusagai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* 1993;38:769-77.
18. Underhill CB. CD44: The Hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 1992;103:293-8.
19. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: A novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 1994;9:39-44.
20. Pavasant P, Shizari TM, Underhill CB. Distribution of hyaluronan in the epiphyseal growth plate: turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells. *J Cell Sci* 1994;107:2669-77.
21. Yamada KM. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: Hay ED., editor. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: Plenum Press, 1991:111-24.
22. Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM. Osteoblastic cell lineage. In: Noda M., editor. *Cellular and molecular biology of bone*. San Diego: Academic Press, 1993:1-45.

23. Wong GL, Luben RA, Cohn DV. 1,25 dihydroxycholecalciferol and parathyroid: effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells. *Science* 1977;197:663-5.
24. Franceschi RT, Lames WM, Zerlauth G. 1,25 dihydroxyvitamin D₃ specific regulation of growth morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 1985;123:401-9.
25. Suda T, Miyaura C, Abe E, Kuroki T. Modulation of cell differentiation, immune responses and tumor promotion by vitamin D compounds. In: Peck WA, editor. *Bone and mineral research 4*. Amsterdam:Excerpta Medica, 1986:1-48.
26. Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai S, Tabata S, Okunaga K, Shibuya T. Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J Biomed Mat Res* 1996;32:341-8.
27. Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization *in vitro*. *J Periodontol* 1997;68:320-7.
28. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*. *J Periodontol* 1991;62:499-503.
29. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho M-I. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *Calcif Tiss Int* 1995;57:52-9.
30. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Eng J Med* 1989;320:980-91.
31. Toverud SU, Anderson JJB, Garner SC. Vitamin D. In: Anderson JJB, Garner SC, editors. *Calcium and phosphorus in health and disease*. Boca Raton: CRC Press, 1995:177-95.

32. Farmer ED, Lawton FE, editors. Stones' oral and dental diseases. Edinburgh:E&S Livingstone, 1966.
33. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. N Eng J Med 1989;309:29-35.
34. Pitaru S, Blaushild N, Noff D, Edelstein S. The effect of toxic doses of 1,25 dihydroxycholecalciferol on dental tissues in the rat. Arch Oral Biol 1982;27:915-23.
35. Kim YS, Stumpf WE, Clark SA, Sar M, DeLuca HF. Target cells for 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in developing rat incisor teeth. J Dent Res 1983;62:58-9.
36. Kim YS, Clark SA, Stumpf WE, DeLuca HF. Nuclear uptake of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in developing rodent teeth: an autoradiographic study. Anat Rec 1985;212:301-6.
37. Clark SA, Dame MC, Kim YS, Stumpf WE, DeLuca HF. 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in teeth of rats and humans: receptors and nuclear localization. Anat Rec 1985;212:250-4.
38. Nagata T, Yokota M, Ohishi K, Shinohara H, Wakano Y, Ishida H. 1,25 dihydroxyvitamin D₃ stimulation of osteopontin expression in rat clonal dental pulp cells. Arch Oral Biol 1994;39:775-82.
39. Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. J Cell Sci 1989;92:513-8.
40. Orly I, Gregoire M, Menanteau J, Dard M. Effects of synthetic calcium phosphates on the ³H-thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity of human fibroblasts in culture. J Biomed Mater Res 1989;23:1433-40.
41. Budd RC, Cerottini JC, Horvath C, Bron C, Pedrazzini T, Howe RC, MacDonald HR. Distinction of virgin and memory T lymphocytes: Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. J Immunol 1987;138:3120-9.

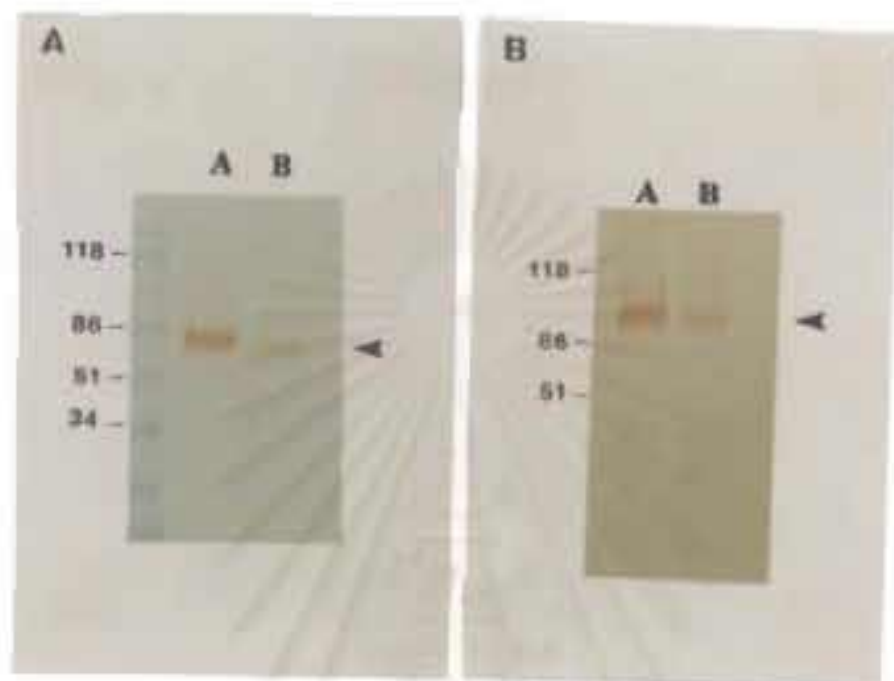
42. Chadha S, Bishop MA. Effect of mechanical removal of the pulp upon the retention of odontoblasts around the pulp chamber of human third molars. *Archs Oral Biol* 1996;41:905-909.
43. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: An integral relationship of cell growth. In: Noda M., editor. *Cellular and molecular biology of bone*. San Diego: Academic Press, 1993:47-95.
44. Pirskanen A, Mahonen A, Maenpaa PH. Modulation of 1,25(OH)₂D₃-induced osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells by other steroidal hormones. *Mol Cell Endocrin* 1991;76:149-59.
45. Morrison NA, Shine J, Fragonas JC, Verkest V, McMenemy ML, Eisman JA. 1,25 dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene. *Science* 1990;246:1158-61.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ซีดี้44ในเนื้อพินของหนู

เนื้อเยื่อขากรรไกรล่างของหนูเมาส์อายุ 4 วัน ถูกนำมาตัดเป็นแผ่นเนื้อเยื่อและย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อซีดี44 ในรูป A แสดงบริเวณที่พบซีดี44ซึ่งปรากฏเป็นสีแดง โดยตำแหน่งที่พบซีดี44ได้แก่ เซลล์ในโพรงฟัน (p) ในขณะที่จะไม่พบซีดี44ในเซลล์สร้างเนื้อฟัน (O) ในรูป B เป็นภาพของแผ่นเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงที่ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ เพื่อแสดงการติดสีที่ไม่จำเพาะซึ่งอาจเกิดจากวิธีการย้อม เส้นที่อยู่กึ่งมุมขวาล่างยาวเท่ากับ 20 ไมโครเมตร



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์แบบเวสเทอร์นแสดงซีตี44 และอัลฟา5เบตาอินติกริน ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เนื้อเยื่อกลางโพรงฟัน และเนื้อเยื่อผิวโพรงฟัน จะถูกทำละลายด้วยสารละลายเอสตีเอส และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณซีตี44 (รูป 2A) และอัลฟา5เบตาอินติกริน (รูป 2B) โดยวิธีเวสเทอร์น

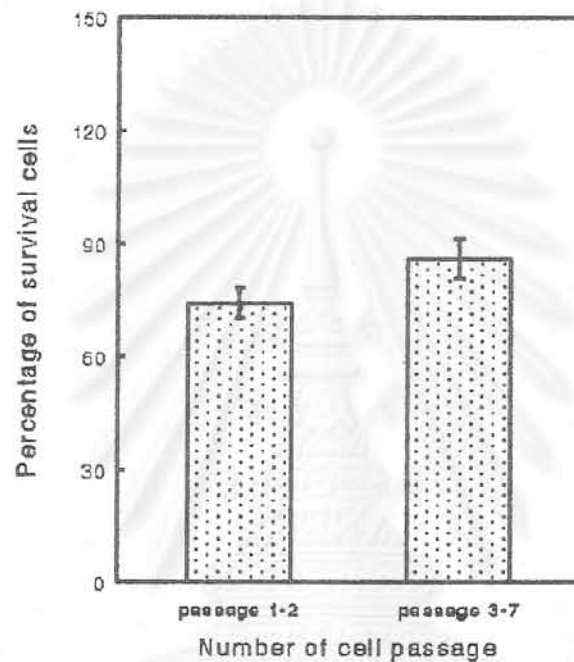
รูปที่ 2A แสดงปริมาณซีตี44จากเนื้อเยื่อกลางโพรงฟัน (แถว A) และเนื้อเยื่อผิวโพรงฟัน (แถว B) ตำแหน่งของซีตี44 แสดงด้วยหัวลูกศร ซึ่งเห็นเป็นแถบสีเข้ม ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 กิโลดาลตัน ตัวเลขทางซ้ายมือแสดงตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ

รูปที่ 2B แสดงปริมาณของอัลฟา5เบตาอินติกริน ในรูปแบบเดียวกับข้างต้น คือแถว A และ B จะเป็นอัลฟา5เบตาอินติกรินของเนื้อเยื่อกลางโพรงฟันและเนื้อเยื่อผิวโพรงฟันตามลำดับ และตำแหน่งของอัลฟา5เบตาอินติกริน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110 กิโลดาลตัน แสดงไว้ด้วยหัวลูกศรทางขวามือ



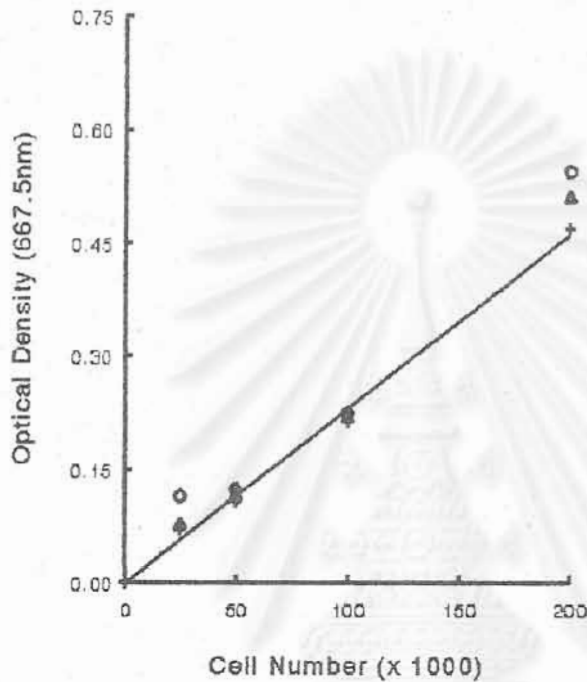
รูปที่ 3 ภาพถ่ายแสดงเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

รูปที่ 3A แสดงเซลล์ที่กำลังเคลื่อนตัวออกจากชั้นเนื้อลงบนจานเลี้ยงเซลล์ โดยชั้นเนื้อของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ไต่จากผู้ป่วย จะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์และเลี้ยงไปจนเซลล์เริ่มเคลื่อนตัวออกจากชั้นเนื้อ เมื่อเซลล์ที่ออกจากชั้นเนื้อเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์แล้ว ก็จะถูกนำไปหว่านใหม่ ซึ่งเซลล์ที่ได้จะลักษณะคล้ายกับเซลล์สร้างเส้นใยทั่วไป คือมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยดังแสดงในรูปที่ 3B ตำแหน่ง e ในรูปที่ 3A แสดงชั้นเนื้อจากโพรงฟัน เส้นที่อยู่ที่มุมขวาล่างของรูป 3B แสดงความยาวเท่ากับ 20 ไมโครเมตร



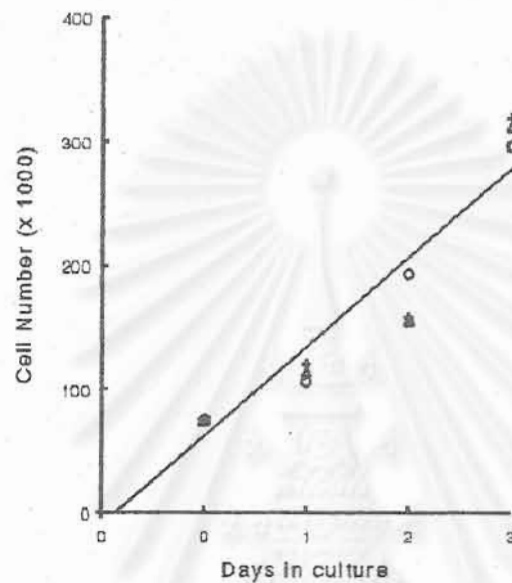
รูปที่ 4 กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอดหลังจากการถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันในรุ่นต่างๆ จะถูกนำมาวัดอัตราการตาย โดยการย้อมด้วยสีทริปแฟนบลู เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์แล้ว ก็จะถูกนำออกจากจานเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้วย้อมด้วยสีทริปแฟนบลูเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมานับจำนวนเซลล์ที่ติดสี (เซลล์ตาย) ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด แล้วนำค่ามาคำนวณเป็นร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอด โดยแยกข้อมูลออกเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มของเซลล์รุ่นที่ 1-2 และรุ่นที่ 3-7 โดยเซลล์จากรุ่นที่ 1-2 จะมีเซลล์เหลือรอดประมาณร้อยละ 70-75 ส่วนรุ่นที่ 3-7 จะรอดประมาณร้อยละ 86-91 ข้อมูลที่แสดงได้จากเซลล์ที่เตรียมจากคนไข้ต่างกัน 3 คน



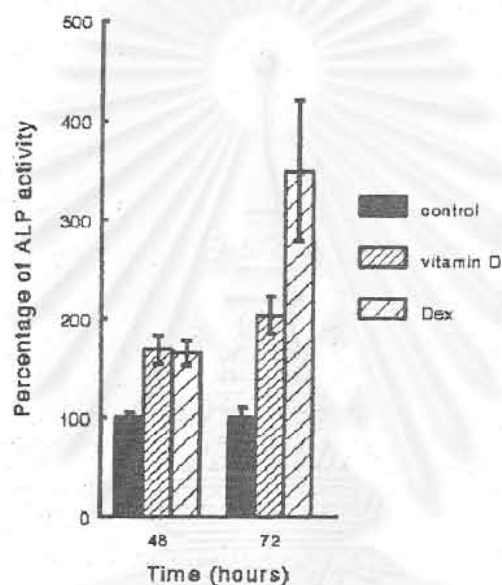
รูปที่ 5A กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับการย้อมติดสีเมทิลีนบลู

เซลล์เพาะเลี้ยงจากรุ่นที่ 4-5 ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในจำนวนต่างๆคือ 2.5, 5, 10, และ 20×10^4 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูตามที่บรรยายไว้ในหัวข้อวัสดุและวิธีการทดลอง จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาเขียนกราฟพร้อมกับค่าจำนวนเซลล์ ซึ่งจะพบว่าค่าที่ได้จะมีความสัมพันธ์กันเป็นเชิงเส้นตรง โดยมีค่ากำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99 ค่าที่ได้มาจากการทดลองสามครั้ง



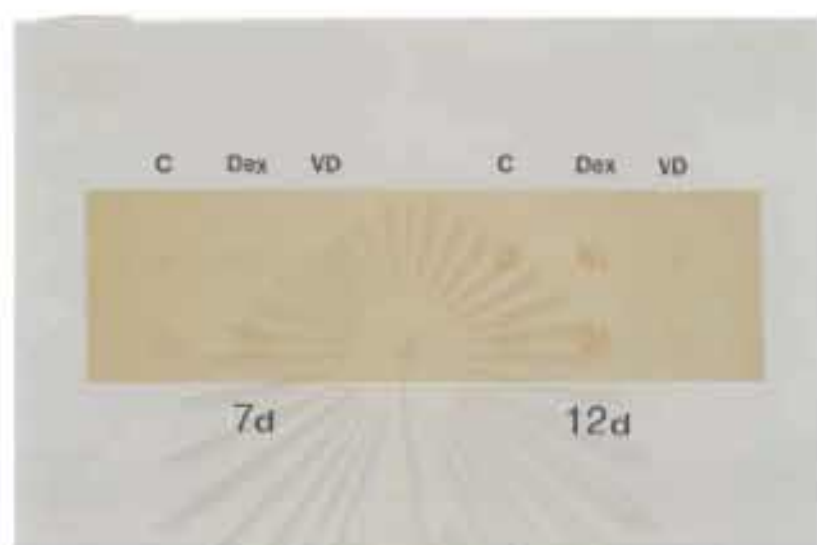
รูปที่ 5B กราฟแสดงอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกหว่านที่ความหนาแน่นประมาณ 50×10^4 เซลล์/หลุมในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวนเซลล์จะถูกวัดด้วยการย้อมสีเมทิลีนบลูภายหลังจากที่หว่านเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (วันที่ 0), 1, 2, 3 และ 4 วันตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการย้อมสีจะถูกนำไปปรับเป็นจำนวนเซลล์โดยเปรียบเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาเขียนกราฟร่วมกับจำนวนวัน โดยค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสามครั้ง ($\circ, \Delta, +$) \pm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน



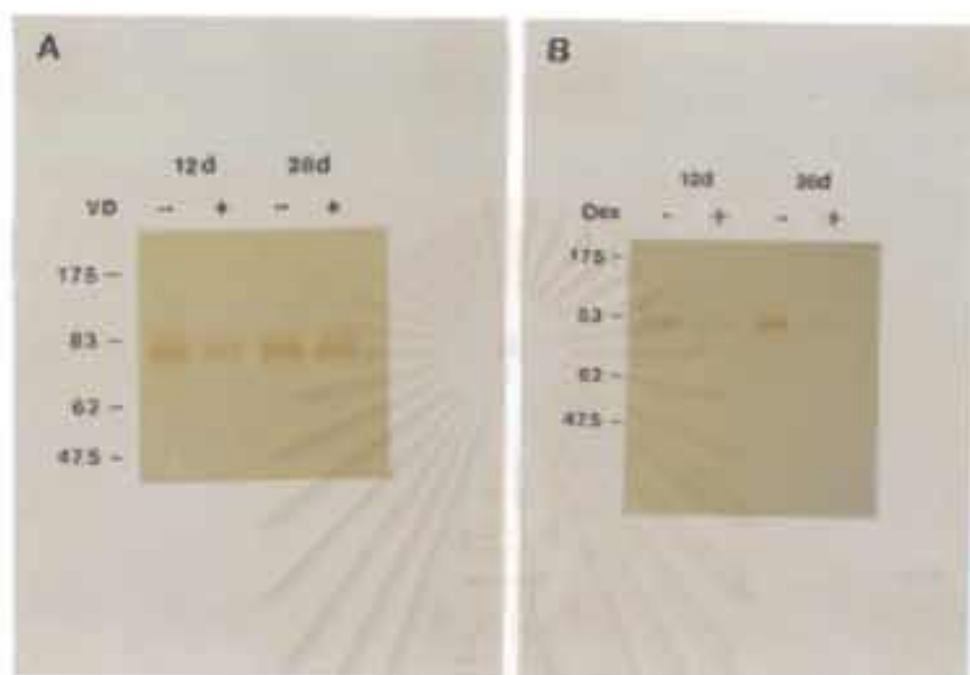
รูปที่ 6 กราฟแสดงระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือ เตกซาเมทาโซน ที่ความเข้มข้น 1×10^{-8} โมลาร์ และ 25×10^{-8} โมลาร์ตามลำดับ เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการวัดระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสตามวิธีการที่บรรยายในหัวข้อวัสดุและวิธีการทดลอง ระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนฐานของจำนวนโปรตีนที่เท่ากัน จะถูกปรับให้เป็นร้อยละโดยให้ระดับในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสามครั้ง \pm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน



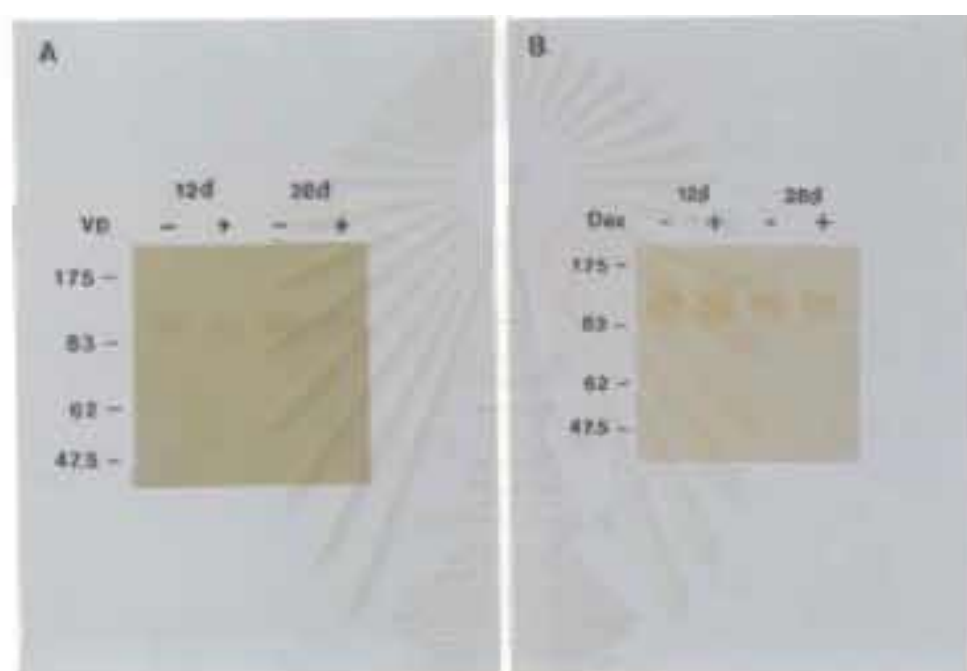
รูปที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ I โดยการใช้วิธีแบบคอท-บลอค เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เอื้อต่อการสร้างเส้นใยคอลลาเจน เป็นเวลา 7 และ 12 วัน (7d และ 12d) จากนั้นระดับของคอลลาเจนจะถูกวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่กระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือ เทกซาเมทาโซน โดยการละลายเมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยกวนินีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นจึงนำสารละลายที่มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแล้วจึงบ่มด้วยแอนติบอดีต่อคอลลาเจน การหยดจะทำได้ลักษณะซ้ำสองในแนวดิ่ง ในรูป อักษร C, Dex และ VD จะหมายถึงกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่กระตุ้นด้วย เทกซาเมทาโซน และกลุ่มที่กระตุ้นด้วยวิตามินดีตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของซีที 44 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน

เซลล์จากโพรงฟันจะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม และกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (รูป 8A) และเดกซามيثาโซน (รูป 8B) คล้ายกับการทดลองในรูปที่ 7 เมื่อครบกำหนดเวลา 12 และ 28 วัน (12d และ 28d) ปริมาณของซีที44ในเซลล์เหล่านี้ จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบเวสต์เทอร์น ซึ่งจะเห็นว่าการกระตุ้นด้วยสารทั้งสองชนิดสามารถทำให้ระดับของซีที44 ลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 12 ในรูป อักษร VD และ Dex หมายถึง $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และเดกซามيثาโซน ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมาย - และ + จะแทนสถานะที่มีและไม่มีสารกระตุ้น



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของอัลฟา 2-ไมโครโกลบูลินในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน

เซลล์จากโพรงฟันจะถูกหว่านและเลี้ยงเหมือนในรูปที่ 8 โดยรูป 9A แสดงการเปลี่ยนแปลงหลังการกระตุ้นด้วย 1,25(OH)₂D₃ และรูป 9B แสดงการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีเดกซามيثาโซน เมื่อครบกำหนดเวลา 12 และ 28 วัน (12d และ 28d) ปริมาณของอัลฟา 2-ไมโครโกลบูลินในเซลล์เหล่านี้ จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบเวสต์เทิร์น ซึ่งการกระตุ้นด้วยสารทั้งสองสามารถทำให้ระดับของอัลฟา 2-ไมโครโกลบูลิน ลดลงได้ เช่นเดียวกับชนิดที่ 44 ในรูป อีกขั้ว VD และ Dex หมายถึง 1,25(OH)₂D₃ และเดกซามيثาโซน ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมาย - และ + จะแทนสภาวะที่มีและไม่มีสารกระตุ้น