



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

การเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำตีฟเฟอเรนซีเอชเอ็น และการสร้าง
เนื้อเยื่ออินทรีในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์
โดยเมทริกซ์ของกระดูก (DFDB) และผงกระดูก (FDB)

โดย

ทัศนีย์ ตรงค์สุวรรณ
ประสิทธิ์ ภาวสันต์

พฤษภาคม ๒๕๕๓

617. 634
ท364 ก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การเปรียบเทียบการเหนียวนาดิฟเฟอเรนซิเอชัน และการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์
ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นดอปริทันต์ของมนุษย์
โดยเมทริกซ์ของกระดูก (DFDB) และ ผงกระดูก (FDB)

โดย

ทัศนีย์ ตรงค์สุวรรณ
ประสิทธิ์ ภาสันต์

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรกฎาคม 2543

I20140885

24 พ.ค. 2543

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่กรุณาให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ชื่อโครงการวิจัย** : การเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำดีฟเฟอเรนซิเอชัน และการสร้างเนื้อเยื่อ
อนินทรีย์ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นดอดีพริทนต์ของมนุษย์ โดยเมทริกซ์
ของกระดูก (DFDB) และผงกระดูก (FDB)
- ชื่อผู้วิจัย** : ทศนีย์ ดรรงค์สุวรรณ, ประสิทธิ์ ภาวสันต์
- เดือนปีที่ทำวิจัยสำเร็จ** : กรกฎาคม 2543

บทคัดย่อ

เมทริกซ์ของกระดูก (DFDB) และผงกระดูก (FDB) เป็นสารที่มีการนำไปใช้ร่วมกับการทำ
คัลเจอร์ปริทันต์ เพื่อหวังผลในการกระตุ้นการเสริมสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อปริทันต์ อย่างไรก็ตาม ภาย
งานถึงผลของการใช้สารทั้งสองชนิดในผู้ป่วยยังคงมีความขัดแย้งและไม่ชัดเจน เพื่อเป็นการศึกษา
เพิ่มเติมถึงการตอบสนองโดยตรงของเซลล์เอ็นดอดีพริทนต์ที่มีต่อสารทั้งสองชนิด คณะผู้วิจัยได้ทำ
การทดลองศึกษาผลของ DFDB และ FDB ที่มีต่อดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ดังกล่าวในห้อง
ปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตรของ DFDB
และ FDB จะมีผลในการลดระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่
0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของออสติโอพอนทินและโบนไซเอเลโอโปรตีน ด้วยเทคนิคอาร์
ที-พีซีอาร์ พบว่าเซลล์จะตอบสนองต่อสารทั้งสองชนิดโดยการเพิ่มระดับของออสติโอพอนทิน เมื่อ
ใช้ความเข้มข้นของทั้ง DFDB และ FDB ที่ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ในวันที่ 4 และเมื่อเลี้ยง
ต่อเป็นเวลา 8 และ 18 วัน พบว่าระดับของทั้งออสติโอพอนทินและโบนไซเอเลโอโปรตีน จะเพิ่มขึ้น
อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างชัดเจน เมื่อ
เปรียบเทียบผลระหว่างการใช้ DFDB และ FDB รวมทั้งไม่พบการสร้างตะกอนอนินทรีย์อย่างชัด
เจนบนจานเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่มี DFDB และ FDB ด้วย เมื่อทดลองโรยสารทั้งสองชนิดลงใน
tissue culture insert เพื่อไม่ให้เซลล์ได้สัมผัสกับสารทั้งสองชนิดโดยตรง ผลการทดลองแสดงว่า
สารที่ละลายออกจากทั้ง DFDB และ FDB สามารถกระตุ้นการแสดงออกของออสติโอพอนทินได้
ภายใน 3 วัน ผลการทดลองทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเอ็นดอดีพริทนต์
ของมนุษย์สามารถตอบสนองโดยตรงต่อสารทั้งสองชนิด แต่ผลของการตอบสนองนั้น จะไม่เกิดถึง
ระดับที่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างตะกอนอนินทรีย์ได้ และองค์ประกอบในสารทั้งสองชนิดที่มีต่อ
ผลเซลล์เอ็นดอดีพริทนต์อาจเป็นสารจำพวกโกรทแฟกเตอร์ที่ละลายออกจาก DFDB และ FDB

Project title : Comparison of induction in differentiation and mineralization on human PDL cells in vitro by demineralized freeze-dried bone (DFDB) and freeze-dried bone (FDB).

Name of investigators : Tussanee Darongsuwan, Prasit Pavasant.

Year : July, 2000.

Abstract

Demineralized freeze-dried bone (DFDB) and freeze-dried bone (FDB) are usually used in periodontal surgery for the purpose of enhancing periodontal regeneration. However, the success rate following the treatments is still controversial and remains unclear. To investigate the direct response of PDL cells to DFDB/FDB, we studied the effects of both materials on cell differentiation in vitro. The results showed that at 2 and 4 mg/cm² of both materials reduced the activity of alkaline phosphatase while at 0.5 and 1 mg/cm² of both did not. RT-PCR analysis demonstrated that cells increased osteopontin expression within 4 days in response to 1 mg/cm² of DFDB/FDB. Increase of osteopontin and bone sialoprotein were also clearly seen at day 8 and 18 in comparison with control. However, no differences were found when compared the osteogenic induction effect of DFDB with FDB. Both DFDB and FDB on the tissue culture insert, placed in the culture dish, could stimulate osteopontin expression within 3 days. In conclusion, human PDL cells have direct response to both DFDB and FDB but they were not induced into the stage of mineralization. In addition, the response may be caused by soluble factors released from both materials.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วัตถุประสงค์และวิธีการ	3
ผลการทดลอง	7
บทวิจารณ์	10
สรุป	14
บรรณานุกรม	15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1 ภาพแสดงระยะต่างๆของเซลล์เอ็นยัดปริทัศน์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ	20
2 ภาพแสดงผลของเดกซาเมทาโซนต่อการแสดงออกของยีน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์	20
3 ภาพแสดงเซลล์เอ็นยัดปริทัศน์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB	21
4 กราฟแสดงระดับของอัลคาไลน์ฟอสเฟตในสภาวะที่มี DFDB และ FDB	22
5 ภาพการแสดงออกของออสติโอพอนทีน เมื่อเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่มี DFDB/FDB 0.5 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร	23
6. ภาพการแสดงออกของออสติโอพอนทีน เมื่อเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่มี DFDB/FDB 0.5 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร	24
7. ภาพแสดงเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB/FDB เป็นเวลา 18 วัน	25
8. การแสดงออกของออสติโอพอนทีน และโบนาไซเอโลโปรตีน เมื่อเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่มี DFDB/FDB เป็นเวลา 8 และ 18 วัน	26
9. การแสดงผลของ DFDB/FDB เมื่ออยู่ใน tissue culture insert เป็นเวลา 3 วัน	27



คำนำ

เป้าหมายสำคัญในการให้การรักษารอยโรคปริทันต์ คือการกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อปริทันต์ขึ้นใหม่ ซึ่งประกอบด้วยกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) เคลือบรากฟัน (cementum) และเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament)

วิธีการหนึ่งในการรักษา คือการทำศัลย์ปริทันต์ร่วมกับการใช้ผงกระดูก เพื่อช่วยให้เกิดการเสริมสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยเฉพาะการเสริมสร้างกระดูกเบ้าฟัน ผงกระดูกที่ใช้คือผงกระดูกของคนทั้งที่ได้กำจัดสารอินทรีย์แล้ว (decalcified freeze-dried bone; DFDB) หรือที่ยังคงมีสารอินทรีย์อยู่ (freeze-dried bone; FDB) เดิมลงในช่องว่างของกระดูกเบ้าฟันที่ถูกทำลาย โดยหวังว่าจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์ที่เหลืออยู่ในบริเวณนั้นดิฟเฟอเรนซิเอต (differentiate) เป็นเซลล์ที่สามารถสร้างกระดูกหรือเคลือบรากฟัน (cementum) เพื่อบูรณะเนื้อเยื่อปริทันต์ให้กลับมาทำงานได้ดังเดิม¹⁻⁶ จากการติดตามผลของการรักษาในทางคลินิก มีทั้งรายงานที่แสดงถึงความสำเร็จและล้มเหลวของทั้ง DFDB และ FDB ในการเสริมสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ขึ้นใหม่⁵⁻⁹ ความขัดแย้งกันในรายงานเหล่านี้ อาจเกิดขึ้นได้จากสาเหตุหลายประการ ตั้งแต่ความแตกต่างของที่มาของ DFDB เช่น จากกระดูกของคนที่มีอายุต่างกัน¹⁰ หรือต่างเพศกัน¹¹ จนถึงความแตกต่างของอายุของผู้ป่วยที่เข้ารับรักษา ที่อาจทำให้มีผลของการตอบสนองที่แตกต่างกันออกไป

แนวความคิดในการนำ DFDB มาใช้ เนื่องจากรายงานที่ระบุว่า DFDB ประกอบด้วยโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) หลายชนิด โดยเฉพาะโกรทแฟกเตอร์กลุ่มที่ชื่อว่า โบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีน (bone morphogenetic protein) หรือ BMP¹² ซึ่งเป็นกลุ่มของโกรทแฟกเตอร์ที่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกเมื่อฝังไว้ในชั้นใต้ผิวหนัง หรือในกล้ามเนื้อของสัตว์ทดลองหลายชนิด¹³⁻¹⁴ และเมื่อนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า BMP สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์กระดูกสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์เพิ่มขึ้น^{11,15-16} ในขณะที่การนำเอา FDB มาใช้ในการรักษารอยโรคปริทันต์นั้น เนื่องจาก FDB จะประกอบด้วยทั้งสารอินทรีย์และอินทรีย์ของกระดูก ทำให้มีคุณลักษณะที่เป็นของแข็งซึ่งเอื้อให้การใช้งานสะดวกกว่า และสามารถคงอยู่ในรอยโรคของกระดูกได้นานกว่า DFDB รวมทั้งมีรายงานว่า FDB ให้ผลในการช่วยเสริมสร้างกระดูก ไม่แตกต่างจาก DFDB⁵

อย่างไรก็ดี การศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อ DFDB และ FDB นั้น ยังคงจำกัดอยู่เฉพาะในเซลล์กระดูก ในขณะที่กลไกการเสริมสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ขึ้นใหม่นั้น จะต้องอาศัยเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cell) ร่วมด้วย¹⁷⁻¹⁹ ซึ่งยังไม่มีการศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีต่อ DFDB และ FDB ในแง่ของการกระตุ้นการสร้างเคลือบรากฟันหรือกระดูก

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ มีความสามารถในการสร้าง calcified tissue ทั้งในสัตว์ทดลองและในห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถดิฟเฟอเรนซิเอท และสร้างอาร์เอ็นเอเข้ารหัส (mRNA) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง calcified tissue คล้ายกับที่พบในเซลล์กระดูก²⁰ เช่น เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส²¹⁻²³ และโปรตีนในกลุ่มไซเอโลโปรตีน (sialoprotein) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสองชนิดคือ ออสติโอพอนทิน (osteopontin) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์²⁴ และโบนไซเอโลโปรตีน (bone sialoprotein) ซึ่งทำหน้าที่เป็นจุดเริ่ม (nucleation) ของการเกิดตะกอนอนินทรีย์²⁵⁻²⁶ โปรตีนทั้งสองชนิดนี้พบได้มากในเมทริกซ์ของกระดูก²⁷⁻²⁸ และเคลือบรากฟัน²⁹ และเป็นที่ยอมรับในระดับหนึ่งว่าอาจใช้ความสามารถในการสร้างโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ระดับของดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ด้วย^{20,25}

วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้ ต้องการเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ ต่อ DFDB และ FDB ที่ใช้ในการรักษาโรคปริทันต์ เพื่อศึกษาว่าสารทั้งสองชนิดนี้สามารถกระตุ้นกระบวนการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ให้เข้าใกล้สภาวะที่สามารถสร้างเนื้อเยื่ออนินทรีย์หรือไม่ อย่างไร โดยการเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ระหว่างสภาวะที่มีและไม่มี DFDB หรือ FDB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์

เซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ จะได้จากผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องจากเป็นฟันคุดหรือเพราะการจัดฟัน โดยฟันนั้นจะต้องไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย

การเตรียมเซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ทำตามวิธีที่เคยรายงานไว้แล้ว³⁰ โดยมีวิธีการโดยย่อคือ ฟันจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาซีน (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง จากนั้นจึงใช้มีดผ่าตัดขูดเนื้อเยื่อออกจากผิวฟันบริเวณตอนกลางของรากฟัน (middle third) เนื้อเยื่อที่ได้จะถูกนำไปวางบนจานเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) และเติมสารประกอบอื่นๆ คือซีรัมร้อยละ 10 (10% Fetal Bovine Serum), 2 มิลลิโมลาร์ กลูตามีน (L-Glutamine), ยาปฏิชีวนะและยาด้านเชื้อรา (100 IU/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin sulfate และ Amphotericin B 0.25 g/ml) เนื้อเยื่อจะถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เริ่มกลานออกจากชิ้นเนื้อ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเต็มภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้ว จะถูกถ่าย (subculture) ลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ และเริ่มนับเซลล์ที่หว่านใหม่นี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในอัตราส่วน 1:3 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-5 ในแต่ละการทดลองจะเป็นการทดลองสามครั้ง โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วย 3 คน ในช่วงอายุ 18-25 ปี

การกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์และการยับยั้งผลึกแคลเซียม

ในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ เซลล์จะถูกเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ด้วยความหนาแน่น 2.5×10^5 เซลล์/จานมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, เบตาไกลีเซอโรฟอสเฟต (beta glycerophosphate) 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และเดกซาเมทาโซน (dexamethasone) ความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2 วัน จนกว่าจะจบการทดลองซึ่งใช้เวลาประมาณ 16-18 วัน

การเรียงตัวของเซลล์จะถูกตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) จนกว่าจะพบการเรียงตัวเป็นโดมสูงหรือโนดูล (nodule) และพบลักษณะของผลึกบนกลุ่มเซลล์

เพื่อเป็นการยืนยันว่า ผลึกที่ตรวจพบจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นผลึกของแคลเซียม เซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (phosphate buffer saline) แล้วตรึง (fix) ด้วยอัลกอฮอล์บริสุทธิ์เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงทิ้งให้แห้งแล้วย้อมด้วยสารละลายอะลิซารินเรดเอส (alizarin red S) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ความเป็นกรด-เบส 6.5 เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างเอาสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ ผลึกแคลเซียมจะเห็นเป็นสีแดง จากนั้นจึงทำการศึกษาและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ ด้วยฟิล์มโกดัก K Gold100

การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อ DFDB และ FDB

เซลล์จะถูกถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ในสภาวะที่มีและไม่มี DFDB (DEMBONE™, Pacific Coast Tissue Bank, USA) หรือ FDB (Bio-OSS, OSTEOHEALTH CO., Switzerland) ปริมาณของ DFDB และ FDB ที่ใช้ทดสอบคือ 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกรดแอสคอร์บิก และเบตากลีเซอโรฟอสเฟตเหมือนข้างต้น เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน

เพื่อเป็นการทดสอบผลของสารที่ละลายออกจาก DFDB และ FDB สารทั้งสองชนิดจะถูกโรยบน tissue culture insert (Nunc) และนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 3 วัน การใช้ tissue culture insert นี้ จะทำให้เซลล์ไม่ได้สัมผัสกับสารทั้งสองชนิดโดยตรง แต่ยังคงได้รับอิทธิพลจากสารที่ละลายออกจาก DFDB/FDB

การวัดระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เซลล์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มี DFDB หรือ FDB ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงวัดระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว³¹ ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ เซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายด์ 1 ครั้ง และทำให้เซลล์แตกด้วย

บัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer) ที่ประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl), 2 มิลลิโมลาร์ ของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$), ไตรตอนเอกซ์-100 (Triton-X-100) ร้อยละ 0.1 และมีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 10 จากนั้นจึงเติมสารละลายของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate) ที่ประกอบด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต, 0.1 โมลาร์ของ 2-อามิโน-2-เมทิล-1-โพรพานอล (2-amino-2-methyl-1-propanol), 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ และมีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 10.5 แล้วนำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที ปฏิกริยาจะถูกหยุดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเป็นค่าการทำงานของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ใช้เป็นมาตรฐาน

สารละลายเซลล์ที่เหลือหลังจากการวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะนำไปวัดปริมาณโปรตีน จากนั้นจึงนำค่าทั้งหมดมาคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยคำนวณออกมาเป็น นาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที

การวิเคราะห์ระดับของอาร์เอ็นเอรหัสด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

เซลล์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB ดังกล่าวข้างต้น เมื่อครบกำหนดเวลา อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์จะถูกสกัดด้วย TRIzol (GIBCO) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต อาร์เอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปชัน (reverse transcription) ด้วยเอนไซม์เอเอ็มวี (AMV; Avian myeloblastosis virus, Promega) เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (cDNA) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการพีซีอาร์ โดยใช้เครื่อง Hybaid Omn- E (Hybaid, UK) การเพิ่มจำนวนจะทำโดยใช้สายไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ ออสติโอพอนทิน³² โบนไซเอโลโปรตีน³³ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส³⁴ และใช้สายไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase)³⁵ ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน

ใน (internal control) ของการทดลอง เนื่องจากการแสดงออกของ GAPDH จะค่อนข้างคงที่ในเซลล์ไม่ว่าจะมีการกระตุ้นด้วยสารใดๆ³⁶⁻³⁷

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง คือ ออสติโอพอนทีน สายเซนส์ (sense strand) 5' AGT ACC CTG ATG CTA CAG ACG 3' แอนติเซนส์ (antisense) 5' CAA CCA GCA TAT CTT CAT GGC TG 3', โบนไซเอโลโปรตีน สายเซนส์ 5' TTC CAA ACA CAG CCC GTG AC 3' แอนติเซนส์ 5' GCC TAG ACC TTG AAG TGT CTG ATC C 3', อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส สายเซนส์ 5' ACG TGG CTA AGA ATG TCA TC 3' แอนติเซนส์ 5' CTG GTA GGC GAT GTC CTA 3' และ GAPDH สายเซนส์ 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3' แอนติเซนส์ 5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3' โดยตั้งระดับของอุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 2 นาที 1 ครั้ง ตามด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 เซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 45 วินาที อีก 30 หรือ 33 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที อีก 1 รอบ

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการพีซีอาร์แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 2 และถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลาไรซ์บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ภาพถ่ายจะถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเดนซิโตมิเตอร์และโปรแกรม molecular analysis (BioRad)

ผลการทดลอง

ผลของเดกซาเมทาโซนต่อเซลล์เอ็นอีตปริทันต์

เดกซาเมทาโซนเป็นสารสเตียรอยด์สังเคราะห์ที่สามารถเหนี่ยวนำดีฟเฟอเรนซ์เอชันของเซลล์กระดูก รวมทั้งเซลล์เอ็นอีตปริทันต์ของหนู²⁰ ผลการทดลองในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์เอ็นอีตปริทันต์ของมนุษย์สามารถตอบสนองต่อเดกซาเมทาโซนเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 17-20 วัน เซลล์เอ็นอีตปริทันต์จะมีการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวที่สามารถแยกได้เป็น 4 ระยะ คือระยะที่มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียว (รูป 1A) ซึ่งจะสังเกตได้ในราววันที่ 5 จากนั้นเซลล์จะเริ่มเรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น (รูป 1B) ซึ่งจะเห็นได้ตั้งแต่ในราววันที่ 8-10 จากนั้นเซลล์ในบางตำแหน่งจะเริ่มก่อตัวขึ้นเป็นโหนด หรือนอดูล (nodule; รูป 1C) ซึ่งจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ จากในราววันที่ 12-15 และเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 17-20 วัน บริเวณโหนดก็จะเริ่มเกิดการตกตะกอนของสารอินทรีย์ (รูป 1D)

เพื่อตรวจสอบว่าตะกอนที่เกิดขึ้นมีองค์ประกอบของแคลเซียม เซลล์จะถูกย้อมด้วยสารละลายอริซารินเรด ดังแสดงในรูป 1D ซึ่งจะพบการติดสีแดงในบริเวณตะกอนที่สร้างโดยเซลล์เอ็นอีตปริทันต์ แสดงว่าตะกอนที่เกิดขึ้นมีองค์ประกอบของแคลเซียม

เมื่อนำเซลล์ในแต่ละระยะตามรูปที่ 1 มาตรวจสอบระดับของอาร์เอ็นเอเข้ารหัส ด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่า ระดับของออสติโอพอนทินและโบนไซเอโลโปรตีนจะค่อยๆเพิ่มขึ้น จากระยะที่เซลล์เรียงตัวซ้อนกันหลายชั้นไปจนถึงระยะการเกิดโหนด (รูป 2) ก่อนที่จะเกิดการตกตะกอนของแคลเซียมในระยะสุดท้าย

ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB หรือ FDB

เซลล์เอ็นอีตปริทันต์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB หรือ FDB ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งเป็นการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB (รูป 3A) และ FDB (รูป 3B) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร จะสังเกตได้ว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตอย่างปกติ โดยพบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นแบบหลายชั้น และพบว่าเซลล์จะเรียงตัวก่ายกันหนาแน่นบน DFDB และ FDB

ผลของ DFDB และ FDB ต่อการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB และ FDB เป็นเวลา 3 วัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 0.5 มิลลิกรัม จนถึง 4 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร (รูป 4) แล้ววัดระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เซลล์สร้างขึ้น ปรากฏว่า ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ของทั้ง DFDB และ FDB ระดับของเอนไซม์จะต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการสังเกตทางกล้องจุลทรรศน์ ที่พบว่าเซลล์จะมีการตายบางส่วน และเซลล์จะไม่ค่อยเจริญ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ในขณะที่ผลของระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ของสารทดสอบทั้งสองชนิด จะไม่พบความลักษณะที่ผิดปกติของเซลล์ รวมทั้งมีการเจริญปกติ คือหนาแน่นใกล้เคียงกับในกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าระดับของเอนไซม์ในกลุ่มที่เลี้ยงบน FDB จะมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงบน DFDB จะมีระดับของเอนไซม์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร [กราฟในรูปที่ 4 ได้จากการทดลองซ้ำสอง (duplicate) จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 คน]

ผลของ DFDB และ FDB ต่อการแสดงออกของออสติโอพอนทินในวันที่ 4

เพื่อดูผลการตอบสนองในระยะสั้น เซลล์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB ในสองความเข้มข้น คือ 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 4 และ 8 วัน แล้ววิเคราะห์ผลของสารทั้งสองชนิดในการกระตุ้นการแสดงออกของออสติโอพอนทิน (OPN) เป็นอันดับแรก โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ ดังแสดงผลในรูปที่ 5 และ 6 เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของออสติโอพอนทิน ในแฉวบน กับการแสดงออกของ GAPDH ในแฉวล่างซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน จะพบว่าที่ความเข้มข้นของ DFDB และ FDB ที่ 0.5 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร จะไม่ปรากฏความแตกต่างในการแสดงออกในระยะเวลาดังกล่าว (รูปที่ 5) แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ของสารทั้งสองชนิด จะเห็นการเพิ่มขึ้นของออสติโอพอนทินได้ในวันที่ 4 (รูปที่ 6)

ผลของ DFDB และ FDB ต่อเซลล์ในระยะยาว

เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์เหมือนข้างต้นเป็นระยะเวลา 18 วัน และสังเกตการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของเซลล์ พบว่า เซลล์ในกลุ่มควบคุมจะมีการจัดเรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น (รูป 7A) แต่ปรากฏลักษณะของโนดูลไม่มากนัก ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB จะมีการจัดเรียงตัวหลายชั้นเช่นกัน แต่จะหนาแน่นมาโดยเฉพาะในบริเวณรอบๆ DFDB และ FDB (รูป 7B และ 7C) อย่างไรก็ตาม จะสังเกตเห็นการเกิดโนดูลได้ไม่มากนักเช่นกัน เมื่อเทียบกับสภาวะที่กระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซนในรูปที่ 1

เมื่อย้อมด้วยสารละลายอะลิซารินเรด เพื่อตรวจสอบการเกิดตะกอนแคลเซียม พบว่าในกลุ่มควบคุม และในกลุ่มที่เลี้ยงใน DFDB จะย้อมไม่ติดสี ในขณะที่เซลล์ในสภาวะที่เลี้ยงบน FDB จะย้อมติดสีอะลิซาริน โดยพบการติดสีทั้งที่บริเวณใกล้กับ FDB และพบบนกลุ่มเซลล์ที่อยู่ห่างออกมา ในตำแหน่งที่ใกล้กับ FDB อาจเป็นการติดสีของแคลเซียมจาก FDB เอง (รูป 7C และ 7D) แต่การติดสีของตะกอนที่เกิดไกลออกจาก FDB น่าจะเกิดจากการเหนี่ยวนำของเซลล์เองคล้ายกับที่พบในรูปที่ 1

ในรูปที่ 8 แสดงระดับของออสติโอพอนทิน และโบนไฮเอโลโปรตีน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ ในช่วงวันที่ 8 ซึ่งเป็นระยะที่พบเริ่มพบการเรียงตัวหลายชั้นของเซลล์ และในวันที่ 18 ซึ่งตรงกับระยะที่ย้อมอะลิซารินเรดข้างต้น ผลการวิเคราะห์พบว่า DFDB และ FDB จะกระตุ้นการแสดงออกของออสติโอพอนทินและโบนไฮเอโลโปรตีนได้ทั้งในระยะ 8 วันและ 18 วัน แต่ความแตกต่างนี้จะลดลงในวันที่ 18 เมื่อเซลล์ในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกของออสติโอพอนทินและโบนไฮเอโลโปรตีนเพิ่มมากขึ้น

ผลของสารที่ละลายออกจาก DFDB หรือ FDB

เพื่อเป็นการทดสอบผลจากการละลายของสารบางอย่างจาก DFDB หรือ FDB สารทั้งสองจะถูกโรยลงใน tissue culture insert ในอัตราส่วน 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตรของจานเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจะมีปริมาณเท่ากับที่โรยบนจานเลี้ยงเซลล์โดยตรง แล้วนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตอบสนองต่อสารที่หลั่งออกมาจาก DFDB/FDB คล้ายกับการทดลองข้างต้น คือจะมีระดับอาร์เอ็นเอของออสติโอพอนทินและโบนไฮเอโลโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทวิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ในการดิฟเฟอเรนเชีย โดยการกระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซน และเลี้ยงในสภาวะที่กรดแอสคอร์บิก และเบตากลีเซอโรฟอสเฟต ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถกระตุ้นดิฟเฟอเรนเชีย รวมทั้งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดตะกอนอนินทรีย์ในจานเลี้ยงเซลล์ของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของหนูได้²⁰ ซึ่งผลของการทดลองแสดงว่า เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์ สามารถตอบสนองต่อสภาวะการกระตุ้นดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน โดยจะพบการเกิดตะกอนอนินทรีย์ในจานเลี้ยงเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 16-18 วัน (รูปที่ 1) เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีเดกซาเมทาโซน (ไม่ได้แสดงผลไว้)

นอกจากการเกิดตะกอนอนินทรีย์แล้ว เซลล์ในสภาวะดังกล่าว ยังมีการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวด้วย โดยสามารถแบ่งการจัดเรียงตัวได้เป็น 4 ระยะ คือระยะเรียงตัวชั้นเดียว ระยะซ้อนกันหลายชั้น ระยะเกิดโนดูล และระยะเกิดตะกอนอนินทรีย์ เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์ของหนู และเมื่อทำการวิเคราะห์ระดับของออสติโอพอนทินและโบไนไซเอโลโปรตีน ปรากฏว่า เซลล์เหล่านี้ จะสร้างอาร์เอ็นเอเนอาร์หัสของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ เพิ่มขึ้นมากในระยะที่มีการจัดเรียงตัวแบบโนดูล ซึ่งเป็นระยะก่อนการเกิดตะกอนอนินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ทั้งจากเซลล์กระดูกและเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของหนูว่า ระดับของอาร์เอ็นเอเนอาร์หัสของออสติโอพอนทินและโบไนไซเอโลโปรตีน จะเพิ่มขึ้นก่อนการเกิดตะกอนอนินทรีย์²⁴⁻²⁹

เมื่อทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ต่อ DFDB และ FDB ปรากฏว่า หากปริมาณของสารทั้งสองชนิดมากเกินไปจะทำให้เกิดความเป็นพิษ และพบการตายของเซลล์ คณะผู้วิจัยได้พยายามทดสอบระดับการใช้สารทั้งสองที่เหมาะสมกับจำนวนเซลล์และไม่ทำให้เกิดการตาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อตั้งความหนาแน่นของเซลล์ไว้ที่ 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ปริมาณของ DFDB และ FDB ที่ใช้ ไม่ควรเกินกว่า 2 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร อย่างไรก็ตาม ที่ระดับดังกล่าว แม้ว่าจะมองไม่เห็นการตายของเซลล์อย่างชัดเจน แต่เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลล์จะมีลักษณะผอมบาง และมีการเจริญที่ช้ากว่าปรกติ แต่เมื่อลดความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร เซลล์จะมีรูปร่างและอัตราการเจริญปรกติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ของ DFDB และ FDB จะไม่มีผลต่อรูปร่างของเซลล์ ผลการทดสอบระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในสภาวะดังกล่าว กลับ

พบว่าทั้งสองความเข้มข้นของ DFDB และ FDB ไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์ที่เซลล์สร้างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน แต่ DFDB/FDB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม สามารถกระตุ้นการสร้างอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของออสติโอพอนทิน ในขณะที่ DFDB/FDB ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมไม่สามารถกระตุ้นออสติโอพอนทินได้ เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 4-8 วัน แสดงให้เห็นว่าผลของการตอบสนองของเซลล์ต่อ DFDB และ FDB จะเป็นในลักษณะที่แปรผันกับความเข้มข้น อย่างไรก็ตาม หากทดลองเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลาสั้นขึ้น ก็จะมีการเพิ่มขึ้นของออสติโอพอนทินเช่นกัน (ไม่ได้แสดงผลไว้) แสดงว่าการตอบสนองในแง่ของการกระตุ้นออสติโอพอนทินขึ้นกับเวลาที่กระตุ้นด้วย

ผลการตอบสนองของเซลล์ต่อ DFDB และ FDB ที่แปรผันกับเวลาและความเข้มข้นนี้ คล้ายคลึงกับผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อเดกซาเมทาโซน โดยระดับของเดกซาเมทาโซนที่ใช้จะตรงเหมาะสมจึงจะสามารถกระตุ้นการเกิดตะกอนอินทรีย์ได้ นอกจากนี้ ผลของเดกซาเมทาโซนในการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน ต้องใช้เวลาในการกระตุ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่สะท้อนให้เห็นว่าการตอบสนองน่าจะไม่ได้เกิดจากผลของสารกระตุ้นโดยตรง แต่อาจจะเกิดจากการที่สารกระตุ้นนี้กระตุ้นการสร้างโปรตีนตัวอื่น ๆ ขึ้นก่อน แล้วโปรตีนนั้นจึงมีผลในการกระตุ้นเซลล์อีกทอดหนึ่ง โดยโปรตีนที่เป็นตัวกระตุ้นนี้อาจเป็นสารในกลุ่มโกรทแฟกเตอร์ หรือเป็นโปรตีนกลุ่มที่เป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งมีรายงานจำนวนมากที่แสดงว่าโปรตีนสองกลุ่มนี้ สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์หลายชนิด ๆ ได้³⁸⁻⁴⁰

ประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจในการทดลองครั้งนี้ คือ การที่เซลล์ในสภาวะที่มี FDB สามารถเกิดตะกอนอินทรีย์ได้ในวันที่ 18 คล้ายกับการกระตุ้นด้วยเดกซาเมทาโซน ในขณะที่กลุ่มควบคุม และเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB ไม่เกิด แต่เมื่อตรวจสอบดูการแสดงออกของออสติโอพอนทินและโบนไซเอโอโลโปรตีน กลับพบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของโปรตีนทั้งสองนี้สูง นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสยังสามารถพบได้ตั้งแต่วันแรก ๆ ของการเลี้ยงใน DFDB หรือ FDB ด้วย ผลของการทดลองนี้ สะท้อนให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นหรือการแสดงออกของออสติโอพอนทิน และโบนไซเอโอโลโปรตีน ไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับการเกิดตะกอนอินทรีย์เสมอไป โดยมีความเป็นไปได้ที่การเกิดตะกอนอินทรีย์ จะต้องอาศัยสมดุลย์ของเมทริกซ์นอกเซลล์ที่เหมาะสม หรืออีกประการหนึ่ง อาจเกิดจากการที่มีสารยับยั้งหลั่งออกมาจาก DFDB

อย่างไรก็ตาม ผลของการพบตะกอนอินทรีย์ในสภาวะที่มี FDB นั้น อาจมีข้อโต้แย้งว่า ตะกอนสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นได้นั้น เนื่องจากในสภาวะที่มี FDB นั้น น่าจะมีระดับของแคลเซียมไอออนที่ละลายมาจาก FDB ก่อนข้างสูงในอาหารเลี้ยงเซลล์ หรืออาจเกิดจากการแตกหักของ FDB กระจายลงในจานเลี้ยงเซลล์ แม้ว่าคณะผู้วิจัยจะไม่สามารถแก้ข้อโต้แย้งนี้ได้อย่างชัดเจน แต่ข้อสังเกตประการหนึ่งคือ การเกิดตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงเซลล์นี้ ตรวจพบได้เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา นานกว่า 2 สัปดาห์เท่านั้น โดยจะไม่สามารถตรวจสอบได้ในระยะแรก ซึ่งทำให้เกิดความเป็นไปได้ว่า ตะกอนแคลเซียมน่าจะเกิดขึ้นเองจากสภาวะที่เหมาะสม หรืออีกนัยหนึ่ง ในภาวะที่มี FDB

การที่เซลล์สร้างออสติโอพอนทินเพิ่มขึ้นโดยไม่จำเป็นต้องมีการเกิดตะกอนสารอินทรีย์ควบคู่ไปด้วย อาจเป็นไปได้ที่ออสติโอพอนทินจะมีบทบาทในระยะแรก โดยช่วยการเคลื่อนที่และยึดเกาะของเซลล์ เหนี่ยวนาเซลล์ทำลายกระดูก (osteoclast) ให้เคลื่อนเข้ามาย่อยสลายกระดูกในระยะแรก และกระบวนการสลายกระดูกนี้ จะนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกในระยะต่อมา³⁹ ดังนั้นหากมองในแง่นี้ DFDB และ FDB น่าจะมีบทบาทในการกระตุ้นการปรับเปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อปริทันต์เพื่อการซ่อมแซม (remodeling)

โบนไซเอโลโปรตีน จัดเป็นโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนของสารอินทรีย์ในกระดูกและเนื้อฟัน⁴¹ อย่างไรก็ดี ผลการทดลองนี้ได้แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของโบนไซเอโลโปรตีน ไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับการเกิดตะกอนอินทรีย์ของเมทริกซ์ แต่การเพิ่มขึ้นของโบนไซเอโลโปรตีนนี้ ในประการแรกน่าจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีการดิฟเฟอเรนซิเอทจากการตอบสนองต่อ DFDB หรือ FDB เพียงแต่การเหนี่ยวนำนี้ยังขาดปัจจัยอื่นที่จะร่วมกันกระตุ้นให้เกิดสารอินทรีย์ และในอีกประการหนึ่ง คณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการตรวจวัดระดับของการสร้างโปรตีน ซึ่งอาจมีกลไกอีกส่วนหนึ่งที่ควบคุมการสร้างโปรตีน และผลของ DFDB/FDB อาจจะไม่สามารถกระตุ้นกลไกส่วนนั้นก็เป็นได้ ซึ่งข้อสมมติฐานนี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานว่า โกรทแฟคเตอร์ที่ออกมาจากเมทริกซ์ของกระดูก ทั้ง DFDB และ FDB อาจมีส่วนร่วมในการกระตุ้นเซลล์ คณะผู้วิจัยได้ทดลองเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB และ FDB อยู่ภายใน tissue culture insert ในจานเลี้ยงเซลล์เดียวกัน Insert จะเป็นตัวกั้นไม่ให้เซลล์ได้มีโอกาสสัมผัสโดยตรงกับ DFDB/FDB แต่จะไม่ปิดกั้นอิทธิพลของสารใดๆ ที่หลั่งหรือละลายออกมาจาก DFDB/FDB เข้าสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ จากการที่วิธีการนี้ สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มระดับ

อาร์เอ็นเอเข้ารหัสของออสติโอพอนทินและโบนไซโซโลโปรตีนในระยะเวลายาว แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นที่เกิดขึ้น ส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลของสารที่ละลายออกมาจากวัสดุ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่อาจจะเป็นสารในกลุ่มโกรทแฟกเตอร์ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าการกระตุ้นเกิดจากสารที่ละลายออกมาทั้งหมด นอกจากนี้ ความชัดเจนของการกระตุ้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ในการทดลองเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ผลของการกระตุ้นอาจจะไม่ได้เกิดจากตัว DFDB/FDB หรือเกิดจากสารที่หลั่งออกมาโดยตรงเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากอิทธิพลของ DFDB/FDB ที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้างสารหรือโปรตีนบางชนิดออกมา และสารนั้นๆ จะย้อนมา มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ โดยข้อสมมติฐานนี้ คณะผู้วิจัยกำลังทำการศึกษเพิ่มเติมอยู่ในปัจจุบัน



สรุปผลการทดลอง

เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์มีความสามารถในการดิฟเฟอเรนซิเอท และสามารถสร้างตะกอนอนินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะเมื่อกระตุ้นด้วยเตกซาเมทาโซน และระดับการแสดงออกของออสติโอพอนทีน และโบนไซเอโลโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้นมากในระยะก่อนการตกตะกอนอนินทรีย์

สำหรับ DFDB และ FDB พบว่าวัสดุทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นการแสดงออกของออสติโอพอนทีน และโบนไซเอโลโปรตีนในเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ โดยผลของการกระตุ้นจะแปรผันกับปริมาณของ DFDB และ FDB รวมทั้งต้องอาศัยระยะเวลาในการกระตุ้น และการเพิ่มของโปรตีนสองชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับการเกิดตะกอนอนินทรีย์เสมอไป

ในการเปรียบเทียบสารกระตุ้นทั้งสองชนิด พบว่าทั้ง DFDB และ FDB มีผลในการกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ทั้งคู่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเมื่อเร็วๆ นี้ว่า DFDB และ FDB ไม่ได้มีความแตกต่างในการช่วยเพิ่มการสร้างกระดูกเบาฟันของผู้ป่วยเมื่อติดตามผลในระยะยาว^{9,42} แต่การเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่แสดงถึงการดิฟเฟอเรนซิเอทน่าจะเป็นลักษณะที่บ่งชี้ว่า สารทั้งสองชนิดยังคงมีบทบาทในการช่วยเสริมสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะแรกซึ่งเป็นระยะ remodelling แต่การกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารอนินทรีย์ยังคงต้องอาศัยปัจจัยอื่น ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป



เอกสารอ้างอิง

1. Mellonig JT, Bowers GM, Bright RW, Lawrence JJ. Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. J Periodontol 1976;47:125-32.
2. Sepe WW, Bowers GM, Bright RW, Lawrence JJ. Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. J Periodontol 1976;49:9-14.
3. Werbitt M, Goldberg P. The immediate implant: Bone preservation and bone regeneration. Int J Periodontics Restorative Dent 1992;12:207-17.
4. Mellonig JT Bone allografts in periodontal therapy. Clin Orthop Rel Res 1996;324:116-125.
5. Rummelhart JM, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ. A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. J Periodontol 1989;60:655-63.
6. Barnett JD, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ. Comparison of freeze-dried bone allograft and porous hydroxyapatite in human periodontal defects. J Periodontol 1989;60:231-7.
7. Quintero G, Mellonig JT, Gambill VM, Pelleu GB. A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. J Periodontol 1982;53:726-30.
8. Bowers GM, Chadroff B, Carnevale R, Mellonig JT, Corio R, Emerson J, Stevens M, Romberg E. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans, part III. J Periodontol 1989;60:683-93.
9. Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonnell HT, Cochran DL. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. J Clin Periodontol 1999;26:421-8.
10. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes Jr DL, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. J Periodontol 1998;69:470-8.

11. Zhang M, Powers Jr RM, Wolfinbarger Jr L. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol* 1997;68:1085-92.
12. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 1993;8(Suppl2):S565-72.
13. Mellonig JT, Bowers GM, Bailey RC. Comparison of bone graft materials part I new bone formation with autografts and allografts determined by strontium-85. *J Periodontol* 1981;52:291-6.
14. Urist MR, Sato K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo YK, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GAM, DeLange RJ. Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;173:194-9.
15. Zhang M, Powers Jr RM, Wolfinbarger Jr L. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *J Periodontol* 1997;68:1076-84.
16. Bercerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells *in vitro*: effect of age of donor. *J Bone Miner Res* 1996;11:1703-14.
17. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976;47:256-60.
18. McCulloch CAG, Bodin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* 1991;26:144-54.
19. McCulloch CAG. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1995;1:271-8.
20. 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 Tissue Int* 1995;57:52-9.
21. Kawase T, Sato S, Miake K, Saito S. Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv Dent Res* 1988;2:234-9.

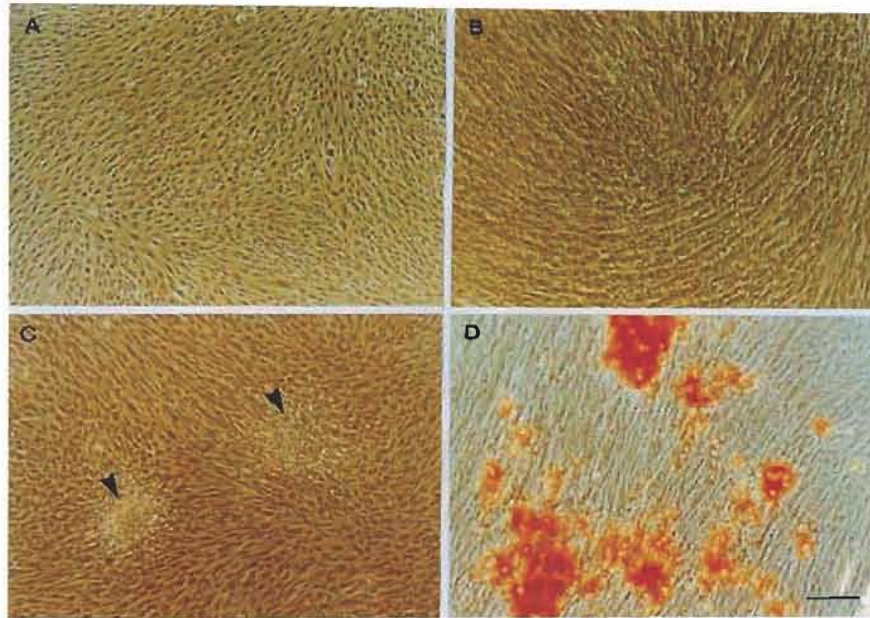
22. Goseki M, Oida S, Takeda K, Ogata Y, Iimura T, Maruoka Y, Sasaki S. Identification of bone-type alkaline phosphatase mRNA from human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1995;74:319-22.
23. Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986;39:382-5.
24. Nagata T, Bellows CG, Kasugai S, Buttler WT, Sodek J. Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. *Biochem J* 1991;274:513-20.
25. Sodek J, Chen J, Kasugai S, Nagata T, Zhang Q, McKee MD, Nanci A. Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. In Slavkin H, Price PA, editors, *Chemistry and biology of mineralized tissues*. *Experpta Medica:Amsterdam*, 1992:297-306.
26. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8562-5.
27. Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec* 1996;244:50-8.
28. Kasugai S, Nagata T, Sodek J. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), SPARC protein during bone formation *in vitro*. *J Cell Physiol* 1992;152:467-77.
29. MacNeil RL, Berry J, D'errico JD, Strayhorn C, Piotrowsky B, Somerman MJ. Role of two-mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis *Connect Tissue Res* 1995;33:1-7[323-9].
30. Darongsuwan T, Pavasant P. *In vitro* effect of hydroxyapatite crystal on gingival and periodontal ligament fibroblasts. *CU Dent J* 1997;20:183-93.

31. Pavasant P, Samrejkamchanakij P. Stimulation of alkaline phosphatase activity in human pulpal fibroblast by 1,25 dihydroxyvitamin D₃ and transforming growth factor-beta. *CU Dent J* 1997;20:173-82.
32. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, m RNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 1990;7:491-502.
33. Kim RH, Shapiro HS, Li JJ, Wrana JL, Sodek J: Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene promoter sequence. *Matrix Biol* 1994;14:31-40.
34. Mitchell WJ, Paula HS, Mary LA, Clive S, Michael R, Harry H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7182-7186.
35. Hanauer A, Mandel JL. The glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene family: structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene; amazing complexity of the gene family in mouse. *EMBO J* 1984;3:2627-33.
36. Lau EC, Li ZQ, Santos V, Slavkin HC. Messenger RNA phenotyping for semi-quantitative comparison of glucocorticoid receptor transcript levels in the developing embryonic mouse palate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:751-8.
37. Biragyn A, Arkins S, Kelley KW. Riboprobe expression cassettes for measuring IGF-I, beta-actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase transcripts. *J Immunol Methods* 1994;10:168:235-44.
38. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenic protein and bone morphogenic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998;326:26-37.
39. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: Role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30:92-102.
40. Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta 1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;5:274:32145-52.
41. Ganass B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol* 1998;10:79-98.

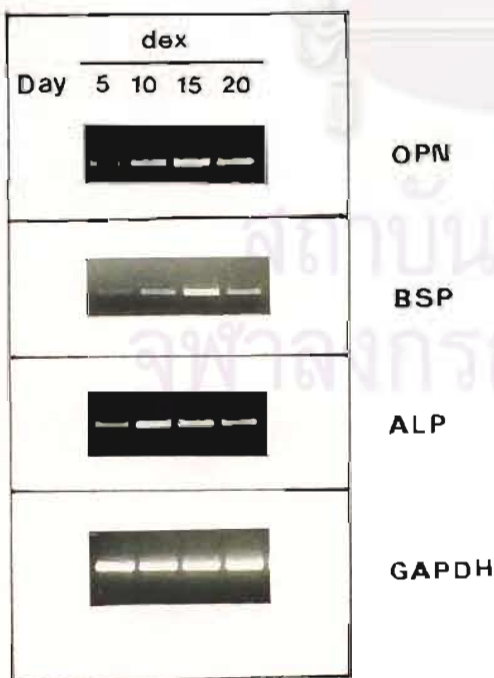
42. Persson GR, Falk H, Laurell L. A retrospective radiographic outcome assessment study of intra-bony defects treated by osseous surgery or by bone graft procedures. J Clin Periodontol 2000;27:104-8.



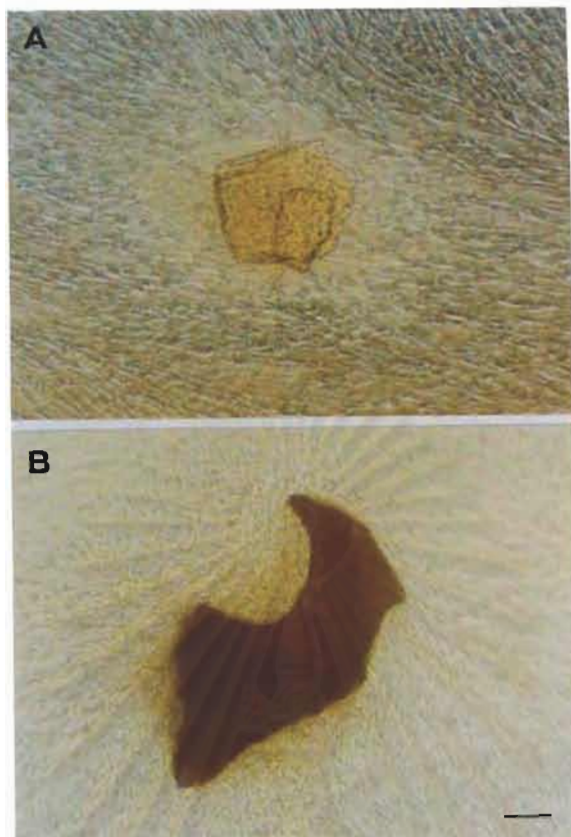
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



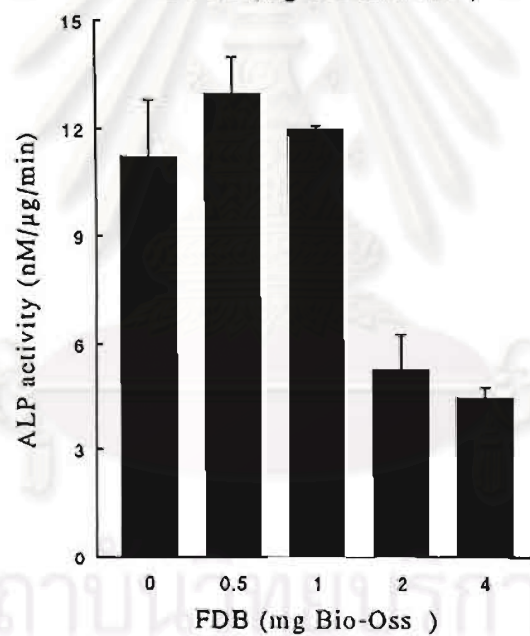
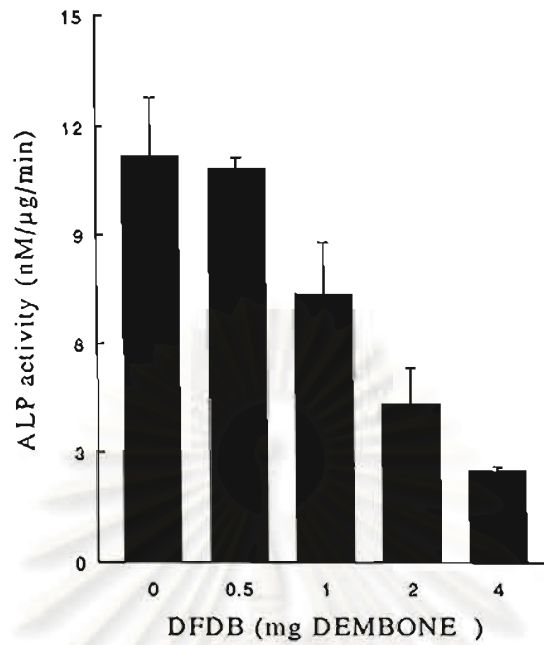
รูปที่ 1 ภาพแสดงระยะต่างๆ ของเซลล์เอ็นดอทีเรียล ที่เลี้ยงในภาวะที่มีกรดแอสคอร์บิก เบตาไกลเซอโรฟอสเฟต และเดกซาเมทาโซน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการจัดเรียงตัวแตกต่างกันตามระยะของการดิฟเฟอเรนเชียต โดยแบ่งเป็น 4 ระยะคือ ระยะที่เซลล์จัดเรียงตัวชั้นเดียว (A) ระยะซ้อนกันหลายชั้น (B) ระยะโนดูล (C) และ ระยะเกิดตะกอนสารอนินทรีย์ ซึ่งสามารถย้อมติดสีอริซารินแดงเป็นสีแดง (D) เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 วัน ตามลำดับ (Bar= 50 ไมโครเมตร)



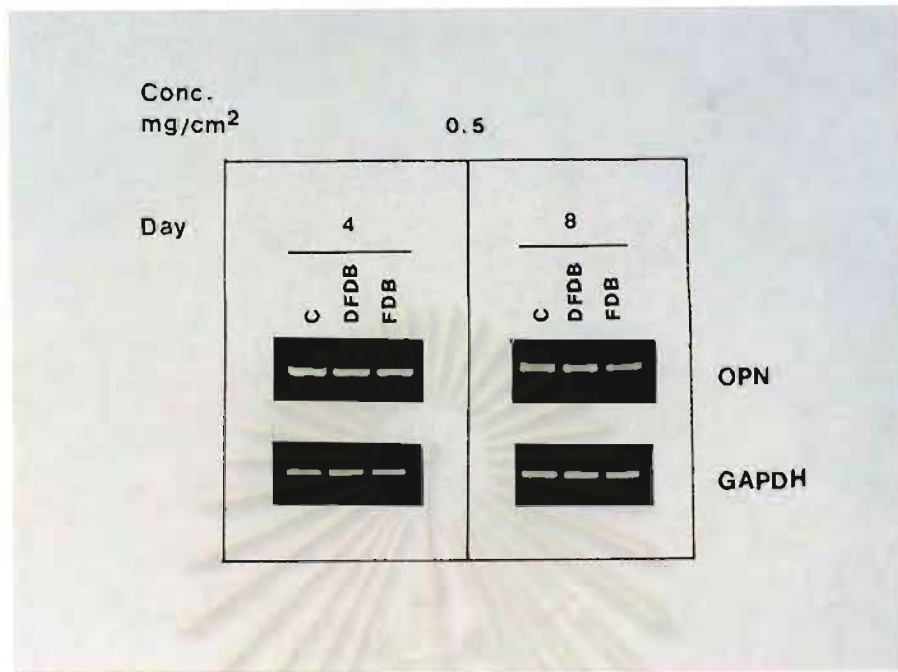
รูปที่ 2 ภาพแสดงสายพันธุกรรมซึ่งได้จากจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ออสติโอพอนทิน โบนไซเอโลโปรตีน อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในระยะต่างๆ ของเซลล์เอ็นดอทีเรียลดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1 โดยใช้ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายในอาร์เอ็นเอถูกสกัดออกจากเซลล์และเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอ จากนั้นนำซีดีเอ็นเอไปขยายสัญญาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจล ภาพนี้แสดงให้เห็นว่าสัญญาณของออสติโอพอนทิน โบนไซเอโลโปรตีน เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ดิฟเฟอเรนเชียต ซึ่งจะเห็นการเพิ่มสูงสุดในระยะโนดูล ส่วนระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีการเพิ่มอย่างชัดเจนก่อนระยะโนดูล



รูปที่ 3 ภาพของเซลล์เอ็นอีทีพรีทันต์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB (รูป A) และ FDB (รูป B) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่เซลล์สามารถเจริญเป็นปกติ และเป็นที่น่าสังเกตว่า เซลล์มีการยึดเกาะรอบวัสดุทั้งสองชนิดอย่างหนาแน่น ในขณะที่เซลล์รอบนอกเจริญซ้อนกันหลายชั้น Bar = 50 um

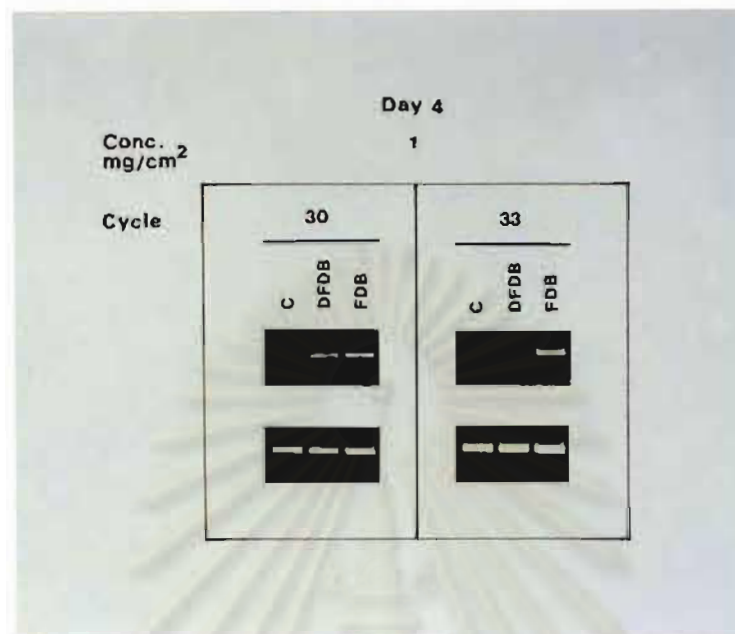


รูปที่ 4 กราฟแสดงระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เซลล์สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี DFDB (รูป A) และ FDB (รูป B) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 3 วัน จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ระดับเอนไซม์ของเซลล์ที่เลี้ยงใน DFDB และ FDB มีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีผลในการลดระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอย่างชัดเจน



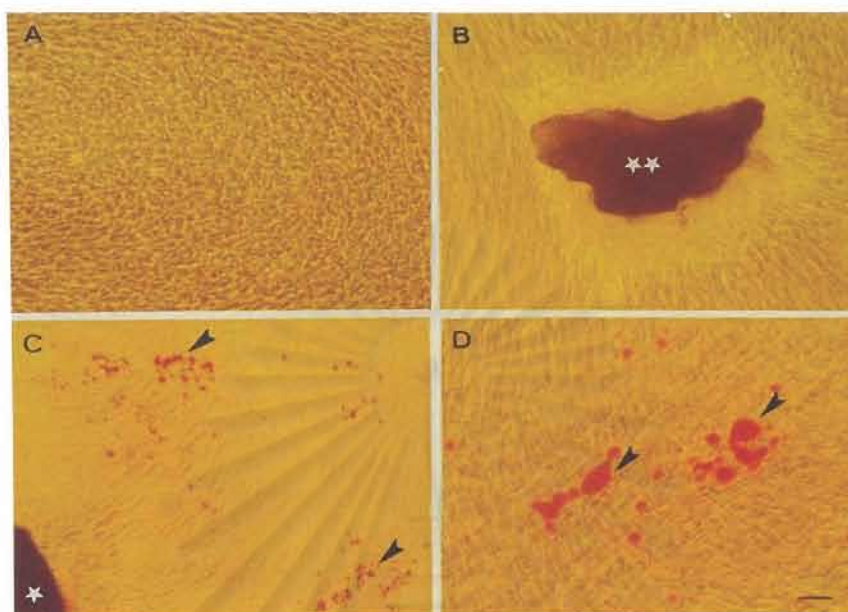
รูปที่ 5 ภาพแสดงสายพันธุกรรมที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อออสติโอพอนทิน และใช้ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน เซลล์ถูกทดสอบโดยเลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 4 และ 8 วัน จากนั้นจึงสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของออสติโอพอนทิน ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของยีนในระยะเวลาดังกล่าว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



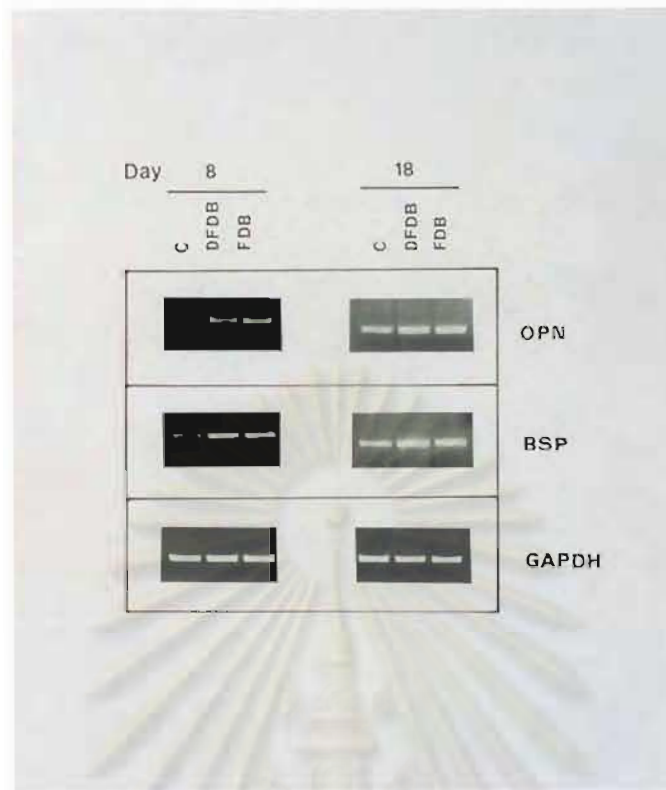
รูปที่ 6 ภาพแสดงสายพันธุกรรมที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อออสติโอพอนทีน และใช้ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน เซลล์ถูกทดสอบโดยเลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของออสติโอพอนทีน ผลการทดลองแสดงว่าออสติโอพอนทีนเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ตัวเลข 30 และ 33 แสดงจำนวนรอบของการทำพีซีอาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 ภาพแสดงเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี DFDB และ FDB เป็นเวลา 18 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าเซลล์ทั้งในกลุ่มควบคุม (A) และในสภาวะที่มี DFDB (B) และ FDB (C) จะมีการเรียงตัวซ้อนกันหลายชั้นคล้ายคลึงกัน และจะเจริญหนาแน่นมากบริเวณโดยรอบ DFDB และ FDB นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่มี FDB จะพบการตกตะกอนของสารอินทรีย์ ซึ่งเห็นได้โดยการย้อมสีอะริซารินเรด (ลูกศร; รูป C และ D) ในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงบน DFDB จะไม่พบตะกอนของสารอินทรีย์ ★★ = DFDB, ★ = FDB, Bar = 50 ไมโครเมตร

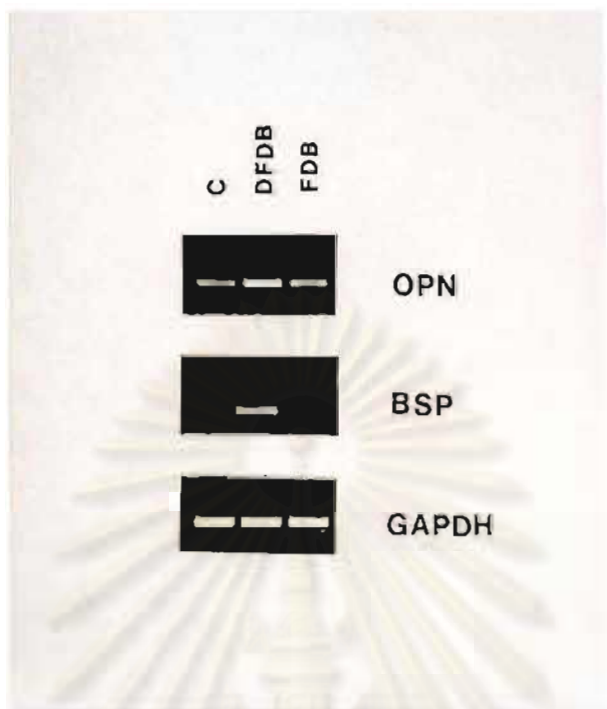
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ภาพแสดงสายพันธุกรรมที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อออกสดีโอพอน ทิน โบไซเอโลโปรตีน และใช้ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 8 และ 18 วัน ในสภาวะที่มี DFDB และ FDB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร จะเห็นว่า DFDB สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโบนไซเอโลโปรตีนได้เด่นชัดตั้งแต่วันที่ 8 แต่ในวันที่ 18 ความแตกต่างจะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม C = กลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 9 ภาพการแสดงออกของออสติโอพอนทีนและโบนไฮโซโลโปรตีนของเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะที่มี DFDB หรือ FDB วางอยู่ใน tissue culture insert เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์ไม่มีการสัมผัสกับวัสดุโดยตรง แต่จะได้รับอิทธิพลจากสารที่ละลายจากวัสดุสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าอิทธิพลจากทั้ง DFDB และ FDB สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอรหัสของโปรตีนทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย