



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ทุนวิจัย  
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย  
เรื่อง

บทบาทของ TGF -  $\beta$ 1 ในกระบวนการตีฟเฟอเรนซิเอชัน  
ของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

โดย

สุภาพร สุทธมนัสวงษ์  
จิรศักดิ์ นพคุณ  
ประสิทธิ์ ภาวสันต์

จพ  
ท 15  
010933

ธันวาคม ๒๕๕๓

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

บทบาทของ TGF- $\beta$ 1 ในกระบวนการตีฟเฟอเรนซิเอชัน  
ของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

สถาบันวิทยบริการ

โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุภาพร สุทมนัสวงษ์ จีระศักดิ์ นพคุณ และ ประสิทธิ์ ภาวสันต์

ธันวาคม 2543

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ. ทพญ. ทศนีย์ ตรงค์สุวรรณ ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ในทุกๆด้าน รวมทั้งขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย และให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้เครื่องมือวิจัย และท้ายที่สุดขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษก สมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่	จพ
	๓15
เลขทะเบียน	010933
วัน,เดือน,ปี	27 กพ. 45

ชื่อโครงการวิจัย	บทบาทของ TGF- $\beta$ 1 ในกระบวนการดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโครงฟันของมนุษย์
ผู้วิจัย	สุภาพร สุทธิมนัสวงษ์ จิรศักดิ์ นพคุณ และ ประสิทธิ์ ภาวสันต์
เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ	ธันวาคม 2543

### บทคัดย่อ

TGF- $\beta$ 1 เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีบทบาทอย่างมากในเมตาบอลิซึมของเซลล์กระดูกและฟัน งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโครงฟันของมนุษย์ต่อ TGF- $\beta$ 1 ในแง่ของการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และระดับการแสดงออกของออสติโอแคลซิน รวมทั้งเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวกับการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ BMP และ BMPR เซลล์โครงฟันถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ผลการทดลองพบว่า ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์กลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรจะเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนในวันที่ 5 และไม่พบความแตกต่างของออสติโอแคลซินระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทั้งในวันที่ 3 และ 5 ระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPRI-A และ BMPRII จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรในวันที่ 5 เช่นเดียวกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อทดลองกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 2 แบบ คือแบบ 7 วัน หรือแบบที่กระตุ้นในช่วง 5 วันแรก แต่ไม่มี TGF- $\beta$ 1 ใน 2 วันถัดมา (แบบ 5+2 วัน) ผลปรากฏว่าระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในแบบ 7 วัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของออสติโอแคลซิน ในขณะที่ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะไม่เพิ่มสูงมากนักในแบบ 5+2 วัน แต่ระดับของออสติโอแคลซินเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า และการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPRI-A และ BMPRII จะเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนเฉพาะในแบบ 5+2 วันเท่านั้น โดยที่การเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และออสติโอแคลซิน แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โครงฟัน ดังนั้นผลการทดลองนี้ แสดงว่า TGF- $\beta$ 1 มีอิทธิพลต่อระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โครงฟัน โดยแปรผันกับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับ TGF- $\beta$ 1 นอกจากนี้ การคงอยู่ในระยะยาวของ TGF- $\beta$ 1 ก็อาจเป็นตัวแปรหนึ่งที่สำคัญต่อระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โครงฟันด้วย และโดยที่การเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและออสติโอแคลซิน สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ BMP และ BMPR ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่การแสดงออกของ BMP และ BMPR จะเกี่ยวข้องกับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โครงฟันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TGF- $\beta$ 1

**Project Title**                    Role of transforming growth factor-beta 1 on human pulpal fibroblast differentiation in vitro

**Name of Investigators** : Supaporn Suttamanatwong, Jeerasak Nopakun and Prasit Pavasant

**Year**                                : December 2000

### Abstract

TGF- $\beta$ 1 is one of the growth factor that plays an important role in metabolism of bone and teeth. The purpose of this study is to investigate the response of cultured human pulpal fibroblasts to TGF- $\beta$ 1, especially the change in alkaline phosphatase (ALP) activity and the expression of osteocalcin. In addition, we would like to compare these responses with the expression of BMP and BMPR. Pulpal fibroblasts were cultured in the presence of 0, 0.1, 1 and 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 for 3 and 5 days. The results indicated that the level of ALP activity increased in the group treated with 0.1 and 1 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 on day 5 as compared to the control. However, there was no difference in the expression of osteocalcin on both day 3 and 5. The expression of BMP-2, BMP-4, BMPR-IA and BMPR-II also increased in the groups treated with 0.1 and 1 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 for 5 days similar to the ALP activity. Next, cells were treated with 0.1 and 1 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 in 2 different experimental designs. The first group was grown in the presence of TGF- $\beta$ 1 for 7 days. In the second group, TGF- $\beta$ 1 was withdrawn from the medium after 5 days treatment and cultured for another 2 days. Only ALP activity was increased up to 8 folds in the presence of TGF- $\beta$ 1 in the first group. Surprisingly, the expression of osteocalcin increased 2 fold in the second group while ALP activity was only 2-3 fold higher than the control. Increased level of BMP-2, BMP-4, BMPR-IA and BMPR-II was also detected only in the second group. Upregulation of ALP and osteocalcin has been shown to indicate the process of cell differentiation, thus, we would like to conclude that TGF- $\beta$ 1 can influence the differentiation of human pulpal fibroblasts in a dose and spatial dependent manner. The duration of TGF- $\beta$ 1 presentation might also be one of the factors that involve in the differentiation process. Furthermore, since the upregulation of BMP and BMPR in this study also corresponds with the change in ALP activity and osteocalcin expression, we would like to propose that TGF- $\beta$ 1 induce the pulpal cell differentiation through the BMP pathway.

## สารบัญ

## หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	4
ผลการทดลอง	7
สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	10
เอกสารอ้างอิง	17
รายการภาพประกอบ	24-30



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟแสดงผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	24
รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ OC ด้วยเทคนิค RT-PCR	25
รูปที่ 3 รูปแสดงผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงของ BMP-2, BMP-4, BMPR-1A และ BMPR-II ในวันที่ 3	26
รูปที่ 4 รูปแสดงผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงของ BMP-2, -4, BMPR-1A และ BMPR-II ในวันที่ 5	27
รูปที่ 5 กราฟแสดงผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 7	28
รูปที่ 6 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของออสติโอแคลซิน (OC) และ BMP ในวันที่ 7	29



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทนำ

โปรตีนในกลุ่มของ TGF- $\beta$  เป็น growth factor ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ได้หลายด้าน ตั้งแต่การกระตุ้นการแบ่งตัว การกระตุ้นและควบคุมการสร้าง extracellular matrix (ECM) ตลอดจนการเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนซิเอชัน (differentiation) ของเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์ของกระดูกและเนื้อฟัน (Heine et al., 1987; Kim and Ballock, 1993; Vaahtokari et al., 1991; Inage and Toda, 1996)

TGF- $\beta$ 1 เป็น growth factor ในกลุ่มนี้ที่มีบทบาทอย่างมากต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูกและเซลล์ของเนื้อฟัน (Akhurst, 1994; D'Souza et al., 1990) รวมทั้งยังเป็น growth factor ที่พบได้มากทั้งในกระดูกและฟันด้วย (Akhurst, 1994; Finkelman et al., 1990; Cassidy et al., 1997) ในกรณีของฟัน มีรายงานว่า TGF- $\beta$ 1 จะมีบทบาททั้งในระหว่างพัฒนาการของฟันและในฟันที่สร้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว โดยจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและควบคุมการสร้าง ECM ของเซลล์โพรงฟัน (Nakashima, 1992; Shirakawa et al., 1994; Shiba et al., 1998) การกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Tziafas and Papadimitriou, 1998; Tziafas et al., 1998) และการรักษาสมดุลภายในเนื้อเยื่อโพรงฟัน (D'souza et al., 1998)

ในระหว่างพัฒนาการของฟัน มีรายงานว่าสัญญาณของ TGF- $\beta$ 1 จะเริ่มปรากฏในเนื้อฟันตั้งแต่ในระยะ bud โดยพบ mRNA ของ TGF- $\beta$ 1 ทั้งในเซลล์ของ dental epithelium และ dental mesenchyme (Lehnert and Akhurst, 1988) จากนั้น ในเนื้อฟันระยะ bell จะพบ mRNA ของ TGF- $\beta$ 1 ในเซลล์เกือบทุกส่วนของเนื้อฟัน ตั้งแต่ inner และ outer dental epithelium, stellate reticulum, เซลล์สร้างเคลือบฟัน (mature ameloblast), เซลล์ของ dental papilla และเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) (Heine et al., 1987; Lehnert and Akhurst, 1988; Vaahtokari et al., 1991; Thesleff and Vaahtokari, 1992; Inage and Toda, 1996) ซึ่งแม้ว่าเซลล์ของ dental papilla จะปรากฏสัญญาณของ TGF- $\beta$ 1 แต่ระดับสัญญาณของ TGF- $\beta$ 1 จะเพิ่มขึ้นอย่างมากในเซลล์สร้างเนื้อฟัน (D'Souza et al. 1998) เมื่อประกอบกับผลของ TGF- $\beta$ 1 ที่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ของ dental papilla ในห้องปฏิบัติการให้เจริญเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Ruch et al., 1995) สนับสนุนบทบาทของ TGF- $\beta$ 1 ในกระบวนการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างเนื้อฟัน

นอกจากบทบาทในการเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างเนื้อฟันในระหว่างพัฒนาการของเนื้อฟันแล้ว ยังมีหลักฐานแสดงว่า TGF- $\beta$ 1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการเกิดเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) เพื่อสร้าง reparative dentin ขึ้นปกป้องเนื้อเยื่อโพรงฟันในกรณีที่ฟันได้รับอันตรายจากการฉีก หรือการกระทบกระเทือนทางกายภาพ (physical trauma) ด้วย (Tziafas and Papadimitriou, 1988; Tziafas



et al., 1998; Hu et al., 1998) ผลจากการทดลองในหนู พบว่าเมื่อปิดรอยทะเลของโพรงฟันด้วย TGF- $\beta$ 1 หรือ dentin extract จะสามารถกระตุ้นการสร้าง reparative dentin ได้ และการกระตุ้นนี้จะถูกยับยั้งเมื่อใช้แอนติบอดี (antibody) ต่ TGF- $\beta$ 1 (Tziafas et al., 1998) ผลการทดลองนี้ สนับสนุนว่า TGF- $\beta$ 1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อฟันด้วย

อันตรายที่เกิดขึ้นกับฟันดังกล่าวข้างต้น มักจะทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน ดังนั้นการซ่อมแซมที่เกิดขึ้น จะเกิดจากดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟันเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เพื่อทำหน้าที่สร้าง reparative dentin (Yamamura 1985) มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน สามารถดิฟเฟอเรนซิเอไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันได้ด้วยตนเอง (Kakehashi et al., 1965; Yamamura, 1985) ความพยายามที่เกิดขึ้นในงานวิจัยเกี่ยวกับเนื้อเยื่อโพรงฟัน คือการทำความเข้าใจถึงสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น หรืออีกนัยหนึ่ง คือการพยายามศึกษากลไกที่กระตุ้นดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งก็ยังไม่มีความชัดเจนเท่าที่ควร โดยโปรตีนเป้าหมายตัวหนึ่ง คือ TGF- $\beta$ 1 ซึ่งพบได้มากภายในเนื้อฟัน (D'Souza et al., 1998) และจะถูกปล่อยออกมาสู่เนื้อเยื่อโพรงฟันเมื่อฟันได้รับอันตราย นอกจากนี้ เนื้อเยื่อโพรงฟันอาจได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่หลั่งออกมาเป็นจำนวนมากจากเกล็ดเลือดที่แข็งตัว (Centrella et al., 1986) ในกรณีที่เกิดบาดแผลของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

นอกจาก TGF- $\beta$ 1 แล้ว โปรตีนในกลุ่มที่ชื่อว่า bone morphogenic protein หรือ BMP ก็เป็นโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งที่น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน BMP เป็น growth factor ในกลุ่มเดียวกับ TGF- $\beta$  และถูกค้นพบครั้งแรกจากความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิดกระดูก ซึ่งต่อมา พบว่า growth factor กลุ่มนี้ประกอบด้วยสมาชิกอย่างน้อย 7 ชนิด คือ BMP-2 ถึง BMP-8 และแต่ละชนิดก็จะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป ทั้งในระหว่างพัฒนาการและการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อนินทรีย์ (รวบรวมไว้โดย Sakou, 1998; Groeneveld and Burger, 2000)

เช่นเดียวกับ TGF- $\beta$ 1 สัญญาณของ BMPs จะพบได้ในระหว่างพัฒนาการของหน่อฟัน เช่น BMP-2, -4, และ -7 จะพบได้ใน dental epithelium, dental papilla และเซลล์สร้างเนื้อฟัน ในขณะที่จะพบ BMP-3 เฉพาะที่ dental follicle ซึ่งจะเจริญไปเป็นเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblast) (Lyons et al., 1990; Vanio et al., 1993; Heikinheimo, 1994; Aberg et al., 1997) เป็นต้น ซึ่งแสดงถึงหน้าที่ที่แตกต่างกันของ BMPs ในพัฒนาการของหน่อฟัน รวมทั้งพบ BMP ในเนื้อเยื่อโพรงฟันและเมทริกซ์ของเนื้อฟันในฟันที่สร้างสมบูรณ์แล้วด้วย (Takeda et al., 1994; Gu et al., 1996; Toyono et al., 1997a; Nakashima et al., 1998; Smith et al., 1998) และยังมีรายงานว่าการใช้

recombinant BMP-2, -4, -7 จะสามารถชักนำให้เกิดการสร้าง reparative dentin มาปิดรอยทะลุของประสาทฟันในสัตว์ทดลองได้เช่นกัน (Rutherford et al., 1993; 1994; Nakashima, 1994)

แม้จะมีความคล้ายคลึงกัน ในแง่ของบทบาทของ TGF- $\beta$ 1 และ BMP ที่มีต่อการซ่อมแซมเนื้อฟัน แต่จังหวะเวลาของการแสดงออกของ growth factors ทั้งสองนี้ จะมีความแตกต่างกัน โดยในเนื้อฟัน จะพบว่าระดับของ TGF- $\beta$ 1 จะเริ่มลดลง ก่อนที่จะเริ่มพบการแสดงออกของ BMP ในระยะที่เริ่มมีการสร้างเนื้อฟัน (Begue-Kirn et al., 1994; Aberg et al., 1997) และเมื่อทำการศึกษาขั้นตอนของกระบวนการดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์เนื้อเยื่อโพรงฟันไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันในห้องปฏิบัติการ (Nakashima et al., 1994) พบว่า TGF- $\beta$ 1 จะมีการแสดงออกตั้งแต่ระยะแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นระดับของ TGF- $\beta$  จะค่อยๆ ลดลง ตามด้วยการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปถึงวันที่ 28 ก็จะมีพบการแสดงออกของ BMP-2 ซึ่งเป็นระยะที่มีระดับออกสติโอแคลซิน (osteocalcin) เพิ่มมากขึ้น (Nakashima et al., 1994) นอกจากนี้ ในระหว่างการเกิดการดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างเนื้อฟัน ยังพบการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ BMP receptor ด้วย (Toyono et al., 1997b) ซึ่งผลการศึกษาข้างต้น สอดคล้องกับรายงานการเหนี่ยวนำเซลล์หลายชนิดด้วย exogenous BMP หรือ TGF- $\beta$  ซึ่งจะกระตุ้นการสร้าง endogenous BMP เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำ ซึ่งทำให้เกิดข้อสมมติฐานว่า กระบวนการดีฟเฟอเรนซิเอชันที่ดำเนินต่อไปนั้น น่าจะเป็นผลของ endogenous BMP (Erickson et al., 1997)

เพื่อเป็นการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่าง TGF- $\beta$ 1 กับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยเฉพาะในแง่ของการแสดงออกของ BMP และ BMPR คณะผู้วิจัยได้ทดลองเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ด้วย TGF- $\beta$ 1 จากนั้นจึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โดยดูที่การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ OC ซึ่งเป็นโปรตีนที่สะท้อนถึงความสามารถของเซลล์ในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ (Aubin et al., 1993) โดยพบว่า ในเซลล์กระดูก การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะบ่งชี้ถึงการเข้าสู่ maturation stage ของเซลล์สร้างกระดูก ในขณะที่การเพิ่มการสร้าง OC จะบ่งชี้ถึงระดับของดีฟเฟอเรนซิเอชันขั้นสุดท้ายของเซลล์สร้างกระดูก ทั้งนี้ การศึกษามูลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและ OC ครั้งนี้ จะศึกษาควบคู่ไปกับการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ BMP และ BMPR โดยหวังว่า ความเข้าใจในกระบวนการที่เกิดขึ้น จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนา TGF- $\beta$ 1 ไปใช้เป็นสารกระตุ้นการสร้าง reparative dentin ในทางคลินิกต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

### เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เนื้อเยื่อโพรงฟันได้จากฟันกรามซี่ที่สามของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่คณะทันตแพทยศาสตร์ เพื่อเหตุผลทางการจัดฟันหรือผ่าฟันคุด โดยที่ไม่มีการผูกของฟันหรือการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์ ฟันจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์โซลยาล์ด ที่ปราศจากเชื้อ (Sterile phosphate buffer saline) หลายๆ ครั้ง จากนั้นจะถูกตัดด้วยเครื่องมือทางทันตกรรม เพื่อเปิดส่วนของโพรงฟัน ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อดึงเอาเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมา หั่นออกเป็นชิ้นเล็กๆ และวางลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร (60 mm-Nunc tissue culture dish, Denmark) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotic) และเพาะเลี้ยงในตู้บเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศร้อยละ 5

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนเซลล์สร้างเส้นใยเคลื่อนตัวออกจากชั้นเนื้อที่เลี้ยงไว้ และเจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ (confluence) แล้วจึงทำการถ่าย (subculture) เซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยถ่ายที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ  $2.5 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร และเริ่มบันทึกรุ่นของเซลล์ โดยเริ่มจากรุ่นที่ 1

### การกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมสำหรับการศึกษากลไกของ TGF- $\beta$ 1 ต่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม สำหรับการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของ OC และ BMP ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยจะถ่ายเซลล์ที่ความหนาแน่นเท่ากัน คือ  $2.5 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร หลังจากถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่มีซีรัมร้อยละ 1 เพื่อลดอิทธิพลของซีรัมลงให้มากที่สุด โดยจะเปลี่ยน 2 รอบ รอบละ 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงเริ่มกระตุ้นเซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 1 และมี TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่มีระดับ TGF- $\beta$ 1 เท่ากับ 0 จะเติมตัวทำลายของ TGF- $\beta$ 1 ลงไปในปริมาณเท่ากับหลุมที่เติม TGF- $\beta$ 1 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity assay)

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 3-5 วัน การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใช้วิธีการที่รายงานแล้ว (Pavasant and Sumrejkanchanakij, 1997) ดังนี้ เมื่อครบกำหนดเวลาในการกระตุ้น เซลล์ในจานเลี้ยงจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ยัด 1 ครั้ง ก่อนที่จะทำให้เซลล์แตก และละลาย extracellular matrix โดยการขูด (scrape) ด้วย extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 10, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X-100) โดยใช้ปริมาณบัฟเฟอร์เท่ากับ 100 ไมโครลิตร/หลุม

สารละลายที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ในส่วนแรกจะถูกดูดออกไปวัดโปรตีน โดยใช้ชุดวัดโปรตีน DC-10 (Bio-Rad) และส่วนที่สองจะใช้วัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยนำไปผสมกับสารละลายของพาราไนโตรฟินิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate) (1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate, 0.1 M 2-amino-2-methyl-1-propanol, 2 mM MgCl<sub>2</sub> pH 10.5) โดยพาราไนโตรฟินิลฟอสเฟตจะทำหน้าที่เป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเปลี่ยนพาราไนโตรฟินิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตรฟินอล (p-nitrophenol) ซึ่งจะเป็นสีเหลือง เมื่อครบกำหนดเวลา ปฏิกิริยาจะถูกหยุดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีปริมาณ 10 เท่าของปริมาณสารละลายทั้งหมด จากนั้น

จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเป็นค่าการทำงานของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราไนโตรฟินอลที่ใช้เป็นมาตรฐาน ค่าการทำงานของเอนไซม์จะคำนวณเป็นนาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที

การวัดปริมาณของ OC, BMP และ BMPR ด้วยเทคนิค RT-PCR

เมื่อครบกำหนดเวลาในการกระตุ้น RNA จะถูกแยกจากเซลล์ด้วย TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท ปริมาณ RNA ที่แยกได้ จะถูกวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร จากนั้น RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลอง จะถูกนำไปผ่านกระบวนการ reverse transcriptase (RT) โดยใช้เอนไซม์ AMV (avian myeloblastosis virus, Promega) เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

เมื่อเสร็จกระบวนการสร้าง cDNA แล้ว cDNA ที่ได้จะถูกนำมาขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase (Hot start taq polymerase, Quiegen) และใช้

primer ที่จำเพาะต่อ OC, BMP-2, BMP-4, BMPR-IA (ALK-3) และ BMPR-II Primers ทั้งหมดสังเคราะห์โดยบริษัทไทย โดยออกแบบขึ้นจากลำดับของสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีรายงานแล้ว (OC: Celeste et al., 1986; BMP-2: Wozney et. al., 1988; BMP-4: Shore et al., 1998; BMPR-IA: ten Dijke et al., 1993; BMPR-II: Kawabata et al., 1995) และในทุกการทดลอง จะใช้ primer คู่ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และลำดับของสายนิวคลีโอไทด์ของ GAPDH ได้จาก Arcari et al., 1984) ซึ่งเป็น house keeping gene ในการขยายสัญญาณควบคุมไปด้วย เพื่อเป็น internal control ของการทดลองในการตรวจสอบว่าปริมาณของ RNA เริ่มต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากันในทุกกลุ่ม

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ Primers ที่ใช้คือ

OC sense	5' ACCGAGACACCATGAGAG 3'
OC antisense	5' CTGGTGTAGCCGAAAGTCCT 3'
BMP-2 sense	5' ACCCGGGAGAAGGAGGAGG 3'
BMP-2 antisense	5' GGTGATGGAAACTGCTATTGT 3'
BMP-4 sense	5' CGAGCCATGCTAGTTTGATAC 3'
BMP-4 antisense	5' GTAACGATCGGCTAATCCTGA 3'
BMPR-IA sense	5' GCACTGTCCAGATGATGCTAT 3'
BMPR-IA antisense	5' TTGGCAATAGTTCGCTGAACC 3'
BMPR-II sense	5' CAATCTGTGGGTTGTGACTC 3'
BMPR-II antisense	5' CGAGTTAGTGGCATCCACAA 3'
GAPDH sense	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'
GAPDH antisense	5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'

ปฏิกิริยาของ PCR ในการทดลองครั้งนี้ คือ อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 15 นาที 1 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 1 นาที 60 เซลเซียส 1 นาที 72 เซลเซียส 1 นาที 45 วินาที อีก 26 รอบ สำหรับ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA, GAPDH และ 32 รอบสำหรับ OC, BMPR-II ตามด้วย final extension ที่ 72 เซลเซียส อีก 10 นาที

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 1.5 และถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลารอยด์บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet)



## ผลการทดลอง

### การเปลี่ยนแปลงในวันที่ 3 และ 5 หลังการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1

ผลการทดลองในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 สามารถเพิ่มระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ และการกระตุ้นนี้ จะขึ้นกับระดับความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 ที่ใช้กระตุ้นเซลล์ อย่างไรก็ตาม ผลของการเพิ่มระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสนี้ จะเห็นได้เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 5 วันเท่านั้น ในขณะที่ผลการกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 3 วัน จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ที่ชัดเจนระหว่างกลุ่มทดลองหรือกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 และกลุ่มควบคุม

ข้อสังเกตประการหนึ่งในการทดลองนี้ คือ ระดับการแสดงออกของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่รายงานในรูปที่ 1 นี้ คัดเลือกจากการทดลองซ้ำสอง สองครั้ง โดยการทดลองแต่ละครั้งจะใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยคนละคน ปัญหาประการหนึ่งคือเซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยแต่ละคนจะมีระดับการแสดงออกของเอนไซม์ไม่เท่ากัน และอาจต่างกันได้มากกว่า 1 เท่าตัว ดังนั้น ผลการทดลองที่นำมาแสดงนี้ จึงได้คัดเลือกจากเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันมาแสดง อย่างไรก็ตาม ในเซลล์จากผู้ป่วยรายอื่นที่ได้ทำการทดลองอีก 2 คน ก็ให้ผลในทิศทางเดียวกันแต่ค่าตัวเลขแตกต่างกันและมีได้นำมาแสดงในที่นี้

โดยที่การเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในเซลล์ที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 นั้น จะเริ่มเห็นได้ชัดที่วันที่ 5 รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นนั้น จะแตกต่างกันไปตามความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 ที่ใช้กระตุ้นเซลล์ แสดงว่าผลของ TGF- $\beta$ 1 ที่มีต่อระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน จะแปรผันตามระยะเวลาที่กระตุ้นและ แปรผันกับความเข้มข้นของสารที่ใช้กระตุ้น

ในขณะเดียวกัน เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับของ mRNA ของออสติโอแคลซินในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเทคนิค RT-PCR ปรากฏว่า หลังการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ทั้ง 3 ความเข้มข้นเป็นเวลา 3 วัน จะยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ ออสติโอแคลซินอย่างชัดเจน (รูปที่ 2A) แต่เมื่อกระตุ้นเป็นเวลา 5 วัน ปรากฏว่าระดับของออสติโอแคลซินจะลดลงในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับระดับของ GAPDH ที่ใช้เป็น internal control (รูปที่ 2B) โดยจะลดลงเหลือเพียงประมาณร้อยละ 60 ของกลุ่มควบคุม เมื่ออ่านค่าความเข้มของแถบ PCR product ด้วย densitometer ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน

ในขั้นต่อมา คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 กับการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II โดยทำการตรวจสอบในวันที่ 3 และ 5 หลังการกระตุ้น เช่นเดียว

กับการตรวจสอบระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและออสติโอแคลซินข้างต้น ผลการทดสอบแสดงไว้ในรูปที่ 3 และ 4 ซึ่งแสดงระดับของ mRNA ของโปรตีนทั้ง 4 ตัวในวันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ

ผลในรูปที่ 3 แสดงว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันสามารถสร้าง mRNA ของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี TGF- $\beta$ 1 และเมื่อเปรียบเทียบต่อระดับของ GAPDH ที่เท่ากัน ปรากฏว่า การแสดงออกของ BMP-2, -4 และ BMPR-IA จะอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันและสูงกว่าระดับการแสดงออกของ BMPR-II

ในสภาวะที่เซลล์ได้รับ TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 3 วัน ระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II ในทุกกลุ่มทดลองจะไม่แตกต่างกัน กับระดับการแสดงออกในกลุ่มควบคุม

แต่เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 5 วัน ผลปรากฏว่าระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II ในกลุ่มที่ได้รับการ TGF- $\beta$ 1 จะมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (รูปที่ 4) โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ระดับการแสดงออกของ BMP-2 จะมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด คือจะสูงกว่าระดับการแสดงออกในกลุ่มควบคุมถึงประมาณ 5-6 เท่า เมื่อวิเคราะห์ด้วย densitometer ในขณะที่การแสดงออกของ BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II จะสูงกว่าระดับการแสดงออกในกลุ่มควบคุมเพียง 1.5-2 เท่า ส่วนกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ปรากฏว่าระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4 และ BMPR-IA จะกลับต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยจะมีระดับการแสดงออกเพียงประมาณร้อยละ 20 ของกลุ่มควบคุม เมื่อเทียบกับระดับ GAPDH ที่เท่ากัน ส่วนการแสดงออกของ BMPR-II ในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จะไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม

การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II นี้สอดคล้องกับทิศทางการเปลี่ยนแปลงที่พบในการตรวจสอบเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 วันเหมือนกัน

#### การเปลี่ยนแปลงในวันที่ 7 หลังการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1

คณะผู้วิจัยได้ทดลองติดตามผลหลังจากที่พบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส, BMP และ BMPR ในสภาวะที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรไปอีก 2 วัน ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 5 และ 6 โดยในรูปที่ 5 แสดงการระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในวันที่ 7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $10.26 \pm 0.57$ ,  $17.9 \pm 2.07$  และ  $89 \pm 18.3$  นาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที ในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม

คุม), 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ผลจากเซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 2 ราย และทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งด้วยเหตุผลเดียวกันกับที่กล่าวถึงข้างต้น) ซึ่งจะมีทิศทางคล้ายกับผลในวันที่ 5 แต่จะเพิ่มสูงกว่าโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมของ TGF- $\beta$ 1

คณะผู้วิจัยได้ทดลองล้างเอา TGF- $\beta$ 1 ออกหลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 5 วัน แล้วเลี้ยงต่อไปอีก 2 วันจนครบ 7 วัน เทียบกับกลุ่ม 7 วันข้างต้น และขอเรียกกลุ่มนี้ว่ากลุ่ม 5+2 วัน เพื่อที่จะศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงที่พบในวันที่ 5 นั้น จะสามารถคงอยู่ด้วยตนเองได้ต่อไปหรือไม่ หรือต้องการการคงอยู่ของ TGF- $\beta$ 1 ผลปรากฏว่า ระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะไม่เพิ่มสูงเท่ากับกลุ่ม 7 วัน อย่างไรก็ตาม ระดับของเอนไซม์ในกลุ่มที่เคยได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัมในช่วง 5 วันแรก ยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุม ถึง 2 และ 3 เท่าตามลำดับ (รูปที่ 5)

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของออสติโอแคลซิน ในกลุ่ม 7 วันและ 5+2 วัน ปรากฏว่า ในกลุ่ม 7 วัน ระดับของออสติโอแคลซินยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากกลุ่มควบคุม แต่ในกลุ่ม 5+2 วัน ระดับการแสดงออกของออสติโอแคลซิน กลับเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า ในกลุ่มที่เคยได้รับ TGF- $\beta$ 1 ทั้งสองความเข้มข้น (รูปที่ 6)

นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II ที่คล้ายคลึงกับออสติโอแคลซินด้วย กล่าวคือ ระดับการแสดงออกของ BMP-2 และ BMPR-II ในกลุ่ม 7 วัน จะกลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ทั้งที่ระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองนี้ เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 5 ในขณะที่การแสดงออกของ BMP-4 และ BMPR-IA ยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 1.3-1.4 เท่า ซึ่งลดลงจากระดับในวันที่ 5 เช่นเดียวกัน

แต่ในกลุ่ม 5+2 วัน การแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II จะยังคงอยู่ในระดับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน โดยสูงกว่ากลุ่มควบคุม 5-6 เท่า ที่ความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 เท่ากับ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 2 เท่า ที่ความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 เท่ากับ 0.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ผลการทดลองนี้ ชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในวันที่ 5 สามารถคงอยู่ได้โดยไม่ต้องอาศัยการคงอยู่ของ TGF- $\beta$ 1 อย่างไรก็ตาม การคงอยู่ของ TGF- $\beta$ 1 จนถึงวันที่ 7 ก็จะสามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ต่างไปจากสภาวะที่ไม่มี TGF- $\beta$ 1 และผลของ TGF- $\beta$ 1 ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและออสติโอแคลซินในวันที่ 5 และ 7 นี้ แสดงให้เห็นว่าการได้รับ TGF- $\beta$ 1 จะมีผลต่อระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันได้ภายใน 7 วัน



## บทวิจารณ์และบทสรุป

ผลการศึกษาค้นคว้านี้ แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันต่อ TGF- $\beta$ 1 จะแปรผันทั้งต่อความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 และแปรผันกับระยะเวลาที่เซลล์ได้สัมผัสกับ TGF- $\beta$ 1 โดยเซลล์ที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 วัน จะมีระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ตลอดช่วงเวลา 7 วันที่เซลล์ได้รับการกระตุ้น จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของออสติโอแคลซินอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม หากหยุดการกระตุ้นภายหลังจากที่พบการเพิ่มสูงขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะกลับพบการเพิ่มขึ้นของออสติโอแคลซินเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงว่าช่วงจังหวะเวลาที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 จะมีอิทธิพลต่อระดับดีฟเฟอเรนเชียลของเซลล์โพรงฟัน

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในระหว่างการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ โดยจะทำหน้าที่ในการจัดเตรียมฟอสเฟตไอออนสำหรับการเกิดตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต (Ten Cate, 1994) และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสถูกใช้เป็น marker ตัวหนึ่งในการบ่งชี้ว่าเซลล์นั้นๆ เป็นเซลล์สร้างกระดูก (Aubin et al., 1993) นอกจากเซลล์สร้างกระดูกแล้ว เซลล์โพรงฟันจะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์นี้เช่นกัน (Nakashima, 1992) และเป็นที่ยอมรับกันว่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์นี้ สะท้อนความสามารถของเซลล์ในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ (Wlodarski and Reddi, 1986)

ระดับของเอนไซม์ตัวนี้ นอกจากจะใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ของเซลล์แล้วยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ยังแสดงถึงระดับดีฟเฟอเรนเชียลที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย ในกรณีของเซลล์กระดูก มีรายงานว่า ระดับของดีฟเฟอเรนเชียลจะแบ่งได้เป็น 4 ช่วงใหญ่ๆ ได้แก่ ช่วงของการแบ่งตัว (proliferation phase) ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวและสร้างโปรตีนที่พบได้ในเนื้อเยื่อยึดต่อต่างๆ ไป เช่น คอลลาเจนและไฟโบรเนกติน (fibronectin) ช่วงที่ 2 จะเป็น early maturation phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดแบ่งตัวและเริ่มสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส รวมทั้ง noncollagenous proteins บางชนิด ซึ่งพบได้มากในกระดูกและฟัน เช่น osteopontine (OPN) ช่วงที่ 3 เป็น late maturation ซึ่งเป็นช่วงที่จะพบ matrix modulation เพื่อให้เหมาะสมกับการเกิดตะกอนอินทรีย์ โปรตีนที่พบมากในช่วงนี้ ได้แก่ bone sialoprotein และเริ่มพบการแสดงออกของออสติโอแคลซิน และในช่วงสุดท้ายคือช่วง mineralization phase ซึ่งจะพบการเกิดผลึก hydroxyapatite และพบการสร้างโปรตีนออสติโอแคลซินจำนวนมาก (รวบรวมโดย Aubin et al., 1993)

ดังนั้น จากผลการทดลองข้างต้น จึงแสดงให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์โพรงฟันผ่านเข้าสู่ระยะ early maturation phase ได้ โดยดูที่การกระตุ้นเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่การคงอยู่ของ TGF- $\beta$ 1 จะมีผลทำให้เซลล์ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ maturation phase ถัดไปได้ โดยดูที่ระดับของออสติโอแคลซินที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ผลของ TGF- $\beta$ 1 ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะพบได้ในเซลล์กระดูกเช่นกัน โดยในเซลล์กระดูก อิทธิพลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์จะขึ้นกับระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์กระดูกด้วย กล่าวคือ ในเซลล์ osteoprogenitor หรือเซลล์อ่อน ระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะลดลงเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ในขณะที่เซลล์ mature osteoblast หรือเซลล์ที่มีระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันที่สูงขึ้น จะมีระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ TGF- $\beta$ 1 (Centrella et al., 1994) อย่างไรก็ตาม ในรายงานเหล่านี้ไม่ได้ระบุชัดเจนถึงความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 ที่มีผลต่อเซลล์กระดูก

ในกรณีของเซลล์โพรงฟัน จะเห็นได้ชัดว่าการตอบสนองต่อ TGF- $\beta$ 1 จะแปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้กระตุ้นเซลล์ การที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 3 หลังได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ในการทดลองนี้ ไม่สามารถตอบได้ว่าเซลล์เหล่านี้ตอบสนองต่อ TGF- $\beta$ 1 ได้หรือไม่ แต่ในการทดลองของคณะผู้วิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อทดลองติดตามผลต่อเนื่องจากวันที่ 1-3 (Pavasant and Samrejkanchanakit, 1997) แต่ TGF- $\beta$ 1 จะสามารถเพิ่มระดับของทั้ง osteonectin (SPARC) และ OPN ได้ภายใน 3 วันทั้งในระดับ mRNA และระดับโปรตีน (ประสิทธิ์ และคณะ รายงานผลการวิจัยเรื่อง ผลของ 1,25(OH) $_2$ D $_3$  และ TGF- $\beta$  ต่อการสร้าง SPARC และ OPN ในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2543) ในช่วงความเข้มข้นเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ผลการทดลองของคณะผู้วิจัยข้างต้น ยืนยันว่าเซลล์โพรงฟันสามารถตอบสนองต่อ TGF- $\beta$ 1 โดยเพิ่มการสร้างโปรตีนในกลุ่ม noncollagenous protein ซึ่งการเพิ่มการสร้างโปรตีนในกลุ่มนี้ (คือ SPARC และ OPN) ในเซลล์กระดูกบ่งชี้ว่าเซลล์ผ่านเข้าสู่ระยะ early maturation phase และหากตีความว่าเซลล์โพรงฟันเข้าสู่ early maturation phase หลังวันที่ 3 การเพิ่มขึ้นของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 5 ก็จะสอดคล้องกับรายงานของ Centrella และคณะ (1994) ที่ระบุว่าเซลล์ที่มีระดับดีฟเฟอเรนซิเอชันที่สูงขึ้น จะมีระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ TGF- $\beta$ 1

อย่างไรก็ดี การเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 5 นี้ ต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อน โดย Shiba และคณะ (1998) ซึ่งพบการลดลงของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 22 วัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ อาจเกิดจากระยะเวลาการกระตุ้นที่แตกต่างกัน โดยการทดลองครั้งนี้ เป็นการดูผลในระยะสั้น คือ

ช่วง 3 และ 5 วัน ซึ่งต่างจากการทดลองข้างต้นที่ดูผลในระยะยาว นอกจากนี้ ปริมาณของซีรัมที่ใช้ยังแตกต่างกัน โดย Shiba และคณะ ใช้ซีรัมในปริมาณร้อยละ 10 ในขณะที่การทดลองนี้ ใช้ซีรัมร้อยละ 1 รวมทั้งยังแตกต่างกันในระดับของความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 ที่ใช้ด้วย กล่าวคือ การทดลองนี้ เริ่มใช้ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ คือที่ 0.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ผลการทดลองจากรายงานของ shiba และคณะ จะใช้ความเข้มข้นสูงกว่า คือที่ 3 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ความเป็นไปได้ประการหนึ่งคือ ระดับของ TGF- $\beta$ 1 ที่แตกต่างกันและระยะเวลาที่ต่างกันจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับดีพีเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันต่างกัน

การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ BMP-2, BMP-4 และ BMPR ซึ่งจะเพิ่มขึ้นในสภาวะที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วันเช่นกัน แม้ว่าผลการทดลองนี้ แสดงได้เพียงความสอดคล้องของช่วงเวลาที่เกิดขึ้น แต่ก็มีข้อสังเกตว่า มีรายงานที่แสดงถึงผลของ BMP-2 ในการกระตุ้นเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ ทั้งในเซลล์ osteoprogenitor ของกระดูก เซลล์กระดูก และเซลล์ที่ยังมีศักยภาพในการดีพีเฟอเรนซิเอทหลายชนิด (Hay et al., 1999; Thies et al., 1992; Yang et al., 2000) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในวันที่ 5 หลังได้รับ TGF- $\beta$ 1 ในเซลล์โพรงฟัน อาจเกิดจากผลของ BMP-2 ที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาเดียวกันนี้ด้วย

เนื่องจากการทำงานของ BMP จะเกิดผ่าน BMP receptor สองชนิด คือ BMPR type I (BMPR-I) และ type II (BMPR-II) โดย BMPR-I จะมีอีกอย่างน้อยสองชนิดย่อย คือ BMPR-IA (เมื่อถูกค้นพบในระยะแรกจะใช้ชื่อ ALK-3 หรือ activin-like kinase 3) และ BMPR-IB (หรือ ALK-6) ซึ่งจะมีความสามารถในการจับกับ BMP แต่ละชนิดต่างกัน ไป BMP จะจับกับ heterodimer ของ receptor ทั้งสองชนิด โดยการจับระหว่าง BMP กับ BMPR-I จะเหนี่ยวนำการเกิด dimerization ของ BMPR-I และ BMPR-II dimer จากนั้นจึงเกิดการส่งผ่านสัญญาณเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง cytoplasmic domain ของ BMPR-II (รวบรวมไว้โดย Sakou, 1998; Groeneveld and Burger, 2000) ดังนั้น ระดับของ mRNA ของ BMPR-IA และ BMPR-II ที่เพิ่มขึ้น ก็สะท้อนว่าเซลล์อาจเพิ่มความสามารถในการตอบสนองต่อ BMP เพิ่มขึ้นด้วย

แม้ว่าจะไม่มีรายงานโดยตรงที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง BMP-4 กับระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการเหนี่ยวนำของ BMP-4 ได้ Nakashima (1994) ได้รายงานผลสำเร็จของการใช้ BMP-2 และ BMP-4 ในการเหนี่ยวนำการเกิด reparative dentin ในฟันสุนัข ซึ่งแสดงถึงอิทธิพลของ BMP-4 ต่อดีพีเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน นอกจากนี้ หลักฐานจากหน่อฟันในระหว่าง

พัฒนาการที่แสดงการปรากฏขึ้นของ BMP-4 ในระหว่างดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์สร้างเนื้อฟัน ก็สนับสนุนว่า BMP-4 น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวด้วย

ดังกล่าวแล้วว่า ผลการทดลองครั้งนี้ ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 กับการเพิ่มขึ้นของ BMP-2 อย่างชัดเจน แม้ว่าจะมีรายงานว่า growth factor ในกลุ่มนี้ มีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของตัวมันเอง หรือกระตุ้นการแสดงออกของ growth factor ตัวอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน (Chen et al., 1997) อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานที่แสดงว่า TGF- $\beta$ 1 จะสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ BMP ได้ แต่จากการแสดงออกของ growth factor กลุ่มนี้ในระหว่างพัฒนาการของเนื้อฟัน (Begue-Kirn et al., 1994; Aberg et al., 1997) พบว่าการแสดงออกของ TGF- $\beta$ 1 และ BMP จะผลัดเปลี่ยนกันไปตามจังหวะและระยะเวลาของพัฒนาการ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ TGF- $\beta$ 1 และ BMP อาจมีความสามารถในเหนี่ยวนำ หรือกระตุ้นการแสดงออกของกันและกันได้

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TGF- $\beta$ 1 และ BMP อีกทางหนึ่งที่เกิดขึ้นอาจเกิดผ่านโปรตีนบางชนิดใน ECM เนื่องจาก growth factor ในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะ TGF- $\beta$ 1 สามารถควบคุมการสร้าง ECM ได้หลายชนิด และมีรายงานว่า ECM บางชนิดสามารถควบคุมการแสดงออกของ growth factor ได้ เช่น SPARC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TGF- $\beta$ 1 ได้เป็นต้น (Francki et al., 1999) และจากผลการทดลองของคณะผู้วิจัย (อ้างถึงแล้ว รายงานผลการวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปี 2543) ที่แสดงว่า TGF- $\beta$ 1 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของทั้ง SPARC และ OPN ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่ผลของโปรตีนทั้งสองที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 (ซึ่งสะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงระดับดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์โพรงฟัน) จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ BMP ในวันที่ 5

ผลของ ECM ยังอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเพิ่มระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยตรงด้วย รายงานโดยคณะผู้วิจัยหลายกลุ่ม แสดงให้เห็นว่า โปรตีนใน ECM จะมีผลต่อดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์กระดูก (Ikeda et al., 1993; Jikko et al., 1999) โดยเฉพาะรายงานของ Jikko และคณะ ที่แสดงว่าการใช้แอนติบอดีต่อเส้นใยคอลลาเจน หรือแอนติบอดีต่อ Integrin receptor จะสามารถยับยั้งผลของ BMP-2 ในการกระตุ้นการเพิ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเซลล์กระดูกที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงที่เคลือบด้วย เส้นใยคอลลาเจน และเซลล์โพรงฟันที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงที่เคลือบด้วยเส้นใยคอลลาเจน, ลามินิน (Laminin) หรือ ไฟโบรเนกติน จะมีระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงปกติ (Aronow et al., 1990; Shiba et al., 1998)) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ในวันที่ 5 จากผลการทดลองครั้งนี้ อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนใน ECM อันเนื่องมาจากอิทธิพลของ TGF- $\beta$ 1 ที่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการสร้าง ECM หลายชนิดเช่น เส้นใยคอลลาเจน ไฟโบร

เนกติน และ SPARC เป็นต้น ในเซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Nakashima M, 1992; Shiba et al., 1997; Melin et al., 2000)

การที่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ BMP-2 และการเพิ่มระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า การเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนเชียชันโดย TGF- $\beta$ 1 ในเซลล์โพรงฟัน จะขึ้นกับระดับของ TGF- $\beta$ 1 ที่เหมาะสมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อ TGF- $\beta$  จะแปรผันตามความเข้มข้นของ TGF- $\beta$  (Arhurst, 1994)

ออสติโอแคลซินเป็นโปรตีนในกลุ่ม non-collagenous ที่พบมากที่สุดในกระดูก หรือพบได้ประมาณร้อยละ 1.5 ของโปรตีนในกระดูก โครงสร้างของโปรตีนตัวนี้ จะประกอบด้วยกรดอะมิโนพิเศษคือ  $\gamma$ -carboxyglutamate 3 ตัว ซึ่งจะมีผลต่อรูปร่างของโปรตีน และทำให้ออสติโอแคลซินมีโครงสร้างของโปรตีนที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออนได้ (รวบรวมไว้โดย Lian et al., 1998) แม้ว่าหน้าที่ของออสติโอแคลซินในกระดูกจะยังไม่ชัดเจน แต่หลักฐานจากทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง แสดงว่าโปรตีนตัวนี้ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดึงดูดเซลล์ทำลายกระดูก (Chenu et al., 1994; Liggett et al., 1994) รวมทั้งการยับยั้งการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (Ducy et al., 1996) และการควบคุม bone crystal maturation (Boskey et al., 1998) อย่างไรก็ตาม เป็นที่ยอมรับกันว่า การแสดงออกของออสติโอแคลซิน จะเป็น late marker ของดิฟเฟอเรนเชียชันของเซลล์สร้างกระดูก โดยจะพบว่าระยะที่มีการสร้างออสติโอแคลซิน จะเป็นระยะที่ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสลดระดับลงแล้ว

เนื่องจากการแสดงออกของออสติโอแคลซินในเซลล์กระดูก จะเกี่ยวข้องกับโปรตีนในกลุ่มของ Fos โดยเฉพาะโปรตีน Fra-2 (Lian et al., 1998; Banergee et al., 1996) ซึ่งเป็น transcription factor ที่จับที่ AP-1 ในตำแหน่ง promotor ของสายพันธุกรรมของออสติโอแคลซิน Fra-2 จะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกในระดับพื้นฐานของออสติโอแคลซินในเซลล์กระดูก ในขณะที่ TGF- $\beta$ 1 จะยับยั้งการทำงานของ Fra-2 ทำให้ระดับการแสดงออกของออสติโอแคลซินลดลง (Banergee et al., 1996; Koyama et al., 2000; Hefferan et al., 2000) ดังนั้น หากคาดคะเนตามรายงานข้างต้นแล้ว การกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 ก็ไม่น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของออสติโอแคลซิน

จากผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 3-7 วัน สอดคล้องกับรายงานข้างต้น คือไม่พบการเปลี่ยนแปลงของออสติโอแคลซิน การไม่เพิ่มขึ้นของออสติโอแคลซิน เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 5 และ 7 อย่างต่อเนื่อง บ่งชี้ว่า เซลล์น่าจะยังคงอยู่ใน early maturation phase โดยไม่ผ่านเข้าสู่ late maturation phase

อย่างไรก็ดี มีรายงานแสดงว่า BMP-2 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของออสติโอแคลซิน (Chen et al., 1997; Koyama et al., 2000) ในขณะที่ TGF- $\beta$ 1 จะยับยั้งออสติโอแคลซิน หากการเพิ่มขึ้นของ BMP-2 ในวันที่ 5 สามารถมีผลต่อระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแล้ว ทำไมจึงไม่มีผลต่อออสติโอแคลซิน ความเป็นไปได้ประการหนึ่ง อาจเกิดจากการคงอยู่ของ TGF- $\beta$ 1 ซึ่งให้สัญญาณไปกดการแสดงออกของออสติโอแคลซิน

เพื่อพิสูจน์แนวคิดดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ทดลองเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 7 วันใน 2 แบบ คือแบบที่มี TGF- $\beta$ 1 ตลอด 7 วัน เปรียบเทียบกับแบบที่มี TGF- $\beta$ 1 เพียง 5 วัน ซึ่งจะพบการเพิ่มของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและ BMP-2 แล้วเลี้ยงต่ออีก 2 วันโดยไม่มี TGF- $\beta$ 1 และเรียกกลุ่มนี้ว่า กลุ่ม 5+2 ผลการทดลองพบว่า ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในกลุ่ม 5+2 ไม่ได้เพิ่มสูงเท่ากับกลุ่ม 7 วัน โดยมีแนวโน้มว่าจะเริ่มนิ่ง ในขณะที่ระดับของออสติโอแคลซินเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2 เท่า ในขณะที่กลุ่ม 7 วัน ระดับของออสติโอแคลซินไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ดังนั้น ผลการทดลองในกลุ่ม 5+2 น่าจะวิเคราะห์ได้ว่า ระดับของดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันจะเปลี่ยนไปอีก หลังการได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมเพียงช่วงเวลาหนึ่ง ซึ่งในที่นี้ คือ 5 วัน ผลการทดลองในลักษณะนี้ ได้เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว โดย Kim และ Ballock (1993) ได้แสดงให้เห็นว่า ในเซลล์กระดูก การกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 จะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีระดับของดีฟเฟอเรนซิเอชันที่สูงขึ้นเข้าสู่ maturation state แต่จะยับยั้งดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ไว้แค่นี้เท่านั้น โดยเซลล์จะไม่สามารถผ่านเข้าสู่ดีฟเฟอเรนซิเอชันขั้นสุดท้าย (final differentiation) ซึ่งเป็นขั้นที่สามารถสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ได้ จนกว่าจะได้กำจัด TGF- $\beta$ 1 ออกไป นอกจากนี้ รายงานโดย Joyce และคณะ (1990) ในหนูทดลองยังพบว่า การฉีด TGF- $\beta$ 1 ไปที่ชั้นเยื่อหุ้มกระดูก จะสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกอ่อนเป็นจำนวนมากที่บริเวณนั้น และกระดูกอ่อนเหล่านี้จะไม่เปลี่ยนเป็นกระดูก (intracartilagenous ossification) จนกว่าจะหยุดฉีด TGF- $\beta$ 1 ซึ่งจากรายงานที่กล่าวอ้างทั้งสองฉบับนี้ แสดงให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 จะมีบทบาทในดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์กระดูกในระยะแรก แต่การคงอยู่ของ TGF- $\beta$ 1 ในระยะยาวจะกลับมีผลยับยั้งดีฟเฟอเรนซิเอชันขั้นสุดท้ายของเซลล์กระดูก ซึ่งอาจจะนำมาใช้อธิบายในการทดลองนี้ได้เช่นกัน

นอกจากนี้ ระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-IA และ BMPR-II ในกลุ่ม 5+2 วันก็ยังคงสูงต่อเนื่องมาจากวันที่ 5 ในขณะที่ ระดับในกลุ่ม 7 วัน ปรากฏว่า ระดับของโปรตีนเหล่านี้ จะลดลงกว่าระดับในวันที่ 5 เมื่อเทียบบนฐานของ GAPDH ที่เท่ากัน

โดยที่เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จัดเป็น marker ในระยะแรกของเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ ในขณะที่ OC จะเป็น marker ที่แสดงถึงดีฟเฟอเรนซิเอชันขั้นสุดท้ายของเซลล์สร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ ดัง

นั่นผลการทดลองครั้งนี้ จึงชี้ว่า การใช้ TGF- $\beta$ 1 จะสามารถกระตุ้นการเริ่มกระบวนการดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟันได้ รวมทั้งจากรายงานของผู้วิจัยอื่นๆ ที่แสดงว่า TGF- $\beta$ 1 สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวและสร้างโปรตีนใน extracellular matrix หลายชนิด ดังนั้น การใช้ TGF- $\beta$ 1 ในการปิดโพรงประสาทฟันจึงน่าจะให้ผลดีทั้งในแง่ของการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และการเริ่มต้นการเหนี่ยวนำดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ โดยที่กระบวนการดีฟเฟอเรนซิเอชันที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้ น่าจะเกิดผ่านอิทธิพลของ BMP ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## เอกสารอ้างอิง

- Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 1997;210:383-96.
- Akhurst RJ. The transforming growth factor- $\beta$  family in vertebrate embryogenesis. In: Nilsen-Hamilton M. *Growth factors and signal transduction in development*. New York, Wiley-Liss, 1994, pp97-122.
- Arcari P, Martinelli R, Salvatore F. The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acid Res* 1984;12:9179-89.
- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990;143:213-21.
- Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM. Osteoblastic cell lineage. In: Noda M. *Cellular and molecular biology of bone*. San Diego, Academic Press, 1993, pp1-45.
- Banerjee C, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B, Lian JB, Stein GS. Transforming growth factor- $\beta$ 1 responsiveness of the rat osteocalcin gene is mediated by an activator protein-1 binding site. *Endocrinology* 1996;137:1991-2000.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF-betas, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994;38:405-20.
- Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998;23:187-96.
- Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1-3 in human and rabbit dentin matrices. *Arch Oral Biol* 1997;42:219-223.



- Celeste AJ, Rosen V, Buecker JL, Kriz R, Wang EA, Wozney JM. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J* 1986;5:1885-90.
- Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor- $\beta$  gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994;15:26-39.
- Centrella M, Massague J, Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor- $\beta$  stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvaria. *Endocrinology* 1986;119:2306-12.
- Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4 and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif tissue Int* 1997;60:283-290.
- Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zamboni G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994;127:1149-58
- D'Souza RN, Cavender A, Dickinson D, Roberts A, Letterio J. TGF- $\beta$ 1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex. *Eur J Oral Sci* 1998;106(suppl1):185-91.
- D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factorbeta-1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol* 1990;35:957-65.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Stroy B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448-452.
- Erickson DM, Harris SE, Dean DD, Harris MA, Wozney JM, Boyan BD, Schwartz Z. Recombinant bone morphogenetic protein (BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner. *J Orthop Res* 1997;15:371-80.
- Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II and TG- $\beta$  in human dentin. *J bone Miner Res* 1990;5:717-23.

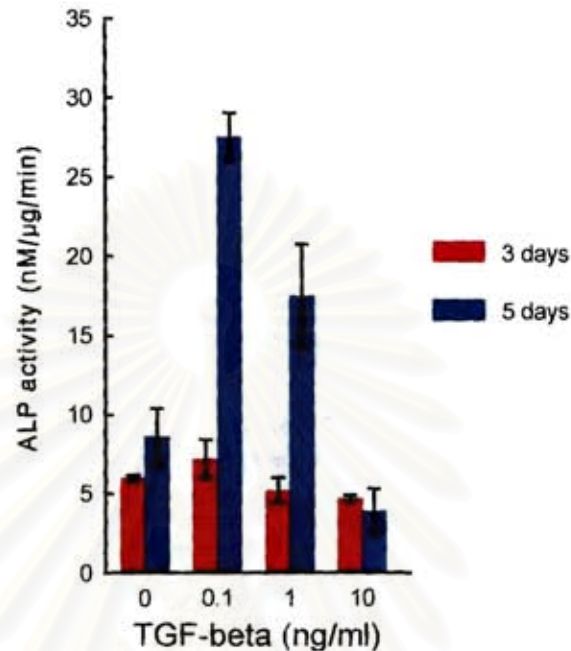
- Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor- $\beta$ 1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;274:32145-52.
- Groeneveld EHJ, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrin* 2000;142:9-21.
- Gu K, Smoke RH, Rutherford RB. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1996;41:919-23.
- Harris SE, Feng JQ, Harris MA, Ghosh-Choudhury N, Dallas MR, Wozney JM, Mundy GR. Recombinant bone morphogenetic protein 2 accelerates bone cell differentiation and stimulates BMP-2 mRNA expression and BMP-2 promoter activity in primary fetal rat calvarial osteoblast cultures. *Mol Cell Differ* 1995;3:137-155.
- Hay E, Hott M, Graulet AM, Lomri A, Marie PJ. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:81-93.
- Hefferen T, Reinholz GG, Rickard DJ, Johnsen SA, Waters KM, Subrameniam M, Spelsberg TC. Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor- $\beta$  action in human osteoblast cells. *J Biol Chem* 2000;275:20255-59.
- Heikinheimo K. Stage-specific expression of decapentaplegic-Vg-related genes 2, 4, and 6 (bone morphogenetic proteins 2, 4, and 6) during human tooth morphogenesis. *J Dent Res* 1994;73:590-7.
- Heikinheimo K, Happonen RP, Miettinen PJ, Ritvos O. Transforming growth factor beta 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors. *J Clin Invest* 1993;91:1019-27.
- Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB. Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987;105(6 Pt. 2):2861-76.
- Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998;24:744-51.

- Ikeda K, Michelangeli VP, Martin TJ, Findlay DM. Type I collagen substrate increases calcitonin and parathyroid hormone receptor-mediated signal transduction in UMR 106-06 osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 1993;156:130-7.
- Inage T, Toda Y. Gene expression of TGF-beta 1 and elaboration of extracellular matrix using in situ hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *Anat Rec* 1996;245:250-66.
- Jikko A, Harris S, Chen D, Mendrick DL, Damsky CH. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J bone miner Res* 1999;14:1075-83.
- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990;110:2195-207.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral surg Oral med Oral pathol* 1965;20: 340-349.
- Kawabata M, Chytil A, Moses HL. Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* 1995;270:5625-5630.
- Koyama H, Nakade O, Takuma T, Kaku T. Evidence for the involvement of bone morphogenetic protein-2 in phenytoin-stimulated osteocalcin secretion in human bone cells. *Arch Oral Biol* 2000;45:647-55.
- Kim SJ and Ballock RT. Cellular and molecular biology of transforming growth factor  $\beta$ . In : Noda M. Cellular and molecular biology of bone. San Diego, Academic Press, Inc., 1993, pp. 97-129.
- Lehnert SA, Akhurst RJ. Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development* 1988;104:263-73.
- Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Osteocalcin gene promotor: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30:62-72.
- Liggett WH, Lian JB, Greenberger JS, Glowacki J. Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long term bone marrow cultures. *J Cell Biochem* 1994;55:190-199.
- Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. Organogenesis and pattern formation in the mouse : RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 1990;109:833-44.

- Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGF- $\beta$ 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res* 2000;79:1689-96.
- 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;37:231-36.
- Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res* 1994;73:1515-22.
- Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 1994;162:18-28.
- Nakashima M, Toyono T, Murakami T, Akamine A. Transforming growth factor-beta superfamily members expressed in rat incisor pulp. *Arch Oral Biol* 1998;43:745-51.
- Pavasant P, Sumrejkanchanakit P. Stimulation of alkaline phosphatase activity in human pulpal fibroblasts by 1,25 dihydroxyvitamin D3 and transforming growth factor beta. *CU Dent J* 1997;20:173-82.
- Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:51-68.
- Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993;38:571-6.
- Rutherford RB, Spangberg L, Tucker M, Rueger D, Charette M. The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1994;39:833-8.
- Sakou T. Bone morphogenetics proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22:591-603.
- Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 1998;174:194-205.

- Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa H, Okamoto K, Nakashima M, Noshiro M, Kato Y. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res* 1994;73:1509-1514.
- Shore EM, Xu M, Shah PB, Janoff HB, Hahn GV, Deardorff MA, Sovinsky L, Spinner NB, Zasloff MA, Wozney JM, Kaplan FS. The human bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) gene: molecular structure and transcriptional regulation. *Calcif Tissue Int* 1998;63:221-229.
- Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci* 1998;106 Suppl1:179-84.
- Ten Cate AR. Hard tissue formation and destruction. In: *Oral histology: development, structure, and function*. 4<sup>th</sup> edition, St. Louis, Mosby, 1994, pp111-19.
- Takeda K, Oida S, Goseki M, Iimura T, Maruoka Y, Amagasa T, Sasaki S. Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. *Bone* 1994;15:467-70.
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 1993;8:2879-2887.
- Thesleff I, Vaahtokari A. The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88 Suppl1:357-68.
- Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 1992;130:1318-24.
- Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A. Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res* 1997a;76:1555-60.
- Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A. Temporal changes in expression of transforming growth factor-beta superfamily members and their receptors during bovine preodontoblast differentiation in vitro. *Arch Oral Biol* 1997b;42:481-8.

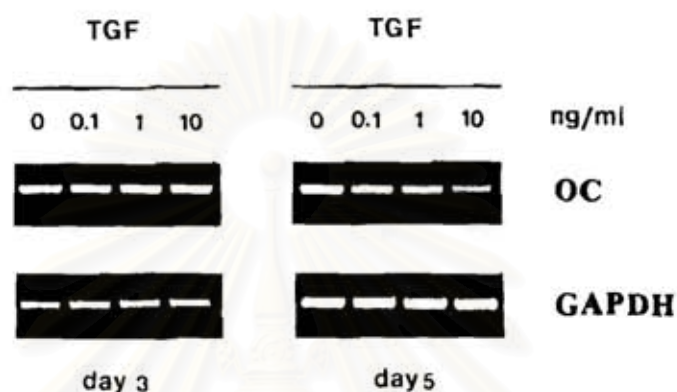
- Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- $\beta$ 1 on dog pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol* 1998;43:431-44.
- Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *Eur J Oral Sci* 1998;106 Suppl1:192-6.
- Vaah Tokari A, Vainio S, Thesleff I. Associations between transforming growth factor beta 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development* 1991;113:985-94.
- Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993;75:45-58.
- Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986;39:382-5.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.
- 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.
- Yang XL, Matsuura H, Fu Y, Sugiyama T, Miura N. MFH-1 is required for bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. *FEBS Lett* 2000;470:29-34.



รูปที่ 1 กราฟแสดงผลของ TGF-β1 ต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เซลล์เพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 และ 5 วัน และวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP activity) โดยมีหน่วยเป็นนาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที (nM/μg/min) ในกลุ่มที่ได้รับ TGF-β1 เป็นเวลา 3 วัน จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอย่างชัดเจนในทุกความเข้มข้นของ TGF-β1 ที่ใช้ แต่ในกลุ่มที่ได้รับ TGF-β1 เป็นเวลา 5 วัน ปรากฏว่าเซลล์ที่ได้รับ TGF-β1 เป็นความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จะระดับการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ TGF-β1 (กลุ่มควบคุม) อย่างชัดเจน แต่ในเซลล์ที่ได้รับ TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

แกนตั้งของกราฟแสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แกนนอนของกราฟ แสดงความเข้มข้นของ TGF-β1 ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ ค่าการทำงานของเอนไซม์จะแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 2 สองครั้งโดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 2 คน



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของออสติโอแคลซิน (OC) ด้วยเทคนิค RT-PCR เซลล์เพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 3 และ 5 วันเหมือนการทดลองในรูปที่ 1 จากนั้นสกัด RNA จากแต่ละกลุ่มการทดลอง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อหา ระดับการแสดงออกของออสติโอแคลซิน (OC) โดยใช้ GAPDH เป็นกลุ่มควบคุมภายใน สัญญาณที่ได้จาก PCR จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจลและนำไป ตรวจสัญญาณด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างของ ระดับการแสดงออกของ OC ในแต่ละกลุ่มทดลอง ทั้งในวันที่ 3 และ 5 โดยเปรียบเทียบระดับการ แสดงออกของ OC กับระดับการแสดงออกของ GAPDH

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 3 รูปแสดงผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงของ BMP-2, BMP-4, BMPR-1A และ BMPR-II ในวันที่ 3

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบระดับการแสดงออกของ BMP-2, BMP-4, BMPR-1A และ BMPR-II ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ทั้ง 3 ความเข้มข้น (0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) จะมีระดับของการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 4 ชนิดใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และระดับการแสดงออกของ BMP-2, -4 และ BMPR-1A จะมีปริมาณสูงกว่า BMPR-II เมื่อเทียบกับระดับของ GAPDH

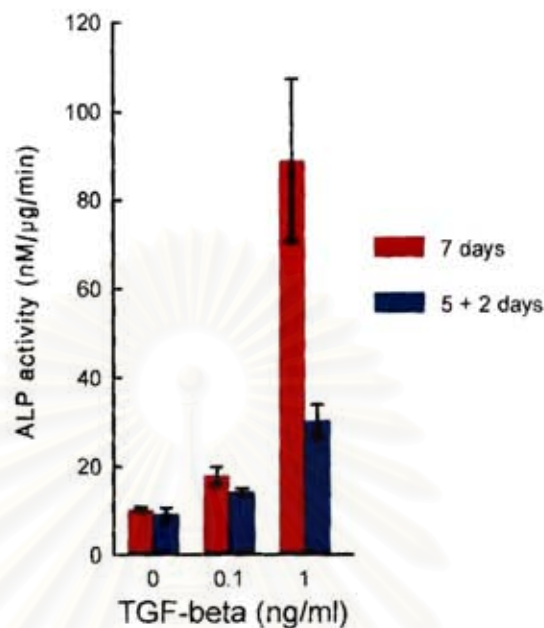
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 รูปแสดงผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงของ BMP-2, -4, BMPR-1A และ BMPR-II ในวันที่ 5

เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลา 5 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จะมีระดับการแสดงออกของ BMP-2, -4, BMPR-1A และ BMPR-II สูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จะมีระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 4 ชนิดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นฐานของระดับ GAPDH ที่เท่ากัน

สถาบันทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



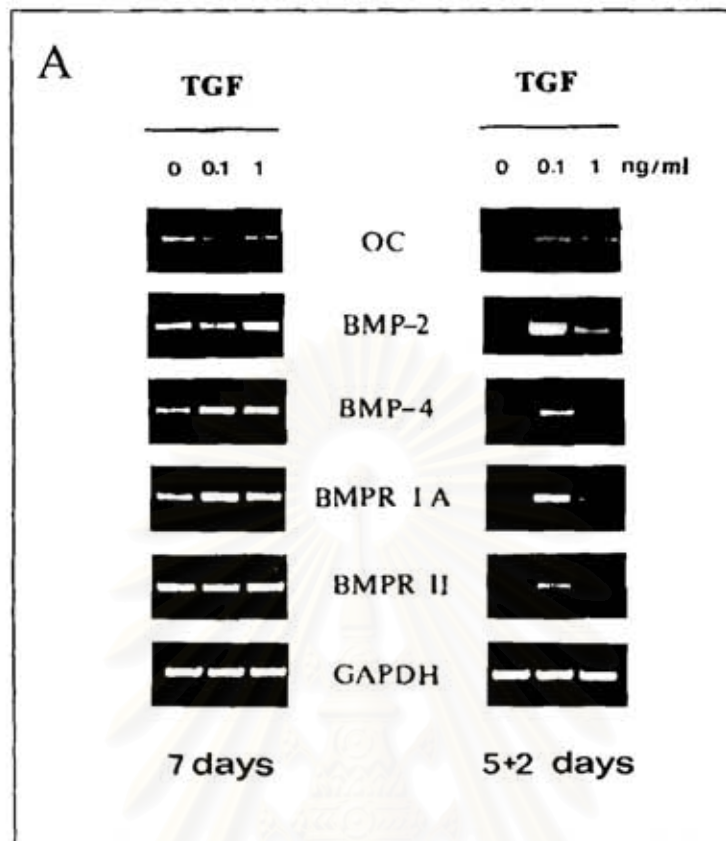
รูปที่ 5 กราฟแสดงผลของ TGF-β1 ต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 7

เซลล์เพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 2 แบบ คือแบบที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF-β1 เป็นเวลา 7 วัน กับแบบที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF-β1 เพียง 5 วัน จากนั้นจึงเลี้ยงต่อในสภาวะที่ไม่มี TGF-β1 อีก 2 วัน (กลุ่ม 5+2 วัน) แล้วจึงวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ในกลุ่มที่ได้รับ TGF-β1 เป็นเวลา 7 วัน จะมีระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 8 เท่า

ส่วนในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นแบบ 5+2 วัน จะพบว่าระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน แต่ระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ TGF-β1 ตลอด 7 วัน ในทั้งสองความเข้มข้นที่ใช้ โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรจะมีระดับของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงประมาณ 3 เท่าเท่านั้น

แกนตั้งของกราฟแสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP activity) โดยมีหน่วยเป็นนาโนโมลาร์/ไมโครกรัมโปรตีน/นาที (nM/μg/min) แกนนอนของกราฟแสดงความเข้มข้นของ TGF-β1 ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ หน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ng/ml) ค่าการทำงานของเอนไซม์จะแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 2 สองครั้งโดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 2 คน



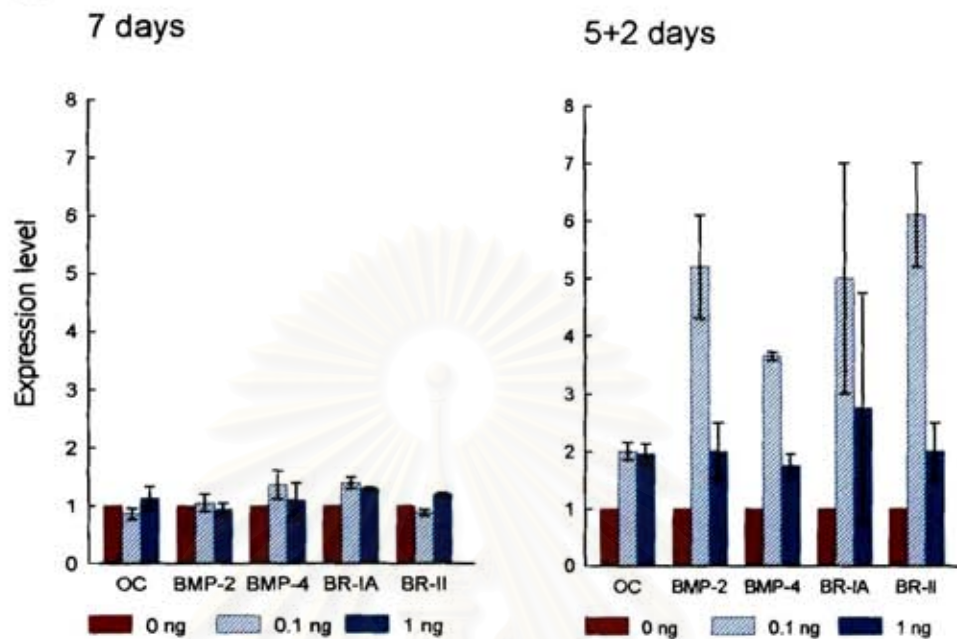
รูปที่ 6 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของออสติโอแคลซิน (OC) และ BMP ในวันที่ 7

เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 2 แบบ เหมือนรูปที่ 5 คือกลุ่ม 7 วัน และกลุ่ม 5+2 วัน ในรูป A แสดงภาพของ PCR product หลังการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR พบว่า ในกลุ่ม 7 วัน ระดับการแสดงออกของออสติโอแคลซิน (OC) จะไม่พบ การเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่ม 5+2 วัน ระดับการแสดงออกของ OC จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมในทั้งสองความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 ที่ใช้กระตุ้นเซลล์ โดยเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกของ GAPDH ที่เท่ากัน

ในทำนองเดียวกัน ระดับการแสดงออกของ BMP และ BMPR ในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 แบบ 5+2 วัน จะแตกต่างจากกลุ่มควบคุม มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 แบบ 7 วัน โดยเฉพาะระดับของ BMP-2 และ BMPR-II ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม 5+2 วันอย่างชัดเจน สะท้อนว่าระยะเวลาของการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 จะมีผลต่อการแสดงออกของทั้ง BMP, BMPR และ OC



B



ในรูป B เป็นกราฟแสดงค่าความเข้มของแถบ PCR products ในรูป A ค่าที่แสดงเป็นค่าความเข้มของแถบ PCR products ของ OC และ BMPs /ความเข้มของแถบ PCR products ของ GAPDH ในแต่ละกลุ่มทดลอง กราฟทางซ้ายแสดงระดับระดับ PCR products ของกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 แบบ 7 วัน (7 days) ส่วนกราฟทางขวาแสดงระดับ PCR products ของกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 แบบ 5+2 วัน (5+2 days) ค่าของ PCR product ในกลุ่มควบคุมจะถูกกำหนดให้เท่ากับ 1 และปรับค่า PCR product ของกลุ่มอื่นๆตามค่าของกลุ่มควบคุม แถบตั้งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกโดยกำหนดให้กลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำสาม โดยใช้เซลล์จากผู้ป่วย 3 คน

ในกลุ่ม 7 วัน จะเห็นว่าระดับของ OC, BMP และ BMPR ในแต่ละกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันไม่มาก โดยระดับการแสดงออกของ OC, BMP-2 และ BMPR-II ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 จะมีระดับที่เท่าๆกัน ส่วนการแสดงออกของ BMP-4 และ BMPR-IA จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย ประมาณ 1.3-1.4 เท่า

ในกลุ่ม 5+2 วัน จะพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีนทุกตัวเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ TGF- $\beta$ 1 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างจากกลุ่ม 7 วันอย่างชัดเจน

