



รายงานความก้าวหน้าการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีงบประมาณ 2555

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

เรื่อง

การประเมินทรีฟอยล์แฟคเตอร์เปปไทด์ในน้ำลายมนุษย์จากต่อมน้ำลายชนิดต่าง ๆ

ภายใต้ชุดโครงการวิจัย

การศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟคเตอร์ในช่องปาก
และบทบาทหน้าที่ของทรีฟอยล์แฟคเตอร์กับโรคช่องปาก

ผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันทแพทย์ ดนัย ยอดสุวรรณ

ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 0-4320-2405 โทรสาร 0-4320-2862

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นกลุ่มตัวอย่างให้
โครงการวิจัยนี้และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปี 2555

*** การวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว
เลขที่ HE 542277 ลงวันที่ 26 ธันวาคม 2554

บทคัดย่อ

ทรีฟอยล์แฟคเตอร์ (trefoil factor; TFF) เป็นโมเลกุลที่ผลิตจากเซลล์ที่สร้างมิวซิน ทรีฟอยล์แฟคเตอร์ที่พบในน้ำลายส่วนใหญ่จะถูกสร้างมาจากต่อมน้ำลายหลัก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ จากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟันและไม่มีฟันและจากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ด้วยวิธี ELISA และประเมินรูปแบบโมเลกุล TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ ด้วยเครื่องวัดมวลสาร MALDI-TOF/TOF ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากโครงการวิจัยจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ TFFs ที่ถูกสร้างมาจากต่อมน้ำลายแต่ละชนิดซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของช่องปาก หรือภาวะการเกิดโรคในช่องปากต่อไป

Abstract

Trefoil factors (TFFs) are molecules produced from mucin producing cells. TFFs found in saliva are mainly derived from major salivary glands. The objective of this study is to measure concentrations of salivary TFF1, TFF2, and TFF3 from various types of salivary glands, and to evaluate the molecular pattern of salivary TFF3 by MALDI-TOF/TOM mass spectrometers. The results from this study will be helpful for future investigation of the biologic functions of salivary TFFs which may play an important role in oral immunity or may involve in oral pathology.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
คำสำคัญ (keywords)	v
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	7
อภิปรายผล/บทวิจารณ์ข้อเสนอแนะ	8
บทสรุปผลการวิจัย	9
เอกสารอ้างอิง	10

คำสำคัญ (keywords)

Saliva

Trefoil factor

Mass spectrometer

Salivary gland

บทนำ

ทรีฟอยล์แฟคเตอร์ (Trefoil factors; TFFs) เป็น secretory molecules ส่วนใหญ่ถูกสร้างโดย mucin-producing cells โมเลกุลของทรีฟอยล์แฟคเตอร์ มีสามชนิดคือ TFF1, TFF2 และ TFF3¹ รูปแบบโมเลกุลของ TFF1 และ TFF3 จะมีสองรูปแบบคือ monomer และ dimer แต่ TFF2 มีรูปแบบโมเลกุลเพียงแบบเดียวคือ monomer Trefoil factors ถูกค้นพบและมีการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982² หน้าที่ทางชีวภาพของ TFF peptides เกี่ยวข้องกับ mucosal regeneration, tissue repairing, inflammatory process, immune response และ tumorigenesis³ มีรายงานบ่งชี้ว่าเซลล์จากต่อมน้ำลาย ท่อน้ำลาย และเซลล์บุผิวช่องปาก สามารถสร้าง TFFs และหลั่งออกมาในน้ำลาย⁴⁻⁶ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการศึกษาบทบาทหน้าที่ของ TFFs ในช่องปากมีน้อยมากและผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการจนถึงปัจจุบันมีเพียง 6 เรื่องเท่านั้น⁴⁻⁹ ผลการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ TFF ในช่องปากแสดงให้เห็นว่า TFF3 เกี่ยวข้องกับ oral keratinocytes โดยทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการ cell survival, cell proliferation และ cell migration^{7, 8}

ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการเกี่ยวกับ TFFs ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาหน้าที่ของ TFFs ในระบบทางเดินอาหารและการศึกษาบทบาทของ TFF ในโรคทางเดินอาหาร เช่น แผลอักเสบเรื้อรังในทางเดินอาหาร มะเร็งกระเพาะอาหาร รวมถึงการศึกษาบทบาทของ TFF ในมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด ในระบบทางเดินอาหาร mucous cells สร้าง TFF peptides และถูกหลั่งออกมารวมกับ mucins ใน mucosal fluid ทำให้เกิดลักษณะของ mucous gel เคลือบอยู่บนเยื่อเมือกของทางเดินอาหารเพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อบุผิวและบทบาทหน้าที่ของ TFFs ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อบุผิวเมื่อเกิดบาดแผล โดย TFF peptides จะทำงานเสริมฤทธิ์กับ epidermal growth factors¹⁰ มีการตรวจวัดระดับ TFFs ในซีรัมและพบว่าระดับของ TFFs ในซีรัมของผู้ป่วยโรค chronic inflammatory bowel's diseases¹¹ และมีรายงานว่าเมื่อให้หนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิด chronic inflammatory bowel's diseases ดื่มน้ำที่มีส่วนผสมของสาร nicotine จากบุหรี่ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีการแสดงออกของ TFF3 mRNA เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่¹² อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่แสดงถึงผลกระทบของการสูบบุหรี่กับการแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลาย จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย (ได้รับทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง จาก สกว. ร่วมกับ สกอ. ปี 2551-2552) เกี่ยวกับการตรวจวัดระดับ TFF peptides ในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังพบว่าระดับ TFF3 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลายของอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติ¹³ แต่ในขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลที่อธิบายเกี่ยวกับกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกของ TFF peptides ในเซลล์จากต่อมน้ำลายและเซลล์บุผิวช่องปาก

เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำลายในปาก (whole saliva¹⁴) เป็นสารคัดหลั่งที่สำคัญต่อสุขภาพช่องปากและองค์ประกอบส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 96 ใน whole saliva ได้มาจากต่อมน้ำลายหลัก (major salivary glands) ได้แก่ parotid glands, sublingual glands และ submandibular glands และต่อมน้ำลายรอง (minor salivary glands) องค์ประกอบบางส่วนใน whole saliva จะได้จากน้ำเหลืองเหงือก (gingival crevicular fluid) ซึ่งมีส่วนประกอบคล้ายกับองค์ประกอบในซีรัม ถ้าพิจารณาในด้านภูมิคุ้มกันช่องปากจะเห็นว่า whole saliva มีองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับ secretory immunity (มาจาก salivary glands) และ systemic immunity (มาจาก gingival crevicular fluid) ในบุคคลที่มีฟันองค์ประกอบด้านภูมิคุ้มกันช่องปากของ whole saliva จะเกี่ยวข้องกับ secretory immunity และ systemic immunity แต่ในบุคคลที่ไม่มีฟันหลงเหลืออยู่ในช่องปากองค์ประกอบด้านภูมิคุ้มกันช่องปากของ whole saliva จะได้จาก salivary glands เพียงอย่างเดียว (ไม่มีองค์ประกอบที่มาจาก gingival crevicular fluid) ดังนั้นภูมิคุ้มกันช่องปากของบุคคลที่ไม่มีฟันจะเกี่ยวข้องกับ secretory immunity เป็นสำคัญ ถ้าพิจารณาจากคุณลักษณะของ epithelial cells ในต่อมน้ำลายแต่ละชนิด พบว่า epithelial cells มีความแตกต่างกันในการผลิตน้ำลาย เช่น epithelial cells ที่เป็น

องค์ประกอบของ parotid glands¹⁵ จะมีลักษณะที่เรียกว่า serous cells ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีลักษณะใสและองค์ประกอบในน้ำลายมี mucins อยู่เล็กน้อย แต่ epithelial cells ที่เป็นองค์ประกอบของ sublingual glands¹⁵ จะมีลักษณะที่เรียกว่า mucous cells ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีลักษณะข้นหนืดมากและมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น mucins สำหรับ epithelial cells ที่เป็นองค์ประกอบของ submandibular glands¹⁵ และ minor salivary glands จะมีลักษณะที่เรียกว่า sero-mucous cells ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีลักษณะข้นหนืดปานกลางและมีองค์ประกอบบางส่วนเป็น mucins จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า whole saliva ของอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติ มีปริมาณของ TFF3 มากที่สุด TFF1 มีปริมาณรองลงมา และ TFF2 มีปริมาณน้อยที่สุด¹⁶ เป็นที่น่าสนใจว่ายังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวัดระดับ TFF peptides จากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆมาก่อน และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสาร cotinine จากบุหรี่ และระดับการแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายแต่ละชนิด จากประเด็นที่ได้กล่าวมาแล้วทำให้คณะผู้วิจัยเกิดคำถามว่าระดับ TFF peptides และโครงสร้างโมเลกุลของ TFF ที่ถูกสร้างมาจากต่อมน้ำลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันหรือไม่ การแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ จะมีความแตกต่างกันระหว่างบุคคลที่สภาพในช่องปากแตกต่างกันหรือไม่ เช่น บุคคลที่มีฟันและไม่ฟันในช่องปาก หรือระหว่างบุคคลที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ ผลที่ได้จากโครงการวิจัยจะนำมาซึ่งข้อมูลใหม่เกี่ยวกับระดับ TFF peptides จากต่อมน้ำลายแต่ละชนิดและข้อมูลที่ได้รับจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ TFFs ต่อระบบภูมิคุ้มกันของช่องปาก ตลอดจนผลกระทบของการสูบบุหรี่กับการผลิต TFF peptides จากต่อมน้ำลาย

จากคุณลักษณะของ epithelial cells ในต่อมน้ำลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในการผลิตน้ำลายดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า epithelial cells ในต่อมน้ำลายแต่ละชนิดมีการสร้าง TFF peptides ที่แตกต่างกัน และ epithelial cells ในต่อมน้ำลายแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการกำหนดรูปแบบโมเลกุลของ TFFs (monomer และ dimer) ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าสภาพในช่องปากที่มีฟันซึ่งเกี่ยวข้องกับ secretory immunity และ systemic immunity และช่องปากที่ไม่มีฟันซึ่งเกี่ยวข้องกับ secretory immunity มีผลต่อการสร้าง TFF peptides ที่แตกต่างกันและการกำหนดโครงสร้างโมเลกุลของ TFFs (monomer และ dimer) ที่แตกต่างกัน คณะผู้วิจัยยังมีสมมุติฐานเพิ่มเติมว่าสภาพในช่องปากที่สัมผัสกับสารเคมีจากการสูบบุหรี่มีการสร้าง TFF peptides ที่แตกต่างจากสภาพในช่องปากที่ไม่สัมผัสกับสารเคมีจากการสูบบุหรี่ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ประกอบด้วย

1. เปรียบเทียบระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆจากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟันและกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่มีฟัน
2. เปรียบเทียบระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆจากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่
3. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆจากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟันและไม่ฟันในช่องปาก
4. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 กับ cotinine ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆจากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่
5. ประเมินรูปแบบโมเลกุล TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ ด้วยเครื่องวัดมวลสาร MALDI-TOF/TOF

วิธีการดำเนินการวิจัย

การกำหนดพื้นที่

- คลินิกวินิจฉัยโรคช่องปาก และ ห้องปฏิบัติการกลาง หน่วยวิจัย ชั้น 6
- อาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรติโอเมกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่ไม่มีฟันและอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ ซึ่งมาได้รับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีข้อกำหนดดังนี้

(1) อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน

Inclusion criteria

1. อาสาสมัครมีอายุ 20 ปี ขึ้นไป
2. อาสาสมัครมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบ หรืออยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ระยะเวลาให้มนบุตรรับประทานยาคุมกำเนิด ยาปฏิชีวนะ หรือยาใดๆที่มีผลต่อการทำงานของน้ำลาย ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา
3. อาสาสมัครเป็นผู้ที่สูบบุหรี่ หรือไม่สูบบุหรี่
4. ภายในช่องปากต้องมีฟันทั้งปากอย่างน้อย 10 ซี่
5. ภายในช่องปากมีอวัยวะปริทันต์ในสภาพปกติ

Exclusion criteria

1. อาสาสมัครมีโรคทางระบบ หรืออยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ระยะเวลาให้มนบุตรรับประทานยาคุมกำเนิด ยาปฏิชีวนะ หรือยาใดๆที่มีผลต่อการทำงานของน้ำลายในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา
2. ภายในช่องปากต้องมีฟันทั้งปากน้อยกว่า 10 ซี่
3. ภายในช่องปากมีอวัยวะปริทันต์ในสภาพผิดปกติ เช่น มีเหงือกอักเสบระดับปานกลางหรือรุนแรง มีร่องลึกปริทันต์มากกว่า 4 mm มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์

(2) อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่ไม่มีฟัน

Inclusion criteria

1. อาสาสมัครมีอายุ 51 ปี ขึ้นไป
2. อาสาสมัครมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบ หรืออยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ระยะเวลาให้มนบุตรรับประทานยาคุมกำเนิด ยาปฏิชีวนะ หรือยาใดๆที่มีผลต่อการทำงานของน้ำลาย ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา และไม่สูบบุหรี่
3. ภายในช่องปากต้องไม่มีฟันและไม่ได้ใส่ฟันปลอมมาอย่างน้อย 1 เดือน
4. ภายในช่องปากมีเนื้อเยื่อช่องปากปกติ

Exclusion criteria

1. อาสาสมัครมีโรคทางระบบหรืออยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ระยะเวลาให้มนบุตร
2. อาสาสมัครรับประทานยาคุมกำเนิด ยาปฏิชีวนะ หรือยาใดๆที่มีผลต่อการทำงานของน้ำลายในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา และสูบบุหรี่
3. ภายในช่องปากต้องมีฟันหลงเหลืออยู่ เนื้อเยื่อช่องปากไม่ปกติ

การแบ่งกลุ่มอาสาสมัคร

1 อาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยจะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ละ 50 คน ดังนี้

1. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน มีอายุระหว่าง 20-35 ปี
2. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน มีอายุระหว่าง 36-50 ปี
3. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 51 ปี
4. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่ไม่มีฟัน มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 51 ปี
5. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่สูบบุหรี่ มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ปี

2. รูปแบบการดำเนินการวิจัย

อธิบายให้อาสาสมัครทุกคนทราบถึงรายละเอียดของงานวิจัย พร้อมทั้งให้อาสาสมัครลงชื่อแสดงความยินยอมก่อนเข้าร่วมในงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

การเก็บตัวอย่างน้ำลายจะทำในช่วงเช้า ระหว่างเวลา 9.00-12.00น อาสาสมัครจะถูกแนะนำให้งดรับประทานอาหาร งดดื่มน้ำ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง อาสาสมัครนั่งพักบนユニットทำฟันเป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดก่อนจะทำการเก็บน้ำลาย

(1) การเก็บน้ำลายจากต่อมน้ำลายพาโรติด (parotid glands)

นำเครื่องมือที่ดัดแปลงมาจาก Lasley cups สำหรับการเก็บน้ำลายจาก parotid glands อุปกรณ์ดังกล่าวไปวางที่ตำแหน่งรูเปิดของต่อมน้ำลายพาโรติด (Stensen's ducts) ทั้งด้านขวาและด้านซ้าย ผู้ทำการเก็บน้ำลายจะเริ่มจับเวลาตั้งแต่ติดตั้งอุปกรณ์เสร็จ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการตรวจวัดอัตราการไหลของน้ำลาย (saliva flow rate) จากนั้นจึงนำน้ำลายที่ได้ใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 ml ที่ปลอดเชื้อ ซึ่งเก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดและบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

(2) การเก็บน้ำลายจาก submandibular/sublingual glands

ในระหว่างที่เก็บน้ำลายจากต่อมพาโรติด ผู้เก็บน้ำลายจะใช้ plastic syringe ขนาด 5 ml ดูดน้ำลายบริเวณ floor of mouth ซึ่งสร้างมาจาก submandibular/sublingual glands เป็นเวลา 10 นาที และใช้ก้อนสำลีซับน้ำลายที่หลงเหลืออยู่ในบริเวณดังกล่าวเพื่อนำมาชั่งวัด สำหรับการคำนวณหาอัตราการไหลของน้ำลาย จากนั้นจึงนำน้ำลายที่ได้จาก syringe ใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 ml ที่ปลอดเชื้อ ซึ่งเก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดและบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

(3) การเก็บน้ำลายจาก minor salivary glands

เมื่อเก็บน้ำลายจาก parotid, subman/sublingual glands แล้ว ผู้เก็บน้ำลายแนะนำให้อาสาสมัครใช้มือด้านซ้ายดึงริมฝีปากล่างออกเล็กน้อยเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้แผ่นเมมเบรน ขนาด 5x5 mm จำนวน 2 แผ่น วางที่ตำแหน่งด้านซ้ายและขวาของริมฝีปากล่างเพื่อดูดซับน้ำลายจาก minor salivary glands จากนั้นจึงนำแผ่นเมมเบรนที่มีน้ำลายใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 1.5 ml ที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 ml ซึ่งเก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดและบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

(4) ตัวอย่างน้ำลายที่เก็บได้ทั้งหมดจากอาสาสมัครจะถูกนำไปเขย่าด้วยอุปกรณ์ vortex เป็นเวลา 3 นาที ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 2,300g เป็นเวลา 10 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C จากนั้นจึงเก็บส่วนที่เป็นน้ำใสออกมาแยกเก็บไว้ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C

การตรวจหาระดับ TFF peptides ด้วยวิธี ELISA

ตัวอย่างน้ำลายจะถูกนำมาวัดระดับ total protein ด้วยวิธี Lowry assay ก่อนจะดำเนินการตรวจวัดระดับ TFF peptides ด้วยวิธี ELISA^{13,14} ชนิด modified sandwich ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- 1 การเตรียมตัวอย่างน้ำลาย ใน assay buffer, pH 8.0, containing 0.1 mol/L phosphate, 0.1% BSA, 0.1% Tween20 ในอัตราส่วนที่พอเหมาะสำหรับการตรวจหา TFF1, TFF2 และ TFF3
- 2 การเตรียม purified TFF1, TFF2 และ TFF3 ใน assay buffer ให้มีลำดับความเข้มข้นที่เรียงตามลำดับจากความเข้มข้นมากไปสู่ความเข้มข้นน้อย (serial dilution) เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณความเข้มข้นของ TFF1, TFF2 และ TFF3 จากตัวอย่างน้ำลาย
- 3 การเตรียม capture antibodies (rabbit polyclonal antibodies) ที่จำเพาะต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 มาทำให้เจือจางใน coating buffer, pH 9.6, (15 mmol/L sodium carbonate, 35 mmol/L sodium bicarbonate) โดยเตรียมความเข้มข้น anti-human TFF1, TFF2 และ TFF3 rabbit polyclonal antibodies 0.20 µg/100 µL (100 µL /well) จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer
- 4 นำตัวอย่างน้ำลาย ที่เจือจางแล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม มาใส่ลงในไมโครเพลท 96 หลุม กำหนดให้ใช้สามหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง (triplicate) ในการนี้นำ purified TFF1, TFF2 และ TFF3 ใน assay buffer ที่มีลำดับความเข้มข้นที่เรียงตามลำดับจากความเข้มข้นมากไปสู่ความเข้มข้นน้อย ปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม มาใส่ลงในไมโครเพลท 96 หลุม กำหนดให้ใช้สามหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง (triplicate) จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วจึงล้างเพลทด้วย washing buffer
- 5 การเตรียม detecting antibodies ที่จำเพาะต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 มาทำให้เจือจางใน 0.1% bovine-albumin in phosphate buffer โดย dilution factor ที่ใช้สำหรับ biotinylated rabbit anti-human TFF1, TFF2 และ TFF3 (100 µL /well) จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer
- 6 การเติม horseradish peroxidase-avidin มาใส่ลงในเพลทเพื่อการทำปฏิกิริยาและการเกิดสีจะทำได้โดยเติม TMB Microwell Substrate System (Kirkegaard and Perry Laboratories)
- 7 นำตัวอย่างน้ำลาย และ purified TFF1, TFF2 และ TFF3 ใน sample diluent ที่มีลำดับความเข้มข้นที่เรียงตามลำดับ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
- 8 นำค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของ purified TFF แต่ละชนิดไปสร้างกราฟมาตรฐาน ทำการแปลงข้อมูลแล้วเลือกกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจใกล้ 1 ที่สุด เพื่อแสดงว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสมที่จะนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของ TFF1, TFF2 และ TFF3

การตรวจหาระดับ cotinine ในน้ำลายด้วยชุดตรวจ ELISA สำเร็จรูป

ตัวอย่างน้ำลายจะถูกนำมาวัดระดับ cotinine ด้วยวิธี ELISA (DRG International, Inc.) มีขั้นตอนดังนี้

1. เจือจางตัวอย่างน้ำลายใน sample diluent ในอัตราส่วนที่พอเหมาะสำหรับการตรวจวัด cotinine จากชุดตรวจสำเร็จรูป
2. หยดตัวอย่างน้ำลายที่เจือจางแล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม ลงในไมโครเพลท 96 หลุม โดยหยดสองหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง (duplicate) โดยไมโครเพลทจากชุดตรวจสำเร็จรูป จะถูกเคลือบที่ผิวด้านในด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cotinine

3. นำ 50 ไมโครลิตรของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) และมีความจำเพาะต่อ cotinine มาใส่ลงในเพลทซึ่งได้ใส่ตัวอย่างน้ำลายที่เจือจางแล้ว จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วย wash buffer
4. นำ 100 ไมโครลิตรของ substrate solution มาใส่ลงในเพลท จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาทีเพื่อการทำปฏิกิริยาและการเกิดสี จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 ไมโครลิตรของ stop solution ลงในแต่ละหลุม
5. นำไมโครเพลท 96 หลุมไปวัดความเข้มข้นของสารละลาย (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การตรวจรูปแบบ TFF3 (monomer and dimer) ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่าง ๆ ด้วย MALDI-TOF/TOF

1. ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำตัวอย่างน้ำลายปริมาตร 200 ไมโครลิตรกรองผ่าน Microcon Centrifugal Filter Device YM-10 (Milipore)
2. เก็บตัวอย่างโปรตีนขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน
3. ละลายตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 0.1 ไมโครกรัมกับ 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution แล้วผสมกับสารละลาย Sinapinic acid อัตราส่วน 1:1
4. หยดตัวอย่างบน MALDI plate แล้วรอที่อุณหภูมิห้องจนตัวอย่างแห้ง
5. วิเคราะห์มวลของเปปไทด์ในตัวอย่างด้วยเครื่อง Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker daltonik)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- (1) การเปรียบเทียบระดับ TFF peptides จากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ ระหว่างกลุ่มอาสาสมัคร โดยใช้ Kruskal-Wallis analysis of variance การหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TFF peptides ชนิดต่างๆ ในน้ำลาย โดยใช้ Spearman correlation Coefficients กำหนดให้ P-value < 0.05
- (2) การหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TFF peptides ชนิดต่างๆ กับระดับ cotinine ในน้ำลาย โดยใช้ Spearman correlation Coefficients กำหนดให้ P-value < 0.05
- (3) การเปรียบเทียบโมเลกุล TFF3 (monomer and dimer) ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครโดยใช้ Kruskal-Wallis analysis of variance กำหนดให้ P-value < 0.05

ผลการวิจัย

ข้อมูลกลุ่มตัวอย่าง

1. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน มีอายุระหว่าง 20-35 ปี
จำนวน 37 คน
เพศชาย = 16 คน
เพศหญิง = 21 คน
2. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน มีอายุระหว่าง 36-50 ปี
จำนวน 13 คน
เพศชาย = 3 คน
เพศหญิง = 10 คน
3. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟัน มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 51 ปี
จำนวน 11 คน
เพศชาย = 5 คน
เพศหญิง = 6 คน
4. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่ไม่มีฟัน มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 51 ปี
จำนวน 8 คน
เพศชาย = 4 คน
เพศหญิง = 4 คน
5. อาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่สูบบุหรี่ มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ปี
จำนวน 12 คน
เพศชาย = 11 คน
เพศหญิง = 1 คน

การตรวจหาระดับ TFF peptides ด้วยวิธี ELISA

ตัวอย่างน้ำลายจะถูกนำมาวัดระดับ total protein ด้วยวิธี Lowry assay ก่อนจะดำเนินการตรวจวัดระดับ TFF peptides ด้วยวิธี ELISA ึ่งอยู่ในระหว่างการปรับหา optimal conditions ของ capture antibodies ที่จำเพาะต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลาย

บทวิจารณ์

จากคุณลักษณะของ epithelial cells ในต่อมน้ำลายแต่ละชนิด พบว่า epithelial cells มีความแตกต่างกันในการผลิตน้ำลาย เช่น epithelial cells ที่เป็นองค์ประกอบของ parotid glands¹⁵ จะมีลักษณะที่เรียกว่า serous cells ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีลักษณะใสและองค์ประกอบในน้ำลายมี mucins อยู่เล็กน้อย แต่ epithelial cells ที่เป็นองค์ประกอบของ sublingual glands¹⁵ จะมีลักษณะที่เรียกว่า mucous cells ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีลักษณะข้นหนืดมากและมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น mucins สำหรับ epithelial cells ที่เป็นองค์ประกอบของ submandibular glands¹⁵ และ minor salivary glands จะมีลักษณะที่เรียกว่า sero-mucous cells ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีลักษณะข้นหนืดปานกลางและมีองค์ประกอบบางส่วนเป็น mucins จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า whole saliva ของอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติ มีปริมาณของ TFF3 มากที่สุด TFF1 มีปริมาณรองลงมา และ TFF2 มีปริมาณน้อยที่สุด¹⁶ เป็นที่น่าสนใจว่ายังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวัดระดับ TFF peptides จากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ มาก่อน และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสาร cotinine จากบุหรี่ และระดับการแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลาย จากต่อมน้ำลายแต่ละชนิด จากประเด็นที่ได้กล่าวมาแล้วทำให้คณะผู้วิจัยเกิดคำถามว่าระดับ TFF peptides และโครงสร้างโมเลกุลของ TFF ที่ถูกสร้างมาจากต่อมน้ำลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันหรือไม่ การแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ จะมีความแตกต่างกันระหว่างบุคคลที่สุขภาพในช่องปากแตกต่างกันหรือไม่ เช่น บุคคลที่มีฟันและไม่มีฟันในช่องปาก หรือระหว่างบุคคลที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ ผลที่ได้จากโครงการวิจัยจะนำมาซึ่งข้อมูลใหม่เกี่ยวกับระดับ TFF peptides จากต่อมน้ำลายแต่ละชนิดและข้อมูลที่ได้รับจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ TFFs ต่อระบบภูมิคุ้มกันของช่องปาก ตลอดจนผลกระทบของการสูบบุหรี่กับการผลิต TFF peptides จากต่อมน้ำลาย

บทสรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาชนิดตัดขวางเพื่อตรวจวัดระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ จากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่มีฟันและไม่มีฟันและจากอาสาสมัครสุขภาพช่องปากปกติที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ด้วยวิธี ELISA และประเมินรูปแบบโมเลกุล TFF3 ในน้ำลายจากต่อมน้ำลายชนิดต่างๆ ด้วยเครื่องวัดมวลสาร MALDI-TOF/TOF ในปีงบประมาณ 2555 งานวิจัยโดยส่วนใหญ่จะมุ่งไปที่การเก็บรวบรวมตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัครกลุ่มต่างและการเก็บข้อมูลทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพช่องปาก คณะผู้วิจัยคาดว่าจะการเก็บรวบรวมตัวอย่างและการทดสอบด้วย ELISA จะแล้วเสร็จในปีงบประมาณที่ 2556

เอกสารอ้างอิง

1. Thim L, May EB. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2956-73.
2. Jørgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept.* 1982; 3: 207-19.
3. Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2910-15.
4. Jagla W, Wiede A, Hinz M, Dietzmann K, Gulicher-Klaus D, Hoffmann GW. Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 161-66.
5. Devine DA, High AS, Owen PJ, Poulsom R, Bonass WA. Trefoil factor expression in normal and diseased human salivary glands. *Hum Pathol* 2000; 31: 509-15.
6. Kutta H, May J, Jaehne M, Münscher A, Paulsen FP. Antimicrobial defence mechanisms of the human parotid duct. *J Anat* 2006; 208: 609-19.
7. Storesund T, Hayashi K, Kolltveit KM, Bryne M, Schenck K. Salivary trefoil factor 3 enhances migration of oral keratinocytes. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 135-40.
8. Storesund T, Schenck K, Osmundsen H, Røed A, Helgeland K, Kolltveit KM. Signal transduction and gene transcription induced by TFF3 in oral keratinocytes. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 511-7.
9. Storesund T, Schreurs O, Messelt EB, Kolltveit KM, Schenck K. Trefoil factor family 3 expression in oral cavity. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 636-43.
10. Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 1999; 103: 31-8.
11. Vestergaard EM, Brynskov J, Ejlskjær K, Clausen JT, Thim L, Nexø E, Poulsen SS. Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 146-56.
12. Eliakim R, Fan QX, Babyatsky MW. Chronic nicotine administration differentially alters jejunal and colonic inflammation in interleukin-10 deficient mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14: 607-14.
13. **Chaiyarit P**, Nexø E. 2009. Expression of salivary trefoil factors in patients with chronic periodontitis. Abstract. 2th Annual Protein and Peptide Conference. Seoul, South Korea (April 2-4, 2009).
14. Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI. Saliva-the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002; 8: 12-22.

15. Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. Eur J Oral Sci 1996; 104: 346-52.
16. Samson MH, **Chaiyarit P**, Nortvig H, Vestergaad EM, Ernst E, Nexø E. 2011. Trefoil factor family peptides in human saliva and in cervical secretions during the menstrual cycle. Method evaluation and results on healthy individuals. Clin Chem Lab Med. 49:861-868.