



## รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการแสดงออกของจิ้นแรงค์แอลและจิ้นโอพีจี

ในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย

เชื้อพอร์ไฟโรโมนาส จิงจิวัลิส ที่ถูกทำให้แตกตัว

Effect of *Streblus asper* on expression of *RANKL* and *OPG* in primary human

bone cells induced by sonicated *Porphyromonas gingivalis*

โดย

อ.ดร. ปฐิมาพร พิงชาญชัยกุล

อ.ดร. อเนก ชยสดมภ์

ผศ.ทพญ. ภัทรมน รัตนพันธุ์

รศ.ทพญ. ดร. สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณ 2555

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์โดยได้รับความร่วมมือจาก  
อาสาสมัครทุกท่านที่เข้าร่วมโครงการ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในทีมสัลยศาสตร์ช่องปากและ  
ขากรรไกร คลินิกปริทันตวิทยา และหน่วยวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ในการให้ความ  
ช่วยเหลือในการทำวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้ความเอื้อเพื่อ  
อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่าน

## บทคัดย่อ

การละลายตัวของกระดูกเบ้ารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบระดับรุนแรงเป็นผลจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ เชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* *จิงจิवालิส* และเป็นผลจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ข้อยเป็นสมุนไพรรักษาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผลิตภัณฑ์สารสกัดใบข่อยสามารถนำมาใช้ทางคลินิกเพื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบควบคู่ไปกับการรักษาแบบอนุรักษ์โดยการขูดหินปูน ในปัจจุบัน เรายังไม่ทราบผลของสารสกัดใบข่อยช่วยกลไกการควบคุมเซลล์กระดูกในโรคปริทันต์อักเสบ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบข่อยต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ปฐมภูมิที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* *จิงจิवालิส* โดยทำการทดสอบเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิที่ได้มาจากอาสาสมัครจำนวน 4 คน กับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* *จิงจิवालิส* และสารสกัดใบข่อยที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวัดผลความมีชีวิตของเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆ ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT) และวัดสัดส่วนระดับการแสดงออกของยีนแรงค์แอล (*RANKL*) ต่อยีนโอพีจี (*OPG*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการละลายตัวของกระดูกจากระบวนการอักเสบด้วยวิธี รีวไทม์พีซีอาร์ (realtime PCR) ผลการทดสอบพบว่า มีร้อยละของเซลล์ตายมากขึ้นตามความเข้มข้นและเวลาที่มากขึ้นจาก 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงที่สัมผัสสารทดสอบ ที่ 48 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วยส่วนผสมของสารสกัดทั้งสอง พบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกน้อยกว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารทดสอบอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียว ผลการวิเคราะห์ของอาสาสมัคร 3 ใน 4 คนมีสัดส่วนการแสดงออกของยีนแรงค์แอลต่อยีนโอพีจีคล้ายคลึงกัน โดยพบว่ามีสัดส่วนการแสดงออกของยีนสูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้นอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียวและสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งสองมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ปฐมภูมิและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมสมดุลการสร้าง-การละลายของกระดูก และควรมีการศึกษาในอนาคตเพื่อยืนยันผลการละลายตัวของกระดูกโดยตรง เช่น ศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์สลายกระดูก หรือศึกษาในสัตว์ทดลอง

โครงการนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ HE542127)

## Abstract

Alveolar bone loss found in severe periodontitis cases is a result of both infectious bacteria, namely *Porphyromonas gingivalis* and of the subsequent inflammatory responses. A Thai herb, *Streblus asper* is well recognized for anti-bacterial and anti-inflammatory properties. In previous studies, *S.asper* leaf-extract products can be used clinically as an adjunct to conventional scaling, to alleviate periodontitis. To date, effects of *S.asper* leaf-extract on inflammatory bone loss, secondary to periodontitis, has not been elucidated. In order to study effects of various concentration *S.asper* leaf-extract and *P.gingivalis* on regulatory process of human bones, primary osteoblasts obtained from 4 volunteers were tested by cultured with the reagents. Cytotoxicity for various concentrations of sonicated *P. gingivalis* and *S.asper* leaf-extract were examined using MTT assay at various incubation time. Realtime-reverse-transcription PCR was performed to examine ratio level of expression of *RANKL* to *OPG*, osteoblast related inflammatory regulators, in osteoblasts treated with either of or both of the tested reagents. At 2, 12, 24 and 48 hours after treatment, more cell death were found with time and with higher concentrations of the tested agents. At 48 hours, there were fewer cells died in the group treated with both extracts than those treated with either of the extract as well as than those with no-treatment group. The analysis showed that osteoblasts derived from 3 of 4 volunteers exhibited a similar pattern of ratio of gene expression level. Ratio of *RANKL* to *OPG* in group treated with both extracts was higher than the ratio found in groups treated with either of the extract and that of the control group. These results suggested that both tested extracts affected survival of the primary human osteoblasts and that affected the regulation of gene involved in bone homeostasis. Further studies, such as in osteoclasts and animal models, are needed to ascertain the direct effect on bone resorption. This study has been approved by the ethical committees for human research, KKU #HE 542127.

## สารบัญเรื่อง

|                                                                           | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                                                           | ก    |
| บทคัดย่อ                                                                  | ข    |
| Abstract                                                                  | ค    |
| บทนำ                                                                      | 1    |
| วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง                                                     |      |
| โรคปริทันต์อักเสบ                                                         | 6    |
| เชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส                                            | 7    |
| กระดูก                                                                    | 9    |
| เชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และการแสดงออกของจีนแรงค์ แรงค์แอลและโอพีจี | 12   |
| การใช้เซลล์สร้างกระดูกมนุษย์แบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ                    | 13   |
| สมุนไพรข่อย                                                               | 16   |
| การรักษาโรคปริทันต์อักเสบ                                                 | 19   |
| การตรวจหาการแสดงออกของจีน โดย เรียวไทม์ พีซีอาร์                          | 20   |
| วิธีดำเนินการวิจัย                                                        |      |
| การออกแบบการวิจัย                                                         | 32   |
| กลุ่มตัวอย่าง                                                             | 32   |
| เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัย                                            | 33   |
| วิธีการวิจัย                                                              | 35   |
| การวิเคราะห์ข้อมูล                                                        | 55   |
| ผลการวิจัย                                                                |      |
| ขั้นเตรียมการ                                                             | 56   |
| ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่ได้รับการเก็บตัวอย่าง                         | 56   |
| การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิมนุษย์                       | 56   |

|                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| การหาปริมาณโปรตีนและการตรวจสอบคุณภาพทางชีววิทยาของส่วนสกัดเซลล์แตก<br>ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส | 58  |
| ขั้นการทดลอง                                                                                           | 60  |
| ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์สร้างกระดูก                                                                   | 60  |
| การแสดงออกของจีนแรงค์แอลและโอพีจี                                                                      | 88  |
| อภิปรายผล                                                                                              | 104 |
| บทสรุปและข้อเสนอแนะ                                                                                    | 115 |
| เอกสารอ้างอิง                                                                                          | 116 |