

บทคัดย่อ

เซลล์เอ็นอีคปริทันต์มนุษย์มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อเอ็นอีคปริทันต์ภายใต้สภาวะที่ได้รับแรงจากการบาดเจ็บ หรือแรงจากการจัดฟัน อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมดังกล่าวยังไม่มี ความชัดเจน สมดุลของเนื้อเยื่อเกิดจากสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายเมทริกซ์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์และไซโตไคน์จึงมีบทบาทในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในส่วนของกรวยสลาย ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของแรงดึงต่อการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มเมทริกซ์เมเทโลโปรตีนเอสและตัวยับยั้งของเอนไซม์ รวมทั้งระดับและสัดส่วนการแสดงออกของรีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แคปปาบีไลแกนค์ และ ออสติโอโปรเทคเทอริน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยศึกษาอิทธิพลของแรงดึงภายใต้ปัจจัยของ รูปแบบแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลา ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเอ็นอีคปริทันต์ของมนุษย์ ซึ่งกระบวนการได้มาของเซลล์ ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เซลล์ได้รับแรงจากเครื่องกำเนิดแรงดึงซึ่งพัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ แรงที่ให้ เป็นแรงดึงเชิงเส้นแกนเดียว ออกแบบการทดลองโดยปรับเปลี่ยนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแรง ได้แก่ รูปแบบของแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลา อาร์เอ็นเอจะถูกสกัดจากเซลล์เพื่อตรวจวัดการแสดงออก ระดับยีนของเมทริกซ์เมเทโลโปรตีนเอส ตัวยับยั้งเอนไซม์ รีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แคปปาบีไลแกนค์ และ ออสติโอโปรเทคเทอริน ซึ่งพบว่า แรงดึงในรูปแบบต่างๆ เพิ่มการแสดงออกในระดับยีน อย่างมีนัยสำคัญเฉพาะเอนไซม์เอ็มเอ็ม-13 โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่แรงดึงแบบเป็นรอบ เพิ่มการแสดงออกในระดับยีนทั้ง แรงค้ำไลแกนค์ และ โอพีจี ตั้งแต่ที่ 2 ชั่วโมง และพบสัดส่วนระหว่างแรงค้ำไลแกนค์ต่อโอพีจีเพิ่มขึ้นตามความถี่ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่า เมื่อเพิ่มปัจจัยขนาดของแรงให้กับเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงของระดับสัดส่วนของแรงค้ำไลแกนค์ต่อโอพีจีที่ไปจากเดิม จากที่ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของรูปแบบของแรง เช่น แบบต่อเนื่อง หรือแบบเป็นช่วง แต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งในสภาวะจริงปัจจัยของ ขนาด ความถี่ และรูปแบบ ไม่ได้เป็นอิสระจากกัน และประกอบเข้าด้วยกันในสัดส่วนที่หลากหลาย งานวิจัยนี้แสดงผลเบื้องต้นว่า เซลล์เอ็นอีคปริทันต์จะพยายามรักษาสมดุลของระดับสัดส่วนของแรงค้ำไลแกนค์ต่อโอพีจีให้คงที่ ภายใต้ปัจจัยที่เปลี่ยนไป แต่เมื่อแรงดึงในระดับความถี่หรือขนาดที่มากเกินไปเซลล์จะรักษาสมดุลนี้ได้ การตอบสนองของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ จะเป็นไปในทิศทางที่สนับสนุนการทำลายกระดูก จากสัดส่วนของแรงค้ำไลแกนค์ต่อโอพีจีที่เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: เซลล์เอ็นอีคปริทันต์มนุษย์, แรงดึง, เมทริกซ์เมเทโลโปรตีนเอส, รีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แคปปาบีไลแกนค์, ออสติโอโปรเทคเทอริน

Abstract

Periodontal ligament cells play an important role in maintaining periodontal homeostasis upon mechanical loading caused by mastication or orthodontic force. However, the mechanism of the phenomenon still remains unclear. As proteolytic enzymes and cytokines play roles in the degradation part of the tissue homeostatic process. The present study aims to examine the tension-induced regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, including the expressions and the expression ratio of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin, the key regulators of bone remodeling, by investigating the effect of factors regarding the tension force; pattern, magnitude, frequency and duration. The study was performed using monolayer primary culture of the human periodontal ligament cells. Approval of the Human Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and informed consent were obtained. Tensile force was introduced to the cells using stretch apparatus which developed in our laboratory. Cells were subjected to uni-axial tensile strain which programmed different strain regimens regarding the pattern, magnitude, frequency and duration. The expressions of MMPs, TIMPs, RANKL and OPG were initially analyzed by quantitative real-time PCR. The results demonstrated that with the variety of the tensile strain regimens, a significant increase was only observed on MMP-13 at the gene expression level, however, not at the protein level. While cyclic tensile strain clearly increased both RANKL and OPG expressions since 2 hours and the ratio of RANKL/OPG was increased in a frequency-dependence manner. In addition, the factor of magnitude could modulate the expressions of RANKL and OPG in HPDL cells in responses to static or cyclic strain, and subsequently change the RANKL/OPG ratio. Therefore with an appropriate combination of factors, HPDL cells could maintain the ratio of RANKL/OPG in some extent, however if an inappropriate combination was generated, the RANKL/OPG ratio was increased. The results suggest that HPDL cells when perceive excess tensile strain may support osteoclastogenesis resulting in alveolar bone resorption.

Keywords: human periodontal ligament cells, tensile force, matrix metalloproteinases, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoprotegerin

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญภาพ	iv
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	12
ผลการวิจัย	15
วิจารณ์	26
สรุป	30
บรรณานุกรม	32
ประวัติคณະนักวิจัย	37

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบ/นาที 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน	16
รูปที่ 2 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบ/นาที 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ชนิดที่ 1	17
รูปที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 60 รอบ/นาที เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ 2 และ 6 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ชนิดที่ 1	18
รูปที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL OPG และ RANKL/OPG ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 60 และ 90 รอบ/นาที 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน	21

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 5 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL OPG และ RANKL/OPG ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับแรงดึงแบบต่อเนื่อง ระยะยัดออกร้อยละ 10 และ 20 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีคัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน	23
รูปที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL OPG และ RANKL/OPG ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับแรงดึงแบบเป็นรอบ ที่ความถี่ 60 รอบ/นาที่ ระยะยัดออกร้อยละ 10 และ 20 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีคัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน	25

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

HPDL	Human periodontal ligament
MMPs	Matrix metalloproteinases
TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinases
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
OPG	Osteoprotegerin
Cox-2	Cyclooxygenase-2
RT	Reverse transcription
Q-PCR	Quantitative-polymerase chain reaction