วิธีการทดลอง

สารเคมีสำคัญ

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 (LL-37) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof Dr.Jan GM Bolscher ภาควิชาชีวเคมีช่องปาก ศูนย์การศึกษาทันตแพทยศาสตร์อัมสเตอดัม มหาวิทยาลัยฟรีและมหาวิทยาลัยอัมสเตอดัม ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Department of Oral Biochemistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam, Free University and University of Amsterdam, the Netherlands) การสังเคราะห์เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 อ้างอิงตามที่ปรากฏในการศึกษาของมนตรีขจรและคณะในปี ค.ศ.2011 (Montreekachon et al.) สารเคมีสำคัญในการกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกได้แก่ macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) และ receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) โดยสั่งซื้อจากบริษัท R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA).

สารภูมิต้านทานปฐมภูมิต่อ proliferating cell nuclear antigen ของมนุษย์จากอิมมูโนกลอบูลินจากหนู (PCNA antibody) และสารภูมิต้านทานปฐมภูมิต่อ nuclear factor of activated T-cell 2 (NFAT2 antibody) สั่งซื้อมาจากบริษัท Abcam (Cambridge, United Kingdom) สารภูมิต้านทานปฐมภูมิต่อ $2Cl^-/1H^+$-exchanger-7 (ClC-7 antibody) และสารภูมิต้านทานปฐมภูมิต่อ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH antibody) สั่งซื้อมาจากบริษัท Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA)

การคัดแยกเซลล์โมโนไซท์หรือเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก

เซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast progenitors) ได้มาจากการคัดแยกเซลล์โมโนไซท์จากเลือดมนุษย์ (Human peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) ตัวอย่างเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตรถูกนำมาจากหลอดเลือดดำของอาสาสมัครเพศหญิงอายุระหว่าง 20-30 ปี ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัวอย่างเลือดจะถูกนำไปปั่นแยกโดยวิธี density gradient centrifugation กับสารละลาย Ficoll-Paque™ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) ที่มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.077 ภายหลังปั่นจน

เซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนเป็นระยะเวลา 20 นาที เซลล์โมโนไซท์หรือ mononuclear cells ซึ่งอยู่ในชั้นที่มีลักษณะขาวขุ่น (Buffy coat) จะถูกนำออกมาโดยใช้ Pasteur pipette ดูด ในกรณีเจาะจงต้องการเซลล์โมโนไซท์เพื่อบางการทดลอง ก่อนการปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือด ตัวอย่างเลือดจะถูกบ่มด้วย antibody cocktail (RosetteSep™, STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) เพื่อให้ mononuclear cells ชนิดอื่นเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นแยกเซลล์ตามวิธี density gradient centrifugation จากนั้นนำเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ α-MEM (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal bovine serum; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ร้อยละ 10 2 mM L-glutamine (Lonza Walkersville, Inc.) และเพนนิซิลินและสเตร็ปโตมัยซิน (penicillin/streptomycin; Invitrogen) ร้อยละ 1 บนหลุมเลี้ยงเซลล์ในสัดส่วน 500,000 เซลล์ต่อพื้นที่ผิวของพื้นหลุม 1 ตารางเซนติเมตร

การทดสอบความเป็นพิษของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก

เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และ M-CSF ที่ความหนาแน่น $2.5x10^6$ เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์หนึ่งมิลลิลิตร จะถูกนำไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรเท่าๆกัน โดยมีสัดส่วนปริมาณของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, และ 30 ไมโครโมลาร์ แล้วเลี้ยงไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกแล้วใส่สารละลาย Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) ใน PBS ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 20 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม บ่มไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสารละลายออกแล้วเติมสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรเพื่อทำละลายผลึกฟอร์มาซาน (Formazan) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่นอ้างอิง 630 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้ของกลุ่มที่เลี้ยงในเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37มาเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แล้วคำนวนเป็นร้อยละ

ในการยืนยันผลความเป็นพิษหรือการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก จะทำการศึกษาการแสดงออกของ PCNA ซึ่งเป็นสารบ่งชี้การแบ่งตัวของเซลล์ โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และ M-CSF จะถูกนำไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละ 2 มิลลิลิตรเท่าๆกัน โดยมีสัดส่วนปริมาณของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, และ 30 ไมโครโมลาร์เช่นกัน จากนั้นทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์สลายเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมดจะถูกนำไปแยกตามน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนที่สนใจวิธี Immunoblot หากโปรตีนที่สกัดได้ยังไม่นำมาศึกษาในทันทีจะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การศึกษาผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร M-CSF และ RANKL จะถูกนำไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรเท่าๆกัน หรือในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมที่มีแผ่นแก้ว (Glass cover slip) รองไว้ หลุมละ 500 ไมโครลิตรเท่าๆกัน โดยมีสัดส่วนปริมาณของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, และ 30 ไมโครโมลาร์ อาหารเลี้ยงเซลล์และสารกระตุ้นรวมทั้งเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37จะถูกเปลี่ยนใหม่ทุกวันเว้นวันจนกระทั่งครบกำหนด 10 วัน จากนั้นองค์ประกอบของเซลล์จะถูกตรึงสภาพด้วย 4% พาราฟอร์มาลดีไฮด์ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 10 นาที ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการล้างออกด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง

เซลล์ที่ถูกเลี้ยงบนผิวพลาสติกเมื่อหลังจากตรึงสภาพไว้จะถูกนำไปย้อมทางอิมมูนเคมี (Immunochemistry) เพื่อดูการแสดงออกของ PCNA และย้อมทางเคมีเพื่อดูการแสดงออกของเอนไซม์ Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAcP) ส่วนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงบนผิวแก้วจะถูกนำไปย้อมพิเศษกับสารเรืองแสงและ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) เพื่อดูการแสดงออกของ F-actin และนิวเคลียส ตามลำดับ รวมทั้งย้อมทางเคมีเพื่อดูการแสดงออกของ TRAcP

หลังจากย้อมสีเซลล์แล้ว ตัวอย่างเซลล์บนผิวพลาสติกและผิวแก้วจะถูกนำไปถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์พร้อมแผ่นกรองแสงตามลำดับ ซึ่งติด

กล้องถ่ายรูปที่บันทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล จากนั้นนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์สลายกระดูกโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ImageJ เวอร์ชั่น 1.45g เซลล์จะถูกนับโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าซึ่งกำหนดลักษณะจำเพาะของเซลล์สลายกระดูกคือ เซลล์มีลักษณะใหญ่มีนิวเคลียสจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 3 นิวเคลียส ย้อมติดสีแดงม่วงซึ่งบ่งถึงการแสดงออกของ TRAcP และแสดงลักษณะของ F-actin ที่คล้ายวงแหวนที่ขอบเซลล์ จากนั้นคำนวนสัดส่วนจำนวนเซลล์สลายกระดูกต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด แล้วนำไปเทียบเป็นอัตราส่วนกับค่าที่คำนวนได้ในกลุ่มควบคุม ดังสูตรคำนวนข้างล่างนี้

$$\text{อัตราส่วนการแปรสภาพเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์สลายกระดูกกลุ่มทดลอง} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์สลายกระดูกกลุ่มควบคุม} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดกลุ่มควบคุม}}$$

การศึกษาผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการสลายกระดูก

เพื่อศึกษาผลของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการสลายกระดูก โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร M-CSF และ RANKL จะถูกนำไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมซึ่งรองด้วยแผ่นเนื้อฟัน (dentin) หลุมละ 100 ไมโครลิตรเท่าๆกัน โดยมีสัดส่วนปริมาณของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกันคือ 0, 4, และ 8 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 3 หลุมต่อหนึ่งกลุ่มตัวอย่าง อาหารเลี้ยงเซลล์และสารกระตุ้นรวมทั้งเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37จะถูกเปลี่ยนใหม่ทุกวันเว้นวันจนกระทั่งครบกำหนด 10 วัน จากนั้นองค์ประกอบของเซลล์จะถูกตรึงสภาพด้วย 4% พาราฟอร์มาลดีไฮด์ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 10 นาที ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการล้างออกด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง

เซลล์ที่ตรึงสภาพไว้จะถูกนำไปย้อมพิเศษเพื่อยืนยันการแปรสภาพของเซลล์กับสารเรืองแสงและ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) เพื่อดูการแสดงออกของ F-actin และนิวเคลียส ตามลำดับ รวมทั้งย้อมทางเคมีเพื่อดูการแสดงออกของ TRAcP

หลังจากย้อมสีเซลล์แล้ว ตัวอย่างเซลล์ถูกนำไปถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่แหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์พร้อมแผ่นกรองแสงซึ่งติดกล้องถ่ายรูปที่บักทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล จากนั้นชะล้างเซลล์บนผิวเนื้อฟันก่อนจะนำแผ่นเนื้อฟันไปย้อมด้วยหมึกสีดำและเช็ดด้วยผ้าชุบน้ำหมาดๆ สีดำที่ติดอยู่หลังจากเช็ดจะคงเคลือบบนผิวของหลุมที่เกิดจากการสลายเนื้อฟันของเซลล์สลายกระดูก นำแผ่นเนื้อฟันไปสำรวจและ

บันทึกภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาซึ่งติดกล้องถ่ายรูปที่บักทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณพื้นที่เนื้อฟันถูกสลายไปโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ImageJ เวอร์ชั่น 1.45g จากนั้นคำนวนสัดส่วนพื้นที่การสลายเนื้อฟันต่อพื้นที่ทั้งหมด แล้วนำไปเทียบเป็นอัตราส่วนกับค่าที่คำนวนได้ในกลุ่มควบคุม ดังสูตรคำนวนข้างล่างนี้

$$\text{อัตราส่วนสลายเนื้อฟัน} = \frac{\text{พื้นที่การสลายเนื้อฟันกลุ่มทดลอง} / \text{พื้นที่ทั้งหมดกลุ่มทดลอง}}{\text{พื้นที่การสลายเนื้อฟันกลุ่มควบคุม} / \text{พื้นที่ทั้งหมดกลุ่มควบคุม}}$$

การศึกษาการแสดงออกของสารพันธุกรรมระดับ Messenger Ribonucleic Acid (mRNA)

Ribonucleic acid (RNA) ทั้งหมดจะถูกสกัดจากเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละ 2 มิลลิลิตรเท่าๆกัน เป็นระยะเวลา 4 วัน โดยมีสัดส่วนปริมาณของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกัน คือ 0, 2, 4, 6, และ 8 ไมโครโมลาร์ โดยใช้สารเคมีและวิธีการตามบริษัทผู้ผลิตชุดสกัด RNA Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) cDNA จะถูกสร้างจากปริมาณ RNA ที่สกัดได้จำนวน 250 นาโนกรัมโดยใช้สารเคมีและวิธีการตามบริษัทผู้ผลิต SuperScript First-Strand cDNA System (Fermentas, Hanover, MD, USA) (Krisanaprakornkit et al., 2008) cDNA ที่ได้ถูกนำไปศึกษาดูปริมาณการแสดงออกของยีนโดยวิธี Reverse Transcriptase-PCR มีรายละเอียด primer ดังตาราง

ยีน	Forward primer	Reverse primer
TCIRG1	agatgaaggccgtgtacct	gggatgtggtagtagtggaa
NFAT2	gtacggctggtgttccgcgt	gcgcaccccacgaaaaa
GAPDH (Krisanaprakornkit et al., 2008)	catccatgacaactttggta	ttactccttggaggccatgt

ผลผลิตสาย dsDNA ที่สร้างได้ถูกนำไปวิเคราะห์ใน 1.2% agarose gel และถูกย้อมโดยเอทธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นนำไปสังเกตและบันทึกภาพโดยเครื่อง ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories) ในการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนใช้วิธี Quantitative Real-Time PCR ซึ่งตรวจวัดโดยสารเคมีและวิธีการตาม

บริษัทผู้ผลิต Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR® Green I system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) ในเครื่อง LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Molecular Biochemicals) จากนั้นนำค่าการแสดงออกของยีนที่สนใจมาคำนวนเทียบสัดส่วนกับยีนอ้างอิง (GAPDH) ในแต่ละกลุ่ม (ΔCt) แล้วจึงนำค่าสัมพัทธ์นั้นมาเทียบสัดส่วนกับค่าสัมพัทธ์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมในแต่ละตัวอย่าง ($\Delta\Delta$Ct)

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี Immunoblot

โปรตีนจะถูกสกัดจากเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละ 2 มิลลิลิตรเท่าๆกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยมีสัดส่วนปริมาณของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 แตกต่างกันคือ 0, 2, 4, และ 8 ไมโครโมลาร์ เซลล์จะถูกทำให้แตกออกโดยใช้สารละลาย 1% Triton X100 ที่มีส่วนผสมของ protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) ภายใต้อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โปรตีนที่แขวนลอยจำนวน 10 ไมโครกรัมจะนำไปแยกตามน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธีการโครมาโทกราฟีใน 12% SDS-PAGE ร่วมกับการใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า จากนั้นโปรตีนจะถูกถ่ายไปยังแผ่น nitrocellulose ชนิดบาง

เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ แผ่น nitrocellulose ที่ประกอบไปด้วยโปรตีนถูกนำไปบ่มในสารละลาย 5% nonfat dry milk ใน 0.1% Tween-20 (Bio-Rad Laboratories) ใน TBS เพื่อกำจัดการแสดงออกของโปรตีนส่วนเกิน แล้วนำไปบ่มกับ ClC-7 antibody (ที่ความเข้มข้น 1 ต่อ 1000) หรือ GAPDH antibody (ที่ความเข้มข้น 1 ต่อ 500) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำมาตรวจดูด้วยการใช้วิธี Immunoreactivity โดยบ่มใน horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (KPL, Gaithersburg, MD, USA) และดูปริมาณปฏิกิริยาการเกิดแสงโดยใช้ LumiGLO Reserve Chemiluminescence (KPL) ปริมาณแสงจะถูกบันทึกเป็นภาพถ่ายจากเครื่อง ChemiDoc XRS

การศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์โดยวิธี *In Situ* Immunofluorescence

เซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้มีการแปรสภาพที่ถูกเลี้ยงบนผิวแก้วในแต่ละสภาวะเป็นเวลา 3-4 วันถูกนำมาตรึงสภาพจาก 4% พาราฟอร์มาลดีไฮด์ที่ละลายใน PBS นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วย PBS จากนั้นเซลล์ถูกนำไปบ่มในสารละลาย 3% Bovine Serum Albumin ใน PBS ที่มี NFAT2 antibody ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาบ่มต่อในสารละลาย 3% Bovine Serum Albumin ใน PBS ที่มี NorthernLights™ 557 anti-rabbit IgG (R&D System, Inc.) , Alexa Fluor® 488-conjugated phalloidin และ DAPI หลังจากย้อมเซลล์แล้ว ตัวอย่างเซลล์ผิวแก้วจะถูกนำไปถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์พร้อมแผ่นกรองแสงตามลำดับ ซึ่งติดกล้องถ่ายรูปที่บันทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่คำนวนได้ในแต่ละการทดลองจะถูกนำมาศึกษาค่าเฉลี่ยเลขคณิตและคำนวนความแตกต่างของความแปรปรวนในแต่ละกลุ่มทางสถิติวิธี Independent t-test ความเชื่อมั่นที่ $P<0.05$, $P<0.01$, and $P<0.005$