ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเอมโดเกนต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก และต่อการแสดงออกของยีนออสทีโอโพรทีเจริน และรีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟเอนเอฟคัปพาบีไลแกนด์ในเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์

ผู้เขียน นางสาวปิยนาถ ตะเภาน้อย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

เอมโดเกนเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่เป็นผลผลิตของอีนาเมล เมทริกซ์ เดริเวทีฟ ได้มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาเนื้อเยื่อปริทันต์เพื่อส่งเสริมการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อ แต่กลไกการทำงานของวัสดุดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่ชัด การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาผลของเอมโดเกนผลต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก และต่อการแสดงออกของยีนออสทีโอโพรทีเจริน และรีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟเอนเอฟคัปพาบีไลแกนด์ในเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MG-63 ที่ความหนาแน่น$1.5x10^4$ เซลล์ต่อหลุมกับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวที่ความหนาแน่น$1.5x10^4$เซลล์ต่อหลุม ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีทัลโบวายน์ซีรัมร้อยละ 10, ไมโครสเตติน 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, คานามัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, แอล-กลูตามีนร้อยละ 1, วิตามินดี 10^{-8}โมลาร์, เด็กซาเมทาโซน 10^{-7} โมลาร์ โดยเติมเอมโดเกนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในหลุมทดลอง นำมาทำการตรวจสอบการสร้างเซลล์สลายกระดูกด้วยการย้อมติดสีทาร์เทรตรีซิสแตนท์ แอซิดฟอสฟาเตส หลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมทั้งสิ้น 14 วัน โดยนับเฉพาะเซลล์ที่ติดสีตั้งแต่ 3 นิวเคลียสขึ้นไป พบว่าในกลุ่มเอมโดเกนมีจำนวนเซลล์สลายกระดูกมากกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05) ในการตรวจสอบระดับของยีนออสทีโอโพรทีเจรินและรีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟเอนเอฟคัปพาบีไลแกนด์ นำเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MG-63 มาเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ได้แก่ ในสภาวะปราศจากซีรัม, เติมซีรัมร้อยละ 10, เติมซีรัมร้อยละ 10 และเอมโดเกนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเป็นเวลา 0, 6, 12,24 และ 24 ชั่วโมง ในแต่ละช่วงเวลาได้นำเซลล์มาสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอ และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีวิธีรีเวิร์ส ทราสคริปเตส โพลีเมอรเรส เชน รีแอคชั่น จากการศึกษาพบว่าไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มที่ใส่เอมโดเกนและกลุ่มควบคุมในชั่วโมงดังกล่าว ยังพบอีกว่าอัตราส่วนระหว่างยีนรีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟเอนเอฟคัปพาบีไลแกนด์ต่อยีนออสทีโอโพรทีเจรินไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาดังกล่าว

จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าเอมโดเกนเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกในการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MG-63กับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวโดยที่กลไกการทำงานไม่เกี่ยวข้องกับยีนรีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟเอนเอฟคัปพาบีไลแกนด์และยีนออสทีโอโพรทีเจริน

Thesis Title The Effects of Emdogain on Osteoclast Formation and Osteoprotegerin and Receptor Activator of NF kappa-B Ligand Expression in Human Osteoblasts

Author Miss Piyanat Taphaonoi

Major Program Oral Health Sciences

Academic Year 2006

ABSTRACT

Emdogain is a commercial product of enamel matrix derivative (EMD). It has been widely used in periodontal treatment to promote tissue regeneration. The mechanisms of its action still remain unknown. This study therefore aims to investigate the effects of Emdogain on osteoclast formation and osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) mRNA expression in human osteoblasts. Osteoblast like-cell MG-63, $1.5x10^4$cells/well were co-cultured with peripheral blood mononuclear precursors (PBMCs), $1x10^6$ cells/well in 24 well-plates. The cocultures were treated with using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 50 U/ml mycostatin, 100 U/ml streptomycin, 100 μg/ml kanamycin, 100 U/ml penicillin, 1% L-glutamine, 10^{-8}M 1α, 25-Dihydroxychloecalciferol and 10^{-7}M dexamethasone as controls. EMD at the concentration of 100 μg/ml was added to experimental wells. After 14 days in MG-63 and PBMC cocultures, osteoclast-like cell formation was determined using TRAP staining. TRAP-positive cells with three or more nuclei were counted. There was a significant increase in the number of osteoclast-like cells (p <0.05) in the EMD-treated group. To determine the mRNA levels of RANKL and OPG, MG-63 cells were cultured in various conditions including, serum-free medium, 10% FBS, serum-free medium with 100 μg/ml EMD for 0, 6, 12, 24, and 48 h. Total cellular mRNA was extracted. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was then performed. There were no significantly differences in the level of OPG and RANKL mRNAs among EMD-treated cultures and controls over various time points as indicated. In addition, the calculated RANKL/OPG mRNA ratio was found no change over various time points. Overall, our results suggest that EMD induces osteoclast-like cell formation in cocultures of MG-63 and PBMCs and its mechanism appears to be independent of RANKL and OPG.