รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจสอบการได้รับโปรตีนลูกผสม TCTP และการแสดงออกของยีน TCTP ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน เมื่อได้รับภยันตราย

(Examination of added recombinant TCTP and expression of TCTP gene in pulp cell after hazardous exposure)

คณะนักวิจัย
นางอุรีพร เล็กกัต
นางสาววิไลวรรณ โชติเกียรติ
นางสาวศิษฎา ตันนุกิจ
นางสุปรียา วาณิชย์ปกรณ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2557-2558 รหัสโครงการ* EC5505-15-L

ส่วนที่ 2 เนื้อหา

1. **ชื่อโครงการเดี่ยว** การตรวจสอบการได้รับโปรตีนลูกผสม TCTP และการแสดงออกของยีน TCTP ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน เมื่อได้รับภยันตราย

   Examination of added recombinant TCTP and expression of TCTP gene in pulp cell after hazardous exposure

2. คณะนักวิจัย

2.1 นางอุรีพร เล็กกัต (Mrs. Ureporn Leggat)
หัวหน้าโครงการวิจัย สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 40%
ลักษณะและสัดส่วนงาน : งานด้านเพาะเลี้ยงเซลล์และตรวจสอบโปรตีนในเซลล์
ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-429873 โทรสาร 074-429873

2.2 นางสาววิไลวรรณ โชติเกียรติ (Miss Wilaiwan Chatigeat)
ผู้ร่วมวิจัย สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20%
ลักษณะและสัดส่วนงาน : งานด้านการสกัดโปรตีน
สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-288383 โทรสาร 074-446656

2.3 นางสาวศิษฎา ตันนุกิจ (Miss Sissada Tannukit)
ผู้ร่วมวิจัย สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 25%
ลักษณะและสัดส่วนงาน : การตรวจสอบการแสดงออกของยีนส์
ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-429873 โทรสาร 074-429873

2.4 นางสุปรียา วาณิชย์ปกรณ์ (Mrs. Supreya Wanichpakorn)
ผู้ร่วมวิจัย สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 15%
ลักษณะและสัดส่วนงาน : การเพาะเลี้ยงเซลล์และเทคนิคทั่วไปในห้องปฏิบัติการ
ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-429873 โทรสาร 074-429873

3. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยทุกท่านและแหล่งทุน โดยงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจากงบประมาณประมาณแผ่นดิน ปี 2557 และ 2558 (ต่อเนื่อง 2 ปี) โดย Grant no. DEN570054S-1-2 รวมทั้งทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก คปก. Ph.D. Program Grant no. PHD/005/2553 แก่ นางสาวอัญชนา คงแสงแก้ว ทุนมหาวิทยาลัย (NRU) และทุนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4. บทคัดย่อภาษาไทยและอังกฤษ

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือ ส่วนแรกเกี่ยวกับการตรวจสอบผลของภยันตรายต่อเซลล์ที่เป็นความร้อน และการได้รับโปรตีนลูกผสม TCTP จากยีนกุ้ง banana prawn (Penaueus mergniensis, *Pmer*-TCTP, ต่อการมีชีวิตและการแสดงออกของยีน TCTP ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน (HDPCs) ส่วนที่สอง คือ การตรวจสอบคุณสมบัติ anti-oxidant ของ *Pmer*-TCTP และผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกเกี่ยวกับฟัน (odontogenic differentiation) ซึ่งได้แก่ยีน DSPD, DMP1, OPN และ ALP รวมทั้งยีน TPT1 และ BCL2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HDPCs ที่ได้รับภยันตรายเป็นสาร HEMA

เซลล์ HDPCs แยกได้จากเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันของมนุษย์และทำการเพาะเลี้ยงที่ 37°C โดยภยันตรายที่เป็นความร้อนเกิดโดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงแล้วมาเก็บในตู้คุมอุณหภูมิที่ 43°C เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติม *Pmer*-TC ลงในเซลล์และเลี้ยงต่อที่ 37°C เป็นเวลาต่าง ๆ พบว่าเซลล์ที่ได้รับความร้อนมีความหนาแน่นของเซลล์ลดลง รูปร่างนิวเคลียสคล้าย apoptotic body ภยันตรายที่เป็นความร้อน ลดจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเหนี่ยวนำให้มีเอนไซม์ caspase 3 activity สูงขึ้น ผลของการเติม *Pmer*-TCTP ต่อการตายของเซลล์ที่ได้รับความร้อนขึ้นกับตัวอย่างเซลล์จากแต่ละคน รวมทั้งความเข้มข้นของ TCTP ความร้อนสามารถเพิ่มระดับการแสดงออก

mRNA ของ TCTP ในทางตรงข้ามระดับการแสดงออกของโปรตีน TCTP ในเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง *Pmer*-TCTP ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ mRNA ของ TCTP แต่มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน TCTP ในเซลล์ที่ได้รับความร้อน

ในการศึกษาภยันตรายจากสาร HEMA พบว่า TCTP ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ng/ml สามารถช่วยให้เซลล์ HDPCs ที่ได้รับ HEMA ที่ 8 mM รอดชีวิต โดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่ต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ผลจากการวิเคราะห์ anti-oxidant พบว่า *Pmer*-TCTP ไม่มีฤทธิ์ anti-oxidant ผลของ qRT-PCR จากเซลล์ HDPCs ที่ได้รับ 100 ng/ml ของ *Pmer*-TCTP หรือ 8 mM HEMA หรือ 100 ng/ml *Pmer*-TCTP + 8 mM HEMA พบว่า HEMA ลดการแสดงออกของยีน DSPP, DMP1 และ ALP ทั้ง 24 ชม. และ 72 ชม. แต่เพิ่มการแสดงออกของยีน BCL2 และ TPT1 ตลอดช่วงการทดลอง *Pmer*-TCTP สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน DSPP, DMP1, OPN และ ALP แต่ลดการแสดงออกของยีน TPT1 และ BCL2 ยีน TPT1 และ BCL2 มีการแสดงออกน้อยลงในเซลล์ที่ได้รับ *Pmer*-TCTP + HEMA เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ HEMA อย่างเดียว ผลการทดลองนี้ ชี้แนะว่า *Pmer*-TCTP อาจปกป้องเซลล์ที่ได้รับ HEMA โดยมิได้เกิดจากการเป็นสารที่มีฤทธิ์ anti-oxidont แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับการที่ TCTP มีส่วนในการรักษาเสถียรภาพของ mitochondria ยิ่งกว่านั้น TCTP ยังสนับสนุนให้เซลล์ differentiate โดยเห็นได้จากการเพิ่มการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างฟัน

This study composed of two parts. The first part aimed to investigate the effects of heat stress on cell viability, translationally controlled tumor protein (TCTP) expression, and the effects of *Pmer*-TCTP cloning from banana prawn (*Penaeus merguiensis*) on heat-stressed human dental pulp cells (HDPCs). The second part was to evaluate the anti-oxidative property of *Pmer*-TCTP and examined its effect to gene expressions related to odontogenic differentiation including DSPP, DMP1, OPN and ALP gene as well as TPT1 and BCL2 which related to apoptosis in HEMA treated HDPCs.

HDPCs were isolated from human teeth and cultured at 37°C. For heat stress, HPDCs were incubated at 43°C for 45 min. After heat stress, *Pmer*-TCTP was added to HDPCs and cultured for various periods of time at 37°C. Heat-treated cells displayed lower cell density and nuclear morphology resembling apoptotic body. Heat stress significantly decreased cell viability and induced activity of caspase 3. The effect of *Pmer*-TCTP on pulp cell death from heat stress varied depending on each subject and

TCTP concentration. Heat stress up-regulated TCTP mRNA expression level. In contrast, TCTP protein level remained unchanged. *Pmer*-TCTP did not affect TCTP mRNA expression but down-regulated TCTP protein in heat-treated cells.

For HEMA exposure, it was found that TCTP started at 100 ng/ml survived HDPCs treated with 8mm HEMA and the percentages of viable cells did not differ ($p>0.05$) from cells cultured in normal medium. The result of anti-oxidant assay showed that *Pmer*-TCTP had no anti-oxidant activity. The qRT-PCR of HDPCs treated with 100 ng/ml *Pmer*-TCTP, 8 mM HEMA and 100 ng/ml *Pmer*-TCTP + 8 mM HEMA revealed that HEMA down regulated DSPP, DMP1, OPN and ALP at both 24 h and 72 h but up regulated BCL2 and TPT1 at all-time periods. *Pmer*-TCTP up regulated DSPP, DMP1, OPN and ALP but down regulated TPT1 and BCL2. TPT1 and BCL2 were down regulated in cells treated with *Pmer*-TCTP + HEMA compared to HEMA treated cells only. These results suggested *Pmer*-TCTP may protect HEMA treated cells not by being as an anti-oxidant agent but may function together with the TCTP of the cells by maintaining the mitochondria integrity. Moreover, TCTP may promote cell differentiation by up regulating odontogenic gene expressions.

5. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) ประกอบด้วย

- **บทนำ**

งานวิจัยทางด้านทันตวัสดุถือเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับประเทศไทย เนื่องจากในแต่ละปีประเทศต้องสูญเสียเงินตราในการนำเข้าเวชภัณฑ์ในด้านนี้เป็นจำนวนมาก และผู้ป่วยต้องจ่ายค่ารักษาในการบูรณะฟันในราคาแพง เนื่องจากวัสดุส่วนใหญ่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ แต่การพัฒนาทางด้านทันตวัสดุนี้ จำเป็นต้องให้สอดคล้องกับความก้าวหน้าและทันต่อการพัฒนาของวิทยาการในการรักษา

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางด้าน Tissue Engineering และ Regenerative medicine มาใช้ในการรักษาทางทันตกรรมสมัยใหม่ ก่อให้เกิดการพัฒนาวัสดุบูรณะฟัน และอวัยวะปริทันต์ที่มีคุณสมบัติในการนำส่งโมเลกุลที่สามารถส่งสัญญาณให้เกิดการขยายและการซ่อมแซมของเนื้อฟันหรืออวัยวะปริทันต์นั้น ๆ

ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและปรับปรุงคุณสมบัติกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ซึ่งสามารถใช้เป็นวัสดุบูรณะฟัน, ยึดติดกระดูก (bone cement) และยึดครอบฟัน โดยสามารถประยุกต์คุณสมบัติให้วัสดุดังกล่าวสามารถปลดปล่อยโปรตีนได้ยาวนานขึ้น (Limapornvanich et al., 2009) และสามารถปลดปล่อย growth factor ได้ยาวนานขึ้น โดยยังสามารถคงคุณสมบัติของ growth factor นั้นได้ (Rakkiettiwong et al., 2011) และได้ทำการยื่นขอจดสิทธิบัตรแล้ว และปัจจุบันได้ดำเนินการศึกษาปรับปรุงสูตรเรซินกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Resin modified glass ionomer cement, RMGIC) ให้สามารถปลดปล่อยสาร translationally controlled tumor protein (TCTP) ซึ่งมีคุณสมบัติ antiapoptosis และปัจจุบันยังพบคุณสมบัติคล้าย heat shock protein ด้วย

โดย TCTP นี้เป็นโปรตีนที่ทางคณะผู้วิจัยนำมาจากคลังยีนกุ้งของสมาชิกในกลุ่มวิจัย โดยจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า TCTP จากยีนกุ้งนี้สามารถลดการตายของเซลล์ (apoptosis) จากพิษของ HEMA (Wanachatrakul, 2011) ซึ่งเป็นสารตกค้างหรือ residual monomer หลักที่ปล่อยจาก RMGIC ได้ รวมทั้งสามารถลดการตายของเซลล์จากความร้อนอันอาจเกิดจากขั้นตอนการบูรณะฟัน โดยในขั้นนี้มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการศึกษาลงในระดับเซลล์และยีน เพื่อให้ทราบถึงการแสดงออกของยีน TCTP ของเซลล์เอง ในภาวะเกิดภยันตรายจากพิษของสารและจากความร้อน รวมทั้งการใส่โปรตีนลูกผสม TCTP เข้าไปจะมีผลต่อเซลล์และการแสดงออกของยีนอย่างไร เพื่อให้ทราบการทำงานของโปรตีนดังกล่าว รวมทั้งแน่ใจว่า TCTP ที่ใส่เข้าไปนั้นออกฤทธิ์ได้จริง และมีผลกระทบอย่างไรต่อการแสดงออกของยีน TCTP ของเซลล์เอง

- วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบผลของภยันตรายซึ่งในที่นี้ได้แก่ความร้อน และสารเคมีในที่นี้ได้แก่ HEMA ต่อการตายของเซลล์ที่เกิดโดยขบวนการ apoptosis และผลของโปรตีนลูกผสมต่อการมีชีวิตรอดจากภยันตรายทั้งสองชนิด
2. ตรวจสอบการนำเข้าของโปรตีนลูกผสม TCTP เข้าสู่เซลล์ และผลของโปรตีนดังกล่าวต่อการตายของเซลล์เมื่อได้รับสาร HEMA รวมทั้งผล TCTP ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการตายแบบ apoptosis และขบวนการ differentiate ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน (pulp) ของมนุษย์
3. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน TCTP ใน pulp เซลล์เมื่อได้รับความร้อนทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับโปรตีน TCTP รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ Caspase-3 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis

- **สรุป**

1. การศึกษานี้พบว่า HEMA ซึ่งเป็นสาร monomer ที่ปลดปล่อยออกจากขบวนการก่อตัวที่ไม่สมบูรณ์จากวัสดุทางทันตกรรม กลุ่ม resin เช่น composite และ resin modified glass ionomer cement ก่อให้เกิดการตายของ pulp เซลล์และ *Pmer*-TCTP ที่ความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 100 ng/ml สามารถช่วยให้เกิดการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับ HEMA ที่ความเข้มข้น 8 mM ได้ใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ไม่ได้รับ HEMA
2. พบว่า *Pmer*-TCTP ไม่ได้มีคุณสมบัติเป็น anti-oxidant แต่จาก qRT-PCR พบว่า *Pmer*-TCTP ลดการแสดงออกของ TPT1 และ BCL2 ในขณะที่ HEMA นั้นเพิ่มการแสดงออกของ TPT1 และ BCL2 ซึ่งเป็นไปได้ว่า *Pmer*-TCTP น่าจะทำงานร่วมกับ TCTP ของ pulp cell ในการลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยน่าจะเกี่ยวข้องกับการรักษาเสถียรภาพของ mitochondria
3. พบว่า *Pmer*-TCTP กระตุ้นการแสดงออกของยีน DSPP, DMP1, OPN และ ALP ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการ differentiation ของ pulp cell
4. เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันของมนุษย์เมื่อได้รับความร้อนที่ 43°C เป็นเวลา 45 นาที จะมีการลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลง โดยพบเซลล์ที่ตายมีลักษณะคล้ายการเกิด apoptosis และพบมีการเพิ่มของเอนไซม์ caspase-3 และการเพิ่มการแสดงออกของยีน TCTP
5. ผลของโปรตีน *Pmer*-TCTP ต่อเซลล์ที่ได้รับความร้อนขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลา
6. TCTP อาจมิได้เป็นโปรตีนหลักในการช่วยให้เซลล์รอดชีวิตจากภยันตรายชนิดความร้อน

- เอกสารอ้างอิง

1. Limapornvanich A, Jitpukdeebodintra S, Hengtrakool C, Kedjarune-Leggat U (2009). Bovine serum albumin release from novel chitosan-fluoro-aluminosilicate glass ionomer cement: stability and cytotoxicity studies. J Dent 37(9):686-90.
2. Rakkiettiwong N, Hengtrakool C, Thammasitboon K, Kedjarune-Leggat U (2011). Effect of novel chitosan-fluoroaluminosilicate glass ionomer cement with added transforming growth factor beta-1 on pulp cells. J Endod 37(3):367-71.

3. Wanachottrakul N, Chotigeat W, Kedjarune-Leggat U (2011). Translationally controlled tumor protein against apoptosis from 2-hydroxy-ethyl methacrylate in human dental pulp cells. J Mater Sci Mater Med 22(6):1479-87.

6. ภาคผนวก

6.1 แนบสำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (Reprint)

6.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ (ซึ่งเป็นนิพนธ์ต้นฉบับที่กำลังดำเนินการส่งไปพิจารณาตีพิมพ์ยังวารสารระดับนานาชาติ)