

การกระตุ้นการสร้างกระดูกโดย เคลต้า 12 พรอ스타แกลนดิน เอ 2
ผ่านทางปัจจัยการเจริญพีดีจีเอฟ

นายดำรงค์ ดำรงค์ศรี



สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-985-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**DELTA 12-PGJ 2 STIMULATES BONE FORMATION
BY PDGF-MEDIATED MECHANISM**



Damrong Damrongsri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Oral Biology**

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic year 1999

ISBN 974-334-985-5

Thesis Title DELTA 12 PGJ 2 STIMULATES BONE FORMATION BY PDGF-MEDIATED MECHANISM

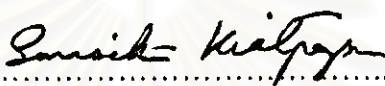
By Damrong Damrongsri

Program Oral Biology

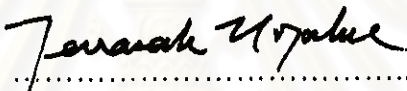
Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Visaka Limwongse


Thesis Co-advisor Prof. Dr. Steven Offenbacher
Asst. Prof. Dr. Prasit Pavasant


Accepted by Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree



..... Dean of Faculty of Dentistry
(Assoc. Prof. Dr. Surasith Kiatpongse)


THESIS COMMITTEE



..... Chairman
(Assoc. Prof. Dr. Jeerasak Nopakun)


..... Thesis Advisor
(Asst. Prof. Dr. Visaka Limwongse)


..... Thesis Co-advisor
(Prof. Dr. Steven Offenbacher)


..... Thesis Co-advisor
(Asst. Prof. Dr. Prasit Pavasant)


..... Member
(Prof. Dr. Jisnuson Svasti)


..... Member
(Assoc. Prof. Dr. Em-on Benjavogkulchai)

คำรงค์ คำรงค์ศรี : การกระตุ้นการสร้างกระดูกโดย เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 ผ่านทาง
 ปัจจัยการเจริญพืคิธิเอฟ (DELTA 12 PGJ 2 STIMULATES BONE FORMATION BY
 PDGF-MEDIATED MECHANISM) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ทพญ. ดร. วิสาชะ ลิ้มวงษ์, อ. ที่
 ปรึกษาร่วม: Prof. Steven Offenbacher, D.D.S., Ph.D, ผศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์,
 124 หน้า. ISBN 974-334-985-5.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างแบบจำลองใหม่เพื่อศึกษาปรากฏการณ์ทางชีวภาพที่เกิดขึ้น
 ขณะเกิดการเสริมสร้างกระดูกโดยใช้หลักการของ ไคด์ ทิซซู รีเจนเนอเรชัน และเพื่อศึกษาถึงผลของ เดลต้า 12
 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 ในกระบวนการสร้างกระดูก รอยโรคที่สร้างขึ้นที่เนื้อกระดูกคอร์ติคัล (5x1.5 มม.) ที่กระดูก
 ขาหลังตอนบนในหนูวิสตาร์ ถูกปิดครอบด้วยท่อกลวงลักษณะครึ่งวงกลมที่ทำจากไทเทเนียม (8x1.5x2 มม.) การ
 ศึกษาการเสริมสร้างกระดูกทำในวันที่ 3, 7, 21, 28 หลังจากเริ่มการทดลอง หนูได้รับการฉีดสารเพื่อศึกษาอัตรา
 การแบ่งตัวของเซลล์ (BrdU) ก่อนการเก็บตัวอย่างกระดูก 1 ซม. ตัวอย่างกระดูกได้ถูกนำไปศึกษาทางจุลกายวิภาค
 ศาสตร์ และศึกษาปริมาณของเอนไซม์คอกซ์-2 ปัจจัยการเจริญพืคิธิเอฟ ปัจจัยการเจริญโอจีเอฟ และ ปัจจัยการ
 เจริญบีเอ็มพี-6 ด้วยวิธีการย้อมทางอิมมูโน จากการศึกษาพบว่ามีการเริ่มการสร้างกระดูกในวันที่ 7 ปริมาณของ
 กระดูกที่สร้างใหม่เพิ่มขึ้นจนถึงร้อยละ 56-60 ของพื้นที่ของรอยโรคในวันที่ 28 ทั้งในบริเวณในรอยโรคของ
 กระดูก คอร์ติคัลและเนื้อรอยโรค พบว่าอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้นก่อนหน้ามีการเพิ่มอย่างมากของ
 กระดูก ปริมาณของ เอนไซม์คอกซ์-2 ปัจจัยการเจริญพืคิธิเอฟ และ ปัจจัยการเจริญบีเอ็มพี-6 ที่มีระดับสูงในวันที่ 3
 ของการสร้างกระดูกใหม่แสดงถึงความสำคัญของปัจจัยทั้งสามในระยะต้นของการสร้างกระดูก สารที่มีผลยับยั้ง
 การทำงานของเอนไซม์คอกซ์-2 (NS-398) มีผลทำให้ลดปริมาณของกระดูกที่สร้างใหม่ลงร้อยละ 25 รวมทั้งลด
 ปริมาณของเอนไซม์คอกซ์-2 และ ปัจจัยการเจริญบีเอ็มพี-6 ลงร้อยละ 50-60 ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาท
 ของพรอสตาแกลนดิน และ ปัจจัยการเจริญอื่นๆในการกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่

ผลของเดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 ต่อการสร้างกระดูกโดยใช้แบบจำลองเดียวกันนี้ในกลุ่ม
 สัตว์ทดลอง 4 กลุ่ม ซึ่งได้รับเดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 เพียงครั้งเดียวเมื่อเริ่มการทดลองในความเข้มข้น
 แตกต่างกัน (10^0 , 10^7 , 10^5 , 10^3 โมลาร์) จำนวนเท่ากัน (10 ไมโครลิตร) โดยใช้กระดูกฝั่งตรงข้ามเป็นกลุ่มควบคุม
 ผลการทดลองพบว่า เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 ที่ 10^5 และ 10^3 โมลาร์ กระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้น
 ร้อยละ 35 โดยมีปริมาณของกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่คิดเป็นร้อยละ 54 และร้อยละ 53 ของรอยโรคตามลำดับ เทียบ
 กับร้อยละ 40 ของรอยโรคในกลุ่มควบคุม ปริมาณของปัจจัยการเจริญพืคิธิเอฟ-เอ และ -บี ในรอยโรคเพิ่มขึ้น 2-3
 เท่า อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 ที่ความเข้มข้นสูง ปริมาณของปัจจัยการเจริญบีเอ็ม
 พี-2 และ -6 เพิ่มขึ้น 2-3 เท่าอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกันในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน
 เอ 2 ที่ความเข้มข้น 10^3 โมลาร์ แต่ไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับของปัจจัยการเจริญโอจีเอ
 ฟ และ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ในทุกความเข้มข้นของเดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 เมื่อเทียบกับกลุ่ม
 ทดลอง ในการทดลองเพื่อทดสอบการกระตุ้นการสร้างกระดูกของ เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 กับรากเทียม
 ลักษณะเป็นเกลียวที่ทำขึ้นจากไทเทเนียม (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.35 มม. ยาว 1.5 มม.) ที่ฝังในกระดูกขาหลังตอนบน
 (2 ตำแหน่งต่อกระดูก 1 ชิ้น) เป็นเวลา 3 และ 8 สัปดาห์นั้น พบว่า เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 กระตุ้นให้
 สร้างกระดูกในตำแหน่งที่อยู่ระหว่างเกลียวของรากเทียมเพิ่มขึ้นร้อยละ 20 และ กระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ล้อมรอบ
 รากเทียมในช่องไขกระดูกมีความหนาและความกว้างเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 34 และร้อยละ 59 ตาม
 ลำดับ) ในเวลา 8 สัปดาห์ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึง เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2 กระตุ้นให้เพิ่มการสร้าง
 กระดูกในแบบจำลองนี้ นอกจากนั้นแล้ว ปัจจัยการเจริญพืคิธิเอฟ-เอ และ -บี รวมทั้ง ปัจจัยการเจริญบีเอ็มพี-2 และ
 -6 ยังอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของกลไกของการกระตุ้นการสร้างกระดูกโดย เดลต้า 12 พรอสตาแกลนดิน เอ 2

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิติศ..... *นิติศ ลิ้มวงษ์*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Dr. S.*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *Dr. S.*

C765434 : MAJOR ORAL BIOLOGY

KEY WORD : CYCLOPENTENONE / DELTA 12 PROSTAGLANDIN J2 / BONE FORMATION / PDGF / BMP / ANIMAL MODEL

DAMRONG DAMRONGSRI : DELTA 12-PGJ₂ STIMULATES BONE FORMATION BY PDGF-MEDIATED MECHANISM. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. VISAKA LIMWONGSE, D.D.S., Ph.D. THESIS COADVISOR : PROF. STEVEN OFFENBACHER, D.D.S., Ph.D., ASST. PROF. PRASIT PAVASANT, D.D.S., Ph.D. 124 pp. ISBN 974-334-985-5

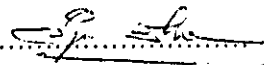
The aims of the present study were to establish a new model for the study of biological events during bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration and to study the effect of Δ^{12} -Prostaglandin J₂ (Δ^{12} -PGJ₂) on bone formation. Half-cylindrical shaped titanium tubes (8x1.5x2 mm) were placed and secured over transcortical defects (5x1.5 mm) at femoral bone in male Wistar rats. Healing periods of 3, 7, 21, 28 days were studied. Animals were injected with 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) one hour before sacrifice in order to characterize cellular mitotic activity. Samples were processed for routine paraffin embedding, then stained with either H&E or immunostained for COX-2, PDGF-B, IGF and BMP-6 expression. Bone regeneration occurred in both cortical defect area and supracortical area at day 7. The amount of the area of new bone was increased during healing period and reached about 56-60% of the defect area by day 28. Mitotic activity was found dominantly in each defect area before a large amount of bone would take place. COX-2, PDGF-B and BMP-6, highly expressed early at day 3, were found to be important in the early stage of bone regeneration. COX-2 inhibitor (NS-398) decreased the area of new bone by 25% ($p < 0.05$) and both COX-2 and BMP-6 expression by 50-60% ($p < 0.05$) in this model. This study shows the early role of prostaglandins and some key growth factors in bone regeneration.

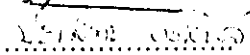
The effect of a single application of Δ^{12} -PGJ₂ on bone formation was studied in this model of bone regeneration. Four groups of the animals received a different concentration of Δ^{12} -PGJ₂ (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} and 10^{-3} M). Ten μ l of Δ^{12} -PGJ₂ were loaded into a collagen sponge and then was placed inside the titanium chamber before placing on top of the defect. The contralateral defect served as a control without Δ^{12} -PGJ₂. The animals were sacrificed 10 days after surgery. The amount of new bone formed and the proliferation rate in the cortical defects were determined histomorphometrically. The expression of PDGF, IGF, BMP-2 and BMP-6 was examined immunohistochemically in new bone regeneration. Bone formation in the defect area was significantly promoted by Δ^{12} -PGJ₂ in a dose dependent manner. It was increased by 35% when the 10^{-5} M concentration (54 % of the defect area) or the 10^{-3} M concentration (53%) were used, as compared with the bone formation observed with the control (40%). Statistically significant increases (2-3 folds) in the area of PDGF-A and -B expression were seen at high doses of Δ^{12} -PGJ₂. A significant increase in BMP-2 and BMP-6 expression (2-3 folds) was seen in the group receiving 10^{-3} M of Δ^{12} -PGJ₂. No significant difference was found in IGF expression and mitotic activity between the treatment and control groups. Single dose of Δ^{12} -PGJ₂ (1×10^{-5} and 1×10^{-3} M) was also investigated for potential use in bone regeneration around implant. Screw-shaped titanium implants (1.35 mm in diameter and 1.5 mm in length) were inserted to femoral bones (2 implants for each femur). Five μ l of carboxymethylcellulose, as carrier, alone (for control) or with Δ^{12} -PGJ₂ were injected into surgically prepared holes before the insertion of implants. Rats were sacrificed at 3 and 8 weeks after surgery. The femoral bones with implants were embedded in methyl methacrylate resin and were prepared to make undecalcified sections. Δ^{12} -PGJ₂ increased about 20% more new bone area in the space between thread at 8 week after surgery. Both vertical distance and the thickness of extended new bone regeneration surrounding the implant from endosteal surface were significantly increase (34% and 59% respectively) with Δ^{12} -PGJ₂ at 8 week after surgery. The present findings indicate that a single application of Δ^{12} -PGJ₂ promotes new bone formation in this model system. Moreover, PDGF-A and -B may be involved in the mechanism of Δ^{12} -PGJ₂-induced bone formation as well as BMP-2 and -6.

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิติศ..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

ACKNOWLEDGEMENTS



First, I would like to express my deepest gratitude and thanks to my advisor, Dr. Visaka Limwongse, who encouraged me to pursue a doctorate degree and being a constant source of inspiration. She also deserves the credit for establishing a doctorate program in Oral Biology at faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. I am grateful for her continuous guidance, helpful advice and support throughout my graduate program.

I would like to give my sincere appreciation to my co-advisor, Dr. Steven Offenbacher, who is most responsible for the dissertation work conducted at the University of North Carolina at Chapel Hill. I would like to acknowledge his excellent guidance, patience, encouragement, and valuable suggestions. He has given me so much of his precious time and energy advising me and helped me to learn and to grow farther in academic way. Without his guidance and constructive comments, this dissertation simply could not be completed. He has been a model supervisor and a wonderful friend. He also provided me a financial support after my scholarship ended and also made the Ozone lab a wonderful workplace and home for the past three and a half years.

Dr Prasit Pavasant, also my co-advisor, deserves my warmest thanks for being supportive of me, with special mention to his consistent advice for helping me with the detail and complete the writing of this dissertation.

Besides my advisors, I would like to thank the rest of my thesis committee: Dr. Jeerasak Nopakun, Dr. Em-on Benjavongkulchai, and Dr. Jisnuson Svasti for the valuable comments and reviewing my work on a very short notice.

I would like to thank my co-workers in the Center for Oral and Systemic Diseases especially in "Bone group" and all other people involved, one way or the other, for their hospitality, advice, comments and willingness to cooperate with my research. Those wonderful memories are sincerely treasured.

This work was financially supported in part by the scholarship from the Ministry of University Affairs, Thailand.

A special thanks goes to Suchaya Pornprasertsuk who has been an invaluable source of strength, confidence, and joy in my life.

Last, but not least, I would like to thank my parents, Prasit and Saowalak Damrongsri, for giving me life at the first place, for educating me with aspects from both arts and sciences, for unending and unconditional love and support to pursue my interests, and for their understanding and encouragement when it was most required. I would like to dedicate this work to my sister, Duangdao, who has always been a source of deep inspiration to me.

CONTENTS

	Page
Title Page (Thai).....	i
Title Page (English).....	ii
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Figures.....	ix
List of Tables.....	xi
Chapter I Introduction.....	1
Background and significance.....	1
Bone.....	3
Local regulators of bone formation.....	4
Bone morphogenetic proteins (BMP).....	5
Platelet-derived growth factors (PDGF).....	10
Insulin-like growth factors (IGF).....	15
Cyclopentenone prostaglandin.....	18
Cyclopentenone and bone regeneration.....	20
Problems and hypothesis.....	23
Specific aims.....	23
Chapter II Materials and Methods.....	25
Animals and anesthesia.....	25
Experimental outlines.....	25
Titanium chamber and titanium implant preparation.....	27
Surgical procedures.....	28
COX-2 inhibitor administration.....	32
BrdU uptake as indicator of mitotic activity.....	33
Immunohistochemistry.....	34
Quantitative evaluation of bone regeneration, growth factor expression and mitotic activity.....	36
RNA isolation and reverse transcriptase –polymerase chain reaction (RT-PCR).....	39
Statistical analysis.....	41
Chapter III Results.....	42
Study I.....	42
Quantitation of bone regeneration.....	42
Locallization of mitotic activity.....	45
COX-2 expression.....	45
PDGF-B expression.....	48
BMP-6 expression.....	48
IGF expression.....	48
Study II.....	51
Study III.....	57
Δ^{12} -PGJ ₂ induces bone regeneration.....	57
Δ^{12} -PGJ ₂ induces PDGF, BMP-2 and –6 expression.....	59
Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on IGF expression.....	59

Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on mitosis.....	59
Study IV.....	71
Δ^{12} -PGJ ₂ induces new bone regeneration surrounding titanium implant.....	71
Chapter IV Discussion and Conclusions.....	78
References.....	102
Vita.....	124



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Illustration of the cortical defect and titanium chamber.....	29
Figure 2 Picture of the titanium chamber stabilized with femoral bone by #010 orthodontic wire.....	30
Figure 3 Schematic illustration of the area of bone regeneration which was used by histomorphometric analysis.....	37
Figure 4 Photomicrograph demonstrating bone regeneration in the cortical defect and supracortical area.....	44
Figure 5 Photomicrograph demonstrating immunohistochemistry staining of COX-2 and PDGF-B at 3 days and 7 days.....	46
Figure 6 Photomicrograph demonstrating immunohistochemistry staining of BMP-6, IGF at 3 days and 21 days.....	47
Figure 7 Expression of COX-2 during different time point of bone regeneration....	49
Figure 8 Expression of PDGF-B during different time point of bone regeneration..	49
Figure 9 Expression of BMP-6 during different time point of bone regeneration....	50
Figure 10 Expression of IGF during different time point of bone regeneration.....	50
Figure 11 Effect of COX-2 inhibitor (NS-398) on bone area in cortical defect and supracortical defect.....	52
Figure 12 Effect of COX-2 inhibitor (NS-398) on bone volume in cortical defect and supracortical defect.....	53
Figure 13 Effect of COX-2 inhibitor (NS-398) on the expression of COX-2, PDGF-B, BMP-6, and IGF by immunological staining in cortical defect..	54
Figure 14 Detection of mRNAs for BMP-2, BMP-6, PDGF-A and PDGF-B by RT-PCR on total RNA from supracortical part of bone regeneration.....	55
Figure 15 Effect of COX-2 inhibitor (NS-398) on the mRNA expression of BMP-2, BMP-6, PDGF-A, and PDGF-B from supracortical and cortical part of bone regeneration at 14 days after surgery.....	56
Figure 16 Light micrographs of new bone regeneration in the defect area 10 days after the surgery.....	58

Figure 17	Light micrographs of PDGF-A expression in the defect area 10 days after the surgery.....	60
Figure 18	Light micrographs of PDGF-B expression in the defect area 10 days after the surgery.....	61
Figure 19	Light micrographs of BMP-2 expression in the defect area 10 days after the surgery.....	62
Figure 20	Light micrographs of BMP-6 expression in the defect area 10 days after the surgery.....	63
Figure 21	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on new bone regeneration.....	64
Figure 22	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on PDGF-A expression.....	65
Figure 23	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on PDGF-B expression.....	66
Figure 24	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on IGF expression.....	67
Figure 25	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on BMP-2 expression.....	68
Figure 26	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on BMP-6 expression.....	69
Figure 27	Light micrographs of BrdU-positive cells in the defect area 10 days after the surgery.....	70
Figure 28	Schematic presentation of histomorphometry analysis of new bone regeneration around titanium implant.....	72
Figure 29	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on vertical distance of new bone regeneration at 3 weeks and 8 weeks.....	73
Figure 30	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on horizontal distance of new bone regeneration at 3 weeks and 8 weeks.....	74
Figure 31	Effect of Δ^{12} -PGJ ₂ on new bone regeneration in thread area at 3 weeks and 8 weeks.....	75
Figure 32	New bone regeneration around titanium implant at 8 weeks after Surgery.....	76

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Overview of bone morphogenetic proteins (BMPs) and their role in osteoinduction.....	8
Table 2	Sequences of the PCR primers for amplification and predicted size of products.....	41
Table 3	Area of new bone regeneration at given time point expressed as percentage of the total defect area	43



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย