การแสดงออกลักษณะเฉพาะของเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์

นางสาว อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OSTEOBLAST CHARACTERISTICS OF CELLS DERIVED FROM HUMAN ALVEOLAR BONE

Miss Indra Wongyaofa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Endodontology
Department of Operative Dentistry
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492111

Thesis Title	OTEOBLAST CHARACTERISTICS OF CELLS DERIVED FROM HUMAN ALVEOLAR BONE
By	Miss Indra Wongyaofa
Field of study	Endodontology
Thesis Advisor	Chootima Ratisoontorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Rangsini Mahanonda, Ph.D

Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Thitima Pusiri ....Dean of the Faculty of Dentistry

(Assistant Professor Thitima Pusiri)

THESIS COMMITTEE

Kwanta Jaru-ampornpan ....Chairman

(Associate Professor Kwanta Jaru-ampornpan)

....Thesis Advisor

(Chootima Ratisoontorn, Ph.D.)

....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Rangsini Mahanonda, Ph.D.)

....Member

(Assistant Professor Kitti Torrungruang, Ph.D.)

....Member

(Somsinee Pimkhaokham, Ph.D.)

อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า : การแสดงออกลักษณะเฉพาะของเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (OSTEOBLAST CHARACTERISTICS OF CELLS DERIVED FROM HUMAN ALVEOLAR BONE). อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร.ชุติมา ระติสุนทร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.รังสินี มหานนท์ จำนวนหน้า 63 หน้า.

กระดูกจัดเป็นเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา โดยอาศัยการทำงานของเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์ละลายกระดูก (osteoclasts) เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียจัดเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดรอยโรคในกระดูก โดยอาศัยการกระตุ้นจากเอ็นโดทอกซินหรือไลโปโพลีแซคคาไลด์ จากหลายการศึกษายืนยันว่าแบคทีเรียไม่สามารถจะกระตุ้นการทำงานของเซลล์ละลายกระดูกได้โดยตรง แต่จำเป็นต้องกระตุ้นผ่านทางเซลล์สร้างกระดูก ในปัจจุบันการศึกษาเซลล์สร้างกระดูกในห้องปฏิบัติการมักใช้เซลล์ที่ได้มาจากกระดูกของหนู หรือใช้เซลล์ไลน์จากหนูหรือเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ถึงแม้ว่าเซลล์เหล่านี้อาจมีลักษณะการแสดงออกของเซลล์ หรือมีการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้นที่แตกต่างจากเซลล์มนุษย์ปกติ มีเพียงไม่กี่การศึกษาเท่านั้นที่เลือกใช้เซลล์จากกระดูกของมนุษย์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเลี้ยงเซลล์จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ และศึกษาการแสดงออกลักษณะเฉพาะของเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์เหล่านี้ โดยกระดูกทั้งหมดได้มาจากผู้ป่วยอายุ 21 ปี ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีส่วนผสมของกรดแอสคอร์บิก และเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ 3 7 14 21 และ 28 วัน จากผลการศึกษาพบว่า เซลล์ที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันทั้งหมดมีการแสดงออกของยีนที่มีความจำเพาะกับเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ คอลลาเจน อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส โบนไซอะโลโปรตีน ออสทิโอพอนทิน และ ออสทิโอแคลซิน นอกจากนั้นยังพบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส และพบว่าเซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการผลิตมิเนอรัลไลสด์โนดูล จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากกระดูกเบ้าฟันสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ ซึ่งเซลล์เหล่านี้น่าจะใช้เป็นแบบที่ดีสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของกระดูกเบ้าฟันต่อไปอนาคต

ภาควิชา........ทันตกรรมหัตถการ............... ลายมือชื่อนิสิต.........Indra Wongyaofa.........

สาขาวิชา......วิทยาเอ็นโดดอนต์................ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.........................

ปีการศึกษา....2549.........................ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.........................

4876128132 : MAJOR ENDODONTOLOGY
KEY WORD: HUMAN OSTEOBLASTS / BONE MARKERS / ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY / MINERALIZATION

INDRA WONGYAOFA : OSTEOBLAST CHARACTERISTICS OF CELLS DERIVED FROM HUMAN ALVEOLAR BONE. THESIS ADVISOR : CHOOTIMA RATISOONTORN, Ph.D, THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. RANGSINI MAHANONDA, Ph.D., 63 pp.

Bone is a dynamic tissue that is constantly remodeled throughout life. Remodeling implies the continuous of bone resorption followed by bone formation, which requires osteoblasts and osteoclasts. Bacterial infections are known to involve in bone pathology, by bacterial factors such as endotoxin and lipopolysaccharide (LPS). Many studies *in vitro*, demonstrated that LPS failed to directly stimulate the osteoclasts, but could indirectly stimulate via osteoblasts. Many studies attempt to isolate osteoblasts from bone fragments. The long bone and calvariae from fetal/neonatal rats and mice were popularly used in the primary cell culture systems. Despite the murine osteoblasts may demonstrate the different osteoblastic patterns from the human osteoblasts, only few studies used the human primary osteoblasts. The purpose of this study is to isolate and culture the cells from human alveolar bone and characterize their osteoblastic phenotypes. Alveolar bone were obtained from three 21 year-old healthy donors. After cultured in medium containing ascorbic acid and β-glycerophosphate at days 3, 7, 14, 21 and 28, we evaluated the expression of bone marker genes, collagen type I, alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteopontin and osteocalcin. In addition, we investigated the alkaline phosphatase activity and mineralized nodule formation. In this study, All samples expressed bone marker genes, and had alkaline phosphatase activity. They also formed the mineralized nodules. In conclusion, cells derived from human alveolar bone demonstrated osteoblast characterstics. These primary cells showed potential as an *in vitro* model of human osteoblasts from alveolar bone, for further studies of alveolar bone biology.

Department...OPERATIVE DENTISTRY.... Student's signature.....Indra Wongyaofa.....
Field of study....ENDODONTOLOGY....... Advisor's signature..........................
Academic year......2006........................Co-advisor's signature...............................

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Chootima Ratisoontorn, for her guidance, encouragement, supervision, suggestion and kindness throughout the course of my Master degree program. I am extremely indebted to my co-advisor, Assistant Professor Dr. Rangsini Mahanonda, Unit Cell for Immunopathological / Clinical Research in Periodontal disease, Chulalongkorn University, for providing the laboratory facilities and her grateful guidance, supervision, valuable technical advice and correction of this thesis. I would like to thankful for Research Unit of Mineral Tissue, Chulalongkorn University, for giving osteoblastic cell line, SaOS2. I wish to thank my thesis committee members; Associated Professor Dr. Kwanta Jaru-ampornpan, Assistant Professor Dr. Kitti Torrungruang and Dr. Somsinee Pimkhaokham for their suggestions and kindness in being committee members.

Sincere appreciation is expressed to Mr. Noppadol Sa-Ard-Iam for his assistance in setting the experiments and preparing this manuscript. I also would like to thank Ms. Pimprapa Rerkyen, Mr. Manop Pachantabut and Mr. Chaiwat Jiraritthamrong for kind advice and technical assistance.

I would like to acknowledge research grant from The Thailand Research Fund for the partial financial support for this study. My sincere appreciation is also extended to the staff of Oral Surgery Department, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for keeping the bone biopsy and for their kindness, guidance and encouragement. Finally, I would like most sincerely to thank my father, my mother, my brother, my sisters and my friends for their love, caring, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai) iv

Abstract (English) v

Acknowledgements vi

Table of contents vii

List of tables ix

List of figures x

Abbreviations xi

Chapter

I. Introduction 1

1.1 Background of the present study 1

1.2 Objectives 6

1.3 Hypothesis 6

1.4 Field of research 7

1.5 Inclusion criterions 7

1.6 Limitation of research 7

1.7 Application and expectation of research 7

II. Literature review 9

2.1 Osteoblasts 9

2.2 Markers of osteoblast differentiation 10

2.3 Bacterial infection and periapical lesions 16

2.4 Osteoblasts-osteoclasts coupling function 17

Page

III. Materials and methods 19

3.1 Samples and cell culture 19

3.2 Osteogenic markers gene expression by RT-PCR analysis.......... 20

3.3 Alkaline phosphatase activity assay.. 22

3.4 Alizarin red S staining of mineralized nodules.. 22

3.5 Budget 22

IV. Results 24

4.1 Primary cells derived from human alveolar bone 24

4.2 RT-PCR analysis.. 25

4.3 Alkaline phosphatase activity assay.. 37

4.4 Alizarin red S staining of mineralized nodules.. 39

V. Discussion and conclusion 41

References 48

Appendices 60

Biography 63

LIST OF TABLES

Table Page

1. Primer sequences used for PCR 21

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Origin of cells of the osteoblast and chondracyte lineages....12
2. Interactions between osteoblasts and osteoclasts 12
3. Structures of OPN and BSP.... 24
4. The expression of osteoblast marker genes in cultured rat calvarial-derived osteoblasts....25
5. COLIA2 mRNA expression....36
6. Semi-quantitative RT-PCR analysis of COLIA2 gene expression....37
7. ALP mRNA expression....38
8. Semi-quantitative RT-PCR analysis of ALP gene expression....39
9. BSP2 mRNA expression....40
10. Semi-quantitative RT-PCR analysis of BSP2 gene expression....41
11. OPN mRNA expression....42
12. Semi-quantitative RT-PCR analysis of OPN gene expression....43
13. OCN mRNA expression....44
14. Semi-quantitative RT-PCR analysis of OCN gene expression....45
15. Semi-quantitative RT-PCR of bone markers in HOB1....45
16. ALP activity....46
17. ALP activity of HOB2 (40x magnification) 47
18. ALP activity of HOB3 (40x magnification)....47
19. Alizarin red S staining....49
20. Mineralization nodules of HOB2....49
21. Semi-quantitative RT-PCR of bone markers in HOB2....70
22. Semi-quantitative RT-PCR of bone markers in HOB3....70
23 Bone marker gene expressions of SaOS2....71

LIST OF ABBREVIATIONS

AA	ascorbic acid
ALP	alkaline phosphatase
BCIP/NPT	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue-tetrazolium salt
BSP2	bone sialoprotein 2
COLI	type I collagen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F12	Dulbecco Minimal Essential Medium with F12 nutrient mixture (1:1)
FBS	fetal bovie serum
Gla	3-gamma-carboxyglutamic acid
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
MMP	matrix metalloproteinases
NFκB	nuclear factor κB
OCN	osteocalcin
oim	osteogenesis imperfecta
OPN	osteopontin
P.gingivalis	*Porphyromonas gingivalis*
PBS	phosphate buffer solution
PC-1	plasma cell membrane glycoprotein
PCR	poylymerase chain reaction
PGs	prostaglandins
PPi	inorganic pyrophosphate
RANKL	receptor activator of NFκB ligand
RGD	Arg-Gly-Asp
TGF-β	transforming growth factor- β
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases

TLRs	Toll-like receptors
TNFs	tumor necrosis factors