จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

ผลของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

จฬ
ท 15
010183

กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์
ดอลลี่ เมธาธราธิป

กุมภาพันธ์ 2543

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ผลของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก

โดย

กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์
ดอลลี่ เมธาธราธิป

กุมภาพันธ์ 2543

31 ส.ค. 2544

I19188C18

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

1. อาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย
2. อาจารย์และบุคลากรของภาควิชารังสีวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ทัศนีย์ ดรงค์สุวรรณ
4. อาจารย์ทันตแพทย์หญิง เกษรา ปัทมพันธุ์
5. คณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย : ผลของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก

ชื่อผู้วิจัย : กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์

ดอลลี่ เมธาธราธิป

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ : กุมภาพันธ์ 2543

บทคัดย่อ

ฟลูออไรด์เป็นสารที่มีการนำมาใช้ในงานทันตกรรมป้องกัน เพื่อป้องกันฟันผุ ซึ่งฟลูออไรด์ที่ใช้อาจให้โดยการรับประทานหรือผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทำความสะอาดฟัน ทำให้เซลล์ในช่องปากมีโอกาสสัมผัสกับฟลูออไรด์ได้ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฟลูออไรด์ในระดับต่าง ๆ ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก ทั้งในแง่ของผลที่มีต่ออัตราการเจริญของเซลล์ ผลต่ออัตราการสร้างโปรตีน รวมทั้งผลต่ออัตราการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเมทริกซ์นอกเซลล์ จากการศึกษาพบว่า ฟลูออไรด์แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ 50 และ 100 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยใช้ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลของฟลูออไรด์ต่ออัตราการเจริญพบว่า ฟลูออไรด์มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่ระดับ 1 และ 10 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยใช้ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลต่ออัตราการสร้างโปรตีน พบว่า ฟลูออไรด์ที่ระดับ 0.1, 1, 10 พีพีเอ็ม กระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน แต่ฟลูออไรด์ที่ระดับ 0.1 พีพีเอ็มเท่านั้นที่กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I นอกจากนี้ฟลูออไรด์ยังมีผลในการลดการหลั่งเอนไซม์ MMP-1 ที่ระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 10 พีพีเอ็ม และลดการหลั่งเอนไซม์ MMP-3 ที่ระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 1 และ 10 พีพีเอ็ม แต่ฟลูออไรด์ไม่มีผลลดการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 ในทุกระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้ จากผลที่ได้เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ฟลูออไรด์ในระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 พีพีเอ็ม น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการเสริมสร้างเนื้อเยื่อยึดต่อโดยเฉพาะในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และมีบทบาทในการลดการทำลายเนื้อเยื่อยึดต่อของเหงือก ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาทางคลินิคได้ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project title : In vitro effects of sodium fluoride on gingival fibroblasts

Name of investigators : Kanokwan Charoonpatrapong

Dolly Methathrathip

Year : February 2000

Abstract

Fluoride is a useful agent used in preventive dentistry to prevent dental caries. The use of fluoride by oral application or by fluoride containing tooth-cleansing products increases the chance of cells in oral cavity to expose to fluoride. In this study, we have the purposes to clarify the effects of fluoride in various concentration on cell proliferation, protein synthesis, and secretion of enzyme related to extracellular matrix degradation in human gingival fibroblasts. From our study, we found that fluoride at 50 and 100 ppm had significant cytotoxic effect (one-way ANOVA, $p=0.05$). Fluoride significantly increased proliferation rate at 1 and 10 ppm (one-way ANOVA, $p=0.05$). To assess the influence of fluoride on protein synthesis, the synthesis of fibronectin and type I collagen was investigated. We found that fluoride at 0.1, 1, and 10 ppm increased fibronectin synthesis but collagen synthesis was increased only at 0.1 ppm. In addition, fluoride decreased the secretion of MMP-1 at 10 ppm and MMP-3 at 1 and 10 ppm. In contrast, MMP-2 secretion was not affected by fluoride. These observation suggest that fluoride at 0.1, 1, and 10 ppm may have the role in new connective tissue formation especially in tissue repair and decreasing gingival tissue destruction.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	4
ผลการทดลอง	10
สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	13
เอกสารอ้างอิง	17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จฬ
ท15
เลขทะเบียน 010183
วัน.เดือน.ปี 27 ส.ค. 43

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	กราฟแสดงระดับความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	21
2.	กราฟแสดงระดับของโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	22
3.	เวสเทอร์นบลอทอนาไลซิส แสดงปริมาณของไฟโบรเนกติน ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	23
4.	ดอทบลอทอนาไลซิสแสดงปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	24
5A	เจลาตินเจล ไซโมกราฟฟี แสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	25
5B	เคซีนเจล ไซโมกราฟฟี แสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-3 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	25
6.	เวสเทอร์นบลอทอนาไลซิส แสดงปริมาณของเอนไซม์ MMP-1 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก	27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ฟลูออไรด์ (Fluoride) เป็นสารที่สามารถเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ผลึกแคลเซียมฟอสเฟตของเนื้อฟันเพื่อให้ทนทานต่อการทำลายจากแบคทีเรียในช่องปาก ดังนั้น ในแง่ของทันตกรรมป้องกัน จึงได้มีการแนะนำให้เด็กได้รับฟลูออไรด์เสริมโดยการรับประทาน เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่ฟัน นอกจากนี้ ยังมีการผสมฟลูออไรด์ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำความสะอาดฟัน เช่น ยาสีฟัน และ น้ำยาบ้วนปาก กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งทำให้ระดับของฟลูออไรด์ภายในกระแสเลือดและในน้ำลายของร่างกายเพิ่มสูงขึ้นมากเนื่องจากการรับประทาน หรือใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีฟลูออไรด์เหล่านี้

บทบาทของฟลูออไรด์ที่มีต่อเมตาบอลิซึมในร่างกาย ไม่ได้มีเพียงการช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่กระดูกและฟันเท่านั้น โดยมีรายงานว่าฟลูออไรด์จะมีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ชนิดอื่นๆในร่างกายด้วย ทั้งในแง่ของอัตราการเจริญ และการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งกลไกการทำงานของฟลูออไรด์ที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์นี้ ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก นอกจากนี้ แม้ว่าจะมีหลักฐานว่าการได้รับฟลูออไรด์ในระดับที่สูงมาก จะก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายได้ เช่น เกิดฟันตกกระ, เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร หรืออาจถึงตายได้ แต่ระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์และเนื้อเยื่ออื่นๆในช่องปาก กลับยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน

โดยปรกติแล้ว จะพบฟลูออไรด์ในกระแสเลือดและในน้ำลายได้เสมอ ในระดับประมาณ 0.013-0.057 ส่วนในล้านส่วน หรือ พีพีเอ็ม (ppm) ในกระแสเลือด[1,2] และ 0.01-0.095 พีพีเอ็มในน้ำลาย[3-6] อย่างไรก็ดี เมื่อร่างกายได้รับอาหารหรือใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของฟลูออไรด์ ก็จะทำให้ระดับของฟลูออไรด์ที่พบในเลือด, ในน้ำลาย, หรือในเนื้อเยื่อมีปริมาณสูงขึ้น (ประมาณ 5 เท่า ในกระแสเลือด และ ประมาณ 10 เท่าในน้ำลายจากต่อมน้ำลายหน้าหู)[7] โดยเฉพาะในน้ำลาย พบว่าระดับของฟลูออไรด์จะสูงกว่าปรกติเป็นเวลาหลายชั่วโมง[4-11] ซึ่งการเพิ่มของฟลูออไรด์นี้ จะมีผลทำให้เซลล์ในเนื้อเยื่อได้สัมผัสกับฟลูออไรด์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นด้วย

มีเซลล์หลายชนิดที่มีรายงานว่าตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฟลูออไรด์ เช่นเซลล์กระดูก เซลล์สร้างเคลือบฟัน (ameloblast) รวมทั้งเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (dental pulp cells) ในกรณีของเซลล์กระดูก มีรายงานว่าฟลูออไรด์จะมีผลต่อการเพิ่มการสร้างคอลลาเจนและเพิ่มระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase)[12-16] แต่ระดับของฟลูออไรด์ที่ให้ผลดังกล่าวจะแตกต่างกันไปในแต่ละการทดลองตั้งแต่ 0.2 ถึง 50 พีพีเอ็ม ขึ้นกับที่มาของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ ยังพบว่าฟลูออไรด์ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 0.2 พีพีเอ็ม จะมีผลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์อินเตอร์สติเชียลคอลลาจีเนส (interstitial collagenase หรือ MMP-1) แต่เพิ่มการสร้างเอนไซม์สโตรมีไลซิน-1 (Stromelysin-1 หรือ MMP-3) ในเซลล์กระดูกของหนูด้วย[17]

ในส่วนของเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟัน ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อฟัน พบว่า ฟลูออไรด์จะมีผลต่อการสร้างโปรตีนเช่นกัน การตอบสนองของเซลล์จะแปรผันตามความเข้มข้นของฟลูออไรด์ โดยพบว่าที่ระดับ 25 พีพีเอ็มของฟลูออไรด์จะมีผลในการยับยั้งการสร้างคอลลาเจนและยับยั้งการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่จะไม่มีผลต่อการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกติน[18,19] ในขณะที่ระดับ 0.5 พีพีเอ็ม ฟลูออไรด์จะมีผลในการกระตุ้นระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่ไม่มีผลต่อการสร้างคอลลาเจน[12]

ส่วนผลของฟลูออไรด์ต่อเซลล์สร้างเคลือบฟัน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ตั้งแต่ 0.5 พีพีเอ็ม จะทำให้ระดับของสารอินทรีย์ตกค้างในเคลือบฟันมากขึ้น[20] และในระดับความเข้มข้นในช่วง 10-100 ส่วนในล้านส่วน จะมีรบกวนการสร้างอนินทรีย์สารของเคลือบฟัน[21-23]

อย่างไรก็ดี รายละเอียดของกลไกการทำงานของฟลูออไรด์ที่มีผลต่อเซลล์ดังกล่าวข้างต้นยังไม่มีผู้ใดทราบแน่ชัด และยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก

เซลล์ของเนื้อเยื่อช่องปากเป็นเซลล์อีกกลุ่มหนึ่ง ที่จะต้องสัมผัสกับการเปลี่ยนแปลงระดับของฟลูออไรด์ตลอดเวลาทั้งจากพลาสมาของเลือด (blood plasma) จากน้ำลาย และจากการใช้ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดฟันและเหงือกที่มีฟลูออไรด์เป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ดี ผลของฟลูออไรด์ที่มี

ต่อเซลล์เหล่านี้ กลับไม่เคยมีการรายงานไว้เลย ซึ่งความเข้าใจถึงผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์ในช่องปาก จะมีประโยชน์อย่างมากในงานทางทันตกรรม

งานวิจัยครั้งนี้ มุ่งที่จะศึกษาถึงผลของฟลูออไรด์ในระดับต่างๆที่มีต่อเซลล์ของเหงือก ทั้งในแง่ของผลที่มีต่ออัตราการเจริญของเซลล์, ผลต่ออัตราการสร้างโปรตีน รวมทั้งผลต่ออัตราการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเมทริกซ์นอกเซลล์ โดยศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก และหวังว่าความรู้ความเข้าใจที่ได้นี้ จะเป็นประโยชน์ในวงการทันตกรรม เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ฟลูออไรด์ในปริมาณที่เหมาะสมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยจะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ เนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จะถูกนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง จากนั้นจึงตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์สร้างเส้นใยคลานออกจากชิ้นเนื้อ จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

เมื่อเซลล์ที่คลานออกจากชิ้นเนื้อเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกถ่ายในอัตราส่วน 1:3 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-7

การวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ด้วยความหนาแน่น 5 x 10^4 เซลล์ต่อหลุมต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10 ดังที่กล่าวข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม เพื่อล้างเอาซีรัมออก แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 1 และมีปริมาณของโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 50, และ 100 พีพีเอ็ม และเซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะนี้ในทุกการทดลอง ยกเว้นจะระบุไว้เป็นอย่างอื่น ในการวัดความเป็นพิษ เซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด (Phenol red) และเติมสารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไปเป็นเวลาอีก 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลึกฟอร์มาแซน (formazan) จากนั้นจึงทำการวัดผลทำโดยการละลายผลึกที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายไดเม็ทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethysulfoxide) แล้วนำสารละลายสีนี้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร (nm) ผลที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบผลกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาแซนของเซลล์ที่ทราบจำนวน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ของการทดลอง

ความแตกต่างของจำนวนเซลล์จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ดันแคนสมัลติเพิลเรนจ์เทสต์ (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

<u>การวิเคราะห์ผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene blue assay)</u>

การศึกษาอัตราการเจริญ จะใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene Blue)[24] ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและเร็ว เซลล์ถูกเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษ แต่ใช้ปริมาณของโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้น 0, 0.1, 1, และ 10 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะตรึง (fixed) เซลล์ด้วยฟอร์มัลดิไฮด์ (Formaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 3.7 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (Borate buffer) หลายๆครั้ง แล้วย้อมด้วยสารละลายสีเมทิลีนบลูความเข้มข้นร้อยละ 1 ในบอเรตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อล้างสีส่วนเกินออกด้วยบอเรตบัฟเฟอร์แล้ว สีที่ย้อมติดเซลล์จะถูกทำละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และ เอธิลอัลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) สัดส่วน 1:1 สารละลายสีนี้จะถูกนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 667.5 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน

ความแตกต่างของจำนวนเซลล์จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ดันแคนสมัลติเพิลเรนจ์เทสต์ (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเวสเทอร์น (Western blot analysis)

เซลล์จะถูกเลี้ยงเหมือนการทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์ในการทดลองชุดที่ 1 จะถูกนำมาทำละลายด้วยเลมลีบัฟเฟอร์ (Laemmli buffer) เพื่อสกัดเมทริกซ์นอกเซลล์ ส่วนเซลล์ในการทดลองอีกชุดหนึ่งจะถูกนำไปวัดจำนวนเซลล์ด้วยการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู

การวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินจะทำโดยนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปแยกด้วยไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบบนจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน โปรตีนจะถูกแยกบนอคริลามายด์เจล (Acrylamide gel) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 จากนั้นจึงถ่ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose, Trans-Blot®, ขนาด 0.45 μm, Bio-RAD, USA) ด้วยไฟฟ้า แล้วจึงนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อไฟโบรเนกติน (Monoclonal antibody against fibronectin, clone NCL-FIB, Novocastra) ความเข้มข้น 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อกับไบโอติน (Biotinylated secondary antibody, Zymed, USA) ความเข้มข้น 1:4,000 และ สเตร็ปตาวิดินที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase conjugated streptavidin, Zymed, USA) ความเข้มข้น 1:1,000 อีกอย่างละ 30 นาที เมื่อเสร็จแล้วจึงนำมาบ่มด้วยสารละลายเออีซี (AEC; Aminoethyl carbazole) ในไดเม็ทธิลฟอร์มามายด์ (Dimethy formamide) ที่อุณหภูมิห้องอีกประมาณ 10-15 นาที ก็จะเห็นแถบสีแดงที่แสดงปริมาณโปรตีนไฟโบรเนกติน ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของไฟโบรเนกติน

การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ I ด้วยการวิเคราะห์แบบดอท-บลอท (Dot-blot analysis)

เซลล์จะถูกเลี้ยงเหมือนการทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ ต่างกันที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ จะเติมกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และเลี้ยงไปเป็นเวลา 5 วัน เมทริกซ์นอกเซลล์จะถูกทำละลายด้วยสารละลายกวอนิดีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ (4M Guanidine hydrochloride) ปริมาณคอลลาเจนจะถูกวัดโดยการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมา

ประกอบเข้ากับเครื่อง BIODOT™ apparatus (Bio-RAD, USA) แล้วหยดสารละลายข้างต้นลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ก่อนที่จะดูดสารละลายออกผ่านแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่องดูดสูญญากาศ คอลลาเจนที่ติดอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะถูกย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อคอลลาเจนชนิดที่ I (Monoclonal antibody against collagen type I, clone COL-1, Sigma, USA) ความเข้มข้น 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อกับไบโอติน ,สเตร็ปตาวิดินที่ต่อกับเปอร์ออกซิเดส เช่นเดียวกับการย้อมไฟโบรเนกตินข้างต้น จากนั้น เคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำยาขยายสัญญาณแบบเคมี Renaissance Western Blot Chemiluminescence reagent (NEN, USA) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และให้พลังงานแสงที่สามารถก่อให้เกิดสัญญาณบนแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ โดยจะปรากฏเป็นจุดดำที่มีความเข้มแปรผันโดยตรงกับปริมาณของคอลลาเจน

การเปรียบเทียบคอลลาเจน จะทำบนฐานของปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน ซึ่งทราบจำนวนได้จากการทดลองอีกชุดหนึ่งที่ทำในลักษณะเดียวกัน แต่นำมาวัดจำนวนเซลล์โดยย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู

<u>การวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 และ MMP–3 ด้วยวิธีไซโมกราฟฟี (Zymography)</u>

เซลล์จะถูกเลี้ยงเหมือนการทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โดยการนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าภายในเจลาดินเจล (Gelatin gel) หรือ เคซีนเจล (Casein gel) เพื่อหาวิเคราะห์ปริมาณ MMP–2 และ MMP–3 ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ MMP-3 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเพิ่มความเข้มข้น (concentrated) 10 เท่า ก่อนนำมาแยกในเคซีนเจล โดยการเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย Nanosep (Gelman, USA) ที่ 7,500 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที Nanosep เป็นหลอดที่แบ่งออกเป็นสองส่วนด้วยแผ่นกรอง เมื่อใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงในช่องตอนบนและเหวี่ยง สารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนบนแผ่นกรองก็จะผ่านลงสู่ส่วนล่าง

การทดลองนี้ เลือกใช้ Nanosep ที่ปล่อยให้สารที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตันผ่านได้ ในขณะที่ MMP ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าจะค้างอยู่ดอนบน และจะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

การเตรียมเจลาตินเจล หรือ เคซีนเจล ทำได้โดยการละลายเจลาตินหรือเบดา-เคซีน (Sigma, USA) ลงในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 8.8 (1.5 M Tris-HCl pH 8.8) ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเจลาติน และ เคซีนในเจล เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้นี้มาเตรียมอคริลามายด์เจล (Acrylamide gel) โดยมีความเข้มข้นของอคริลามายด์เท่ากับร้อยละ 10 ปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้วิเคราะห์จะอยู่บนฐานของจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน เมื่อสิ้นสุดการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว เจลจะถูกล้างด้วย Triton-X 100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 3 รอบ รอบละ 10 นาที จากนั้นจึงบ่มใน Developing buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 5mM $CaCl_2$, 0.1% Brij 35) ที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อช่วยปรับสภาวะของเจลให้เอนไซม์สามารถย่อยเจลาตินหรือเคซีนได้ จากนั้นจึงนำเจลไปย้อมด้วยสีคูมาซีบริลเลียนบลู (Coomassie brilliant blue) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ซึ่งจะย้อมติดเจลาตินและเคซีนในเจลเป็นสีน้ำเงิน แต่ในตำแหน่งที่เจลาตินหรือเคซีนถูกย่อยไป จะปรากฏเป็นแถบใส ซึ่งความกว้างของแถบใสจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของเอนไซม์

<u>การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ MMP-1 ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเวสเทอร์น</u>

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า สำหรับการตรวจหา MMP-3 ข้างต้น จะถูกแบ่งมาใช้วิเคราะห์ปริมาณ MMP-1 โดยนำแยกด้วยไฟฟ้าในอคริลามายด์เจลและถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ในการวิเคราะห์ไฟโบรเนกติน ต่างกันที่ ความเข้มข้นของอคริลามายด์เจลที่ใช้จะเป็นร้อยละ 10 แอนติบอดีต่อ MMP-1 คือ monoclonal anti-matrix metalloproteinase-1 clone 3A9.3 (Sigma, USA) เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิและสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสแล้ว แผ่นไนโตรเซลลูโลสจะถูกนำมาเคลือบด้วย Renaissance Western Blot

Chemiluminescence reagent และตรวจสอบสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ตามที่อธิบายไว้ข้างต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

ความเป็นพิษของฟลูออไรด์

ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นจาก 100 พีพีเอ็มถึง 0.1 พีพีเอ็ม ถูกนำมาทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก ผลการทดลองในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่ 24 ชั่วโมง จะปรากฏให้เห็นได้ที่ระดับ 50 และ 100 พีพีเอ็ม โดยจะพบการลดลงของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้ดันแคนสมัลติเพิลเรนจ์เทสต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระดับของฟลูออไรด์ที่ 10 พีพีเอ็มและต่ำกว่าจะไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ดี จะสังเกตได้จากกราฟว่าระดับของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับฟลูออไรด์ 10 พีพีเอ็ม จะต่ำกว่าระดับของเซลล์ในกลุ่มอื่นๆเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญ

จากผลของความเป็นพิษที่วัดได้ คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการการทดสอบผลของฟลูออไรด์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกในแง่อื่นๆ ที่ระดับ 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับที่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์

ผลของฟลูออไรด์ต่ออัตราการเจริญ

ในรูปที่ 2 เป็นกราฟแสดงอัตราการเจริญของเซลล์ในสภาวะที่มีและไม่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น ฟลูออไรด์จะมีผลในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่ระดับ 1 และ 10 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้ดันแคนสมัลติเพิลเรนจ์เทสต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระดับของฟลูออไรด์ที่ 0.1 พีพีเอ็ม จะไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์

ผลของฟลูออไรด์ต่อการสร้างไฟโบรเนกตินและคอลลาเจนชนิดที่ I

ผลการทดลองในรูปที่ 3 แสดงถึงผลของฟลูออไรด์ต่อการสร้างไฟโบรเนกตินเมื่อวิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์แบบเวสเทอร์น ผลการทดลองแสดงว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์เป็นเวลา

48 ชั่วโมง จะมีผลทำให้เซลล์เพิ่มการสร้างไฟโบรเนกติน ในทุกความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะสังเกตได้จากความเข้มของแถบสีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่เพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีฟลูออไรด์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การเพิ่มขึ้นของไฟโบรเนกตินนี้ จะพบได้ไม่ว่าจะเปรียบเทียบบนฐานของจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน หรือเปรียบเทียบต่อจำนวนโปรตีนที่เท่ากัน

ในรูปที่ 4 เป็นภาพแสดงปริมาณของคอลลาเจน ซึ่งได้จากการหยดสารละลายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อคอลลาเจนชนิดที่ I จากนั้นจึงตรวจสอบสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ สารละลายในแต่ละกลุ่มจะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ โดยแต่ละระดับจะมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 1 เท่า (serial dilution) และหยดสารละลายจากความเข้มข้นทั้งสามระดับเป็นสามแถวจากบนลงล่าง เพื่อให้ได้สัญญาณที่ชัดเจนขึ้น ผลของการกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 5 วัน แสดงว่าปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ I ในแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกัน ซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากความแตกต่างของความเข้มของจุดดำบนแผ่นฟิล์ม ความดำของจุดบนแผ่นฟิล์มจะปรากฏชัดเจนที่สุดในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ 0.1 พีพีเอ็ม โดยจะเห็นได้ชัดในระดับความเข้มข้นที่ 2 และ 3 (แถวที่ 2 และ 3) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงถึงปริมาณการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การกระตุ้นด้วย 1 และ 10 พีพีเอ็ม จะไม่เห็นความแตกต่างของความดำของจุดบนแผ่นฟิล์ม

ผลของฟลูออไรด์ต่อเอ็นไซม์ MMP

การทดสอบผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกในแง่ของการหลั่งเอนไซม์ MMP แสดงไว้ในรูปที่ 5 และ 6 ในรูปที่ 5 แสดงผลของฟลูออไรด์ต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 (รูปที่ 5A) และ MMP-3 (รูปที่ 5B) โดยเทคนิคไซโมกราฟฟี ผลในรูปที่ 5A แสดงว่าระดับของเอนไซม์ MMP-2 จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกกลุ่มการทดลอง ในขณะที่ระดับของเอนไซม์ MMP-3 จะลดลงเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็ม ซึ่งสังเกตได้จากแถบใสบนเค

ซีนเจลที่มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีฟลูออไรด์ ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ด้วยความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 0.1 พีพีเอ็มจะไม่มีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-3

นอกจาก MMP-3 แล้ว ฟลูออไรด์ยังมีผลในการลดการหลั่ง MMP-1 ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งเป็นภาพแสดงการตรวจสอบ MMP-1 จากการวิเคราะห์แบบเวสเทอร์น และตรวจสอบสัญญาณด้วยฟิล์มเอกซ์เรย์ ปริมาณของ MMP-1 จะเปรียบเทียบได้จากแถบดำบนแผ่นฟิล์มที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52 กิโลดาลตัน ระดับของฟลูออไรด์ที่มีผลต่อการลด MMP-1 จะสูงกว่าระดับที่มีผลต่อ MMP-3 โดยความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ลด MMP-1 อย่างชัดเจน คือที่ 10 พีพีเอ็ม ในขณะที่อีกสองความเข้มข้นของฟลูออไรด์ คือ 0.1 และ 1 พีพีเอ็ม จะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของ MMP-1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ฟลูออไรด์มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก ในแง่ของการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์และการสร้างเอนไซม์ MMP โดยฟลูออไรด์ในระดับความเข้มข้นที่สามารถพบได้ในกระแสเลือดและน้ำลาย หรือในช่วง 0.1-10 พีพีเอ็ม สามารถกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน และที่ความเข้มข้น 0.1 พีพีเอ็ม จะสามารถเพิ่มการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ได้ นอกจากนี้ ที่ระดับความเข้มข้นช่วงเดียวกันนี้ ฟลูออไรด์ยังมีผลในการลดการหลั่งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-3 แต่ไม่มีผลต่อ MMP-2 ด้วย

ในแง่ของความเป็นพิษ ผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ฟลูออไรด์จะเริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เหงือกที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับของความเป็นพิษที่สอดคล้องกับรายงานของผู้วิจัยกลุ่มอื่นๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์กระดูกและเซลล์เนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งพบว่าระดับความเป็นพิษจะอยู่ที่ระดับประมาณ 20-50 พีพีเอ็ม[18,25] อย่างไรก็ดี ระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่อาจแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยนั้น อาจขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ทดสอบ รวมทั้งวิธีการทดสอบ ความหนาแน่นของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลอง และระดับของซีรัมที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้น การเปรียบเทียบผลของความเป็นพิษที่เกิดขึ้น รวมทั้งผลของการตอบสนองของเซลล์ จำเป็นจะต้องเปรียบเทียบปัจจัยดังกล่าวทั้งหมดข้างต้นด้วย

ในการทดลองครั้งนี้ คณะผู้วิจัย เลือกใช้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ 50,000 เซลล์ต่อหลุม ในกรณีของการใช้จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม หรือเท่ากับ 25,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งเป็นความหนาแน่นของเซลล์ที่สามารถครอบคลุมพื้นที่ร้อยละ 80 ของจานเลี้ยงเซลล์ในการเริ่มต้นการทดลอง และเลือกใช้ระดับซีรัมที่ร้อยละ 1 ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในช่วง 6 เดือนแรกที่การทดลองกระทำในสภาวะที่ไม่มีซีรัม เนื่องจากปัญหาประการหนึ่งที่เกิดขึ้น คือในสภาวะที่ไม่มีซีรัมนั้น เซลล์จะมีการสร้างคอลลาเจนน้อยมากจนตรวจสอบได้ลำบาก และผลการตอบสนองของเซลล์ต่อฟลูออไรด์ในแต่ละการทดลองบางครั้งไม่ชัดเจน ทำให้ยืนยันผลได้ลำบาก แต่เมื่อคณะผู้วิจัยได้ทำการแก้ไขโดยการเพิ่มระดับซีรัมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปรากฏว่า ผลการตอบสนองของเซลล์

ต่อฟลูออไรด์กลับมีความชัดเจน และสามารถทำซ้ำได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ซีรัมร้อยละ 1 เพื่อลดผลของซีรัมลงให้น้อยที่สุดในการตรวจสอบผลของฟลูออไรด์ และพบว่าการดอบสนองของเซลล์เหงือกต่อฟลูออไรด์ โดยเฉพาะในแง่ของการลด MMP-1 และ MMP-3 นั้น จะขึ้นกับสภาวะของการมีซีรัมด้วย (serum dependent) โดยในสภาวะที่ไม่มีซีรัมนั้น จะไม่พบการลดลงของเอนไซม์เลย (ไม่ได้แสดงรูปไว้) นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ระยะเวลาต่าง ๆ กันในแต่ละการทดลองและเลือกแสดงผลการทดลองในระยะเวลาที่เริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน

ในขณะเดียวกัน ฟลูออไรด์จะมีผลในการกระตุ้นอัตราการเจริญของเซลล์เหงือกด้วย ซึ่งผลนี้คล้ายคลึงกับผลของฟลูออไรด์ที่สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูกและเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยพบว่าระดับของฟลูออไรด์ที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูกอยู่ที่ประมาณ 0.2-1 พีพีเอ็ม [12,15,16] ในขณะที่ระดับที่มีผลต่อเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันอยู่ที่ 0.5-1 พีพีเอ็ม[12] และระดับของ ฟลูออไรด์ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เหงือกในการทดลองนี้ อยู่ที่ 1 และ 10 พีพีเอ็ม อย่างไรก็ดี กลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของฟลูออไรด์ยังคงไม่ชัดเจน แต่ในส่วนของเซลล์กระดูกมีรายงานว่า ฟลูออไรด์จะกระตุ้นการทำงานของจี-โปรตีน (G-protein) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) โดยจี-โปรตีนที่ถูกกระตุ้นจะมีผลในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนส (protein kinase) ภายในเซลล์เป็นทอดๆจนท้ายที่สุดจะไปกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอพีเค (MAPK; mitogen activated protein kinase) ซึ่งกระตุ้นการแบ่งเซลล์ [26] ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่า กลไกเดียวกันนี้ เกิดขึ้นในเซลล์เหงือกด้วยหรือไม่

ผลของการทดลองครั้งนี้ ยังแสดงว่าฟลูออไรด์จะมีผลในการเพิ่มการสร้างไฟโบรเนกตินและคอลลาเจนชนิดที่ I คล้ายคลึงกับผลที่พบในเซลล์กระดูกและเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อยึดต่อของเหงือก และยังมีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ด้วย โดยมีรายงานว่าไฟโบรเนกตินจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนตัวของเซลล์ (cell migration) ,การยึดเกาะ (cell attachment) และการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) ในขณะที่คอลลาเจนจะมีผลต่อการยึดเกาะ ,การเคลื่อนตัว และมีผลต่อการสร้างเอนไซม์เมทริกซ์เมแทโลโปร

ดีเนส รวมทั้งยังเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลักของเนื้อเยื่อยึดต่อด้วย[27-29] การเพิ่มการสร้างโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ น่าจะมีส่วนสำคัญในแง่ของการเสริมสร้างเนื้อเยื่อให้มีความแข็งแรง ตลอดจนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของแผลด้วย

ผลของฟลูออไรด์ในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน คล้ายกับที่มีรายงานในเซลล์กระดูก ซึ่งพบว่าฟลูออไรด์ที่ระดับประมาณ 1 พีพีเอ็ม มีผลในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเช่นกัน อย่างไรก็ดี รายงานเกี่ยวกับผลของฟลูออไรด์ในเซลล์โพรงฟัน กลับพบว่าฟลูออไรด์ไม่มีผลต่อการสร้างไฟโบรเนกติน และมีผลในการยับยั้งการสร้างคอลลาเจน ซึ่งต่างจากผลการทดลองในครั้งนี้ ที่แสดงว่าฟลูออไรด์มีผลในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนทั้งสองชนิด ความแตกต่างในส่วนนี้ อาจมาจากความแตกต่างกันในชนิดของเซลล์ รวมทั้งความแตกต่างของความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้ในการทดลองด้วย Veron และคณะ[18] เลือกใช้ฟลูออไรด์ในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจจะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่การทดลองครั้งนี้ เลือกใช้ความเข้มข้นในระดับที่สามารถพบได้ในกระแสเลือดและน้ำลาย ผลของฟลูออไรด์ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนทั้งสองชนิด แสดงว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10 พีพีเอ็ม น่าจะมีอิทธิพลต่อการเสริมสร้างเนื้อเยื่อยึดต่อโดยเฉพาะในกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อ และน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ต่อไป

นอกจากนี้ ฟลูออไรด์ยังมีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP ด้วย ผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-3 จะสอดคล้องกับความสามารถของในการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินและคอลลาเจน โดยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็มสามารถลดการหลั่งเอนไซม์ MMP-3 ในขณะที่ 10 พีพีเอ็มของฟลูออไรด์จะลดการหลั่ง MMP-1 อย่างไรก็ดี ฟลูออไรด์จะไม่มีผลต่อ MMP-2 ความแตกต่างนี้ อาจจะอธิบายได้จากหน้าที่ของเอนไซม์เหล่านี้ที่ต่างกัน MMP-2 เป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในการทำลายคอลลาเจนชนิดที่ IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเบสเมนต์เมมเบรน (basement membrane) จึงมีความสำคัญในกระบวนการปรับเปลี่ยนรูปแบบการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อยึดต่อ (tissue remodeling)[30-31] ในขณะที่ MMP-1 จะทำลายคอลลาเจนชนิดที่ I และ MMP-3 จะเกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนซึ่งพบในเนื้อเยื่อยึดต่อทั่ว

I19188018

ไป จึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการการทำลายเนื้อเยื่อ[32-33] ดังนั้น ฟลูออไรด์อาจจะมีบทบาทในการลดการทำลายของเนื้อเยื่อแต่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับเปลี่ยนของเนื้อเยื่อ

ผลของฟลูออไรด์ในการลด MMP-1 และ MMP-3 ยังสอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่าฟลูออไรด์จะลดการหลั่งเอนไซม์ในเคลือบฟัน[34] ทำให้การทำลายอินทรีย์สารในเคลือบฟันเกิดไม่สมบูรณ์ และทำให้สารสร้างสารอนินทรีย์ของเคลือบฟันผิดปรกติด้วย อย่างไรก็ดี จากการศึกษาในเซลล์กระดูกกลับพบว่าฟลูออไรด์ที่ระดับประมาณ 0.2 พีพีเอ็ม จะมีผลในการเพิ่มการสร้างเอนไซม์ MMP-3 [17] ซึ่งน่าจะเป็นความแตกต่างของการตอบสนองในเซลล์คนละชนิดที่มีต่อฟลูออไรด์

คุณสมบัติของฟลูออไรด์ในการลดการหลั่ง MMP-1 และ MMP-3 รวมทั้งการเพิ่มการสร้างคอลลาเจนและไฟโบรเนกตินแสดงว่าฟลูออไรด์น่าจะมีอิทธิพลในการสนับสนุนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ซึ่งน่าจะมีการสนับสนุนการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้ สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Denbesten PK, Thariani H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to fluorosis. J Dent Res 1992;71(5):1238-43.
2. Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in dentistry 2nd ed. Copenhegen: Munksgaard, 1996,pp.59.
3. Newbrun E. Fluorides and dental caries 3rd ed. Springfield Illinois USA: Charles C Thomas, 1986,pp.185.
4. Bruun C, Givskov H. Fluoride concentrations in saliva in relation to chewing of various supplementary fluoride preparations. Scand J Dent Res 1979;87:1-6.
5. Heintze ULF, Petersson LG. Accumulation and clearance of fluoride in human mixed saliva after different topical fluoride treatments. Swed Dent J 1979;3:141-8.
6. Thylstrup A, Fejerskov O. Caries chemistry and fluoride-mechanisms of action. Textbook of clinical cariology 2nd ed. Copenhegen: Munksgaard, 1994,pp.231-57.
7. Oliveby A, Lagerlof F, Ekstrand J, Dawes C. Influence of flow rate, pH and plasma fluoride concentration on fluoride concentration in human parotid saliva. Archs Oral Biol 1989;34:191-4.
8. Bruun C, Lambrou D, Larsen MJ, Fejerskov O, Thylstrup A. Fluoride in mixed human saliva after different topical fluoride treatments and possible relation to caries inhibition. Community Dent Oral Epidemiol 1982;10:124-9.
9. Dawes C, Weatherell JA. Kinetics of fluoride in the oral fluids. J Dent Res 1990;69(Spec Iss):638-44.
10. Duckworth RM, Morgan SN, Murray AM. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. J Dent Res 1987;66(12):1730-4.

11. Duckworth RM, Morgan SN. Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. Caries Res 1991;25:123-9.

12. Nakade O, Koyama H, Arai J, Ariji H, Takada J, Kaku T. Stimulation by low concentrations of fluoride of the proliferation and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells in vitro. Archs Oral Biol 1999;44:89-92.

13. Golub L, Chow K. The effect of fluoride pretreatment and ascorbic acid on bone growth in tissue culture. J Periodont Res 1971;6:73-9.

14. Ohta T, Wergedal JE, Matsuyama T, Baylink DJ, William Lau KH. Phenytoin and fluoride act in concert to stimulate bone formation and to increase bone volume in adult male rats. Calcif Tissue Int 1995;56:390-7.

15. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and ALP activity of bone forming cells. Science 1983;222:330-2.

16. Wergedal JE, Lau KH, Baylink DJ. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell cultures. Clin Orthop Rel Res 1988;233:274-82.

17. Langley MS, Waddington RJ. Fluoride induced changes in matrix metalloproteinase expression by bone cells. J Dent Res 1998;77(IADR Abstracts),2754:976.

18. Veron MH, Couble ML, Magloire H. Selective inhibition of collagen synthesis by fluoride in human pulp fibroblasts in vitro. Calcif Tissue Int 1993;53:38-44.

19. Helgeland K. Effect of fluoride on protein and collagen biosynthesis in rabbit dental pulp in vitro. Scand J Dent Res 1976;84:276-85.

20. Bronckers ALJJ, Jansen LL, Woltgens JHM. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. Archs Oral Biol 1984;29:811-9.

21. Patterson CM, Basford KE, Kruger BJ. The effect of fluoride on the immature enamel matrix protein of the rat. Archs Oral Biol 1976;21:131-2.

22. Aoba T, Moreno EC, Tanabe T, Fukae M. Effects of fluoride on matrix proteins and their properties in rat secretory enamel. J Dent Res 1990;69:1248-55.

23. Denbesten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. J Dent Res 1986;65:1272-77.

24. Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. J Cell Sci 1989;92:513-8.

25. Golub L, Glimcher MJ, Goldhaber P. The effect of sodium fluoride on the rates of synthesis and degradation of bone collagen in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1968;129:973-7.

26. Lau KHW, Baylink DJ. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. J Bone Miner Res 1998;13:1660-7.

27. Yamada KM. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In Hay ED (ed). Cell biology of extracellular matrix 2nd ed. Plenum Press, New York 1991,pp.111-46.

28. Hay ED. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In Hay ED (ed). Cell biology of extracellular matrix 2nd ed. Plenum Press, New York 1991,pp.419-62.

29. Knox P, Crook S, Rimmer CS. Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. J Cell Biol 1986;102:2318-23.

30. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 1980;284:67-8.

31. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Gehron-Robey P, Abe S. Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. Biochemistry 1981;20(1):100-4.

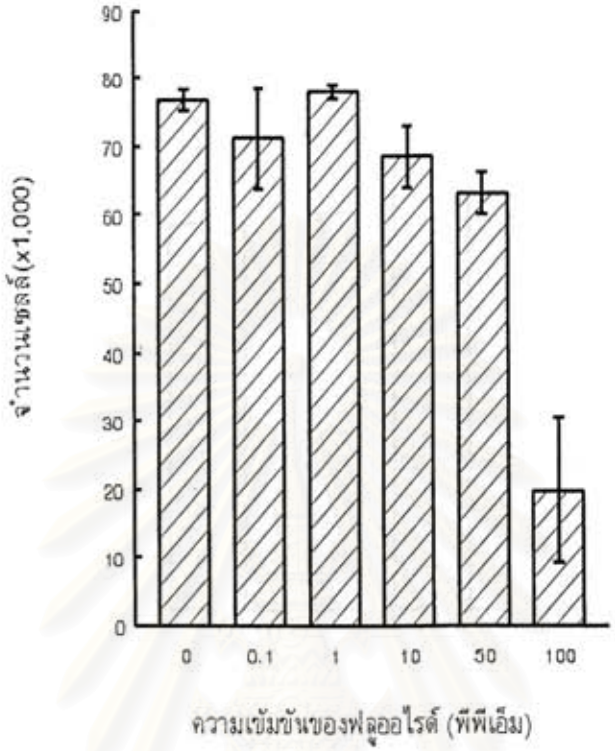
32. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Konttinen YT, Lindy O, Saari H, Uitto VJ. Identification of proteinases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenase. Infect Immun 1992;60:4491-5.

33. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993;64:474-84.

34. Denbesten PK, Heffernan LM. Enamel proteases in secretory and maturation enamel of rats ingesting 0 and 100 ppm fluoride in drinking water. Adv Dent Res 1989;3(2):199-202.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

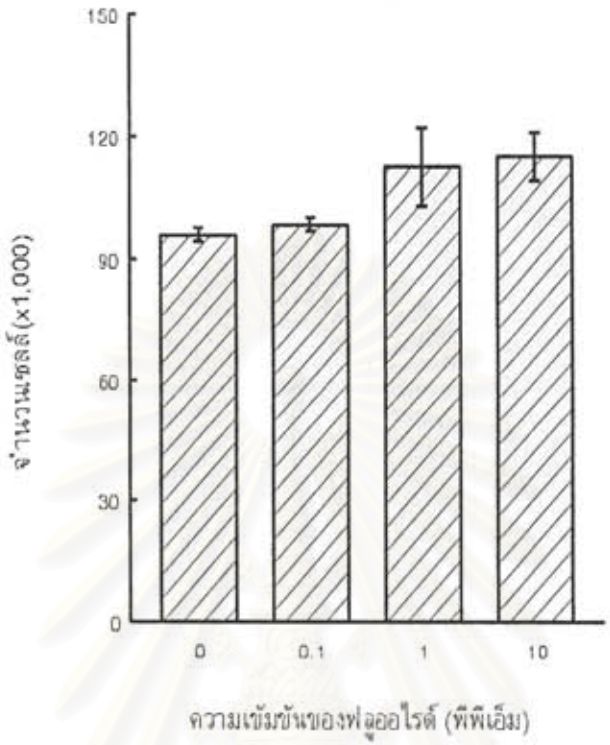
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 กราฟแสดงระดับความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์จะถูกวัดโดยการใช้สารละลายเอ็มทีที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลึกที่เกิดขึ้นจะถูกละลายด้วยสารละลายไดเม็ทธิลซัลฟอกไซด์ และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ 570 นาโนเมตร ผลที่ได้พบว่า ที่ระดับของฟลูออไรด์ 50 และ 100 พีพีเอ็ม จะพบการลดลงของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ (one-way ANOVA,p=0.05) และในระดับของฟลูออไรด์ที่ 10 พีพีเอ็ม จะพบการลดลงของเซลล์เล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ

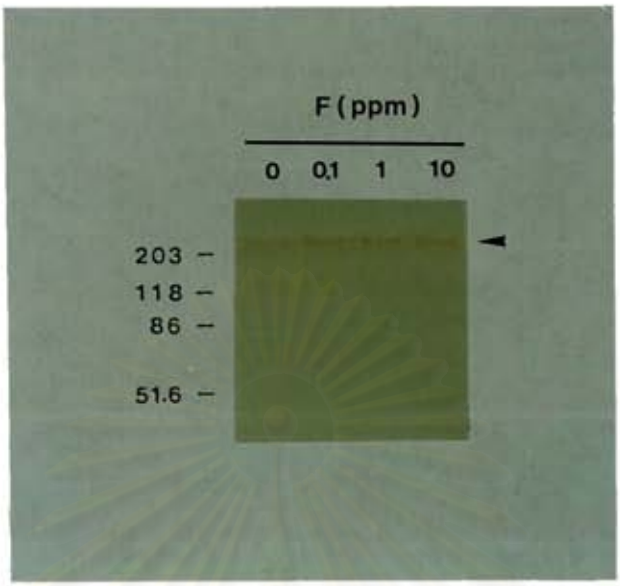
แกนตั้งของกราฟ แสดงจำนวนเซลล์ (x 1,000 เซลล์) โดยเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และแกนนอนของกราฟ แสดงความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 1, 10, 50, และ 100 พีพีเอ็ม ตามลำดับ โดยผลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 2 กราฟแสดงระดับของโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกตรึงด้วยฟอร์มัลดิไฮด์และย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู จากนั้นสีที่ย้อมติดเซลล์จะถูกทำละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและเอธิลอัลกอฮอลล์แล้วจึงนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 667.5 นาโนเมตร และพบว่า ฟลูออไรด์ที่ระดับ 1 และ 10 พีพีเอ็ม จะมีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ (one-way ANOVA,p=0.05)

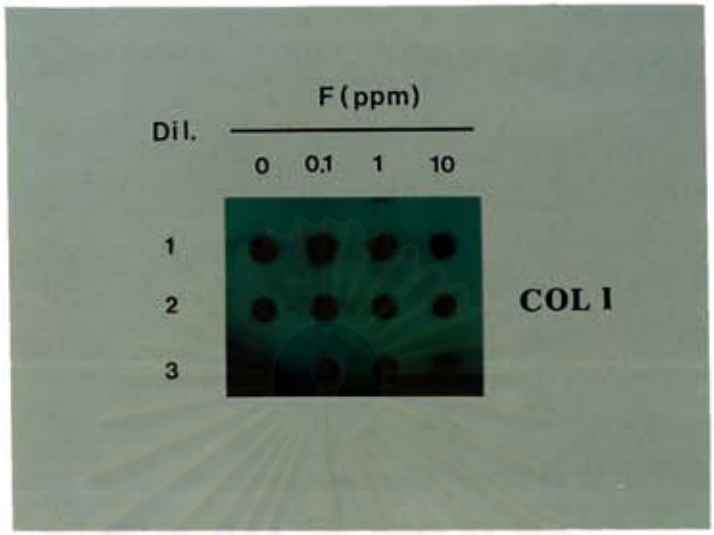
แกนตั้งของกราฟ แสดงจำนวนเซลล์ (x 1,000 เซลล์) โดยเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แกนนอนของกราฟ แสดงความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 1, และ 10 พีพีเอ็ม ตามลำดับ โดยผลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 3 เวสเทอร์นบลอทอนาไลซิส แสดงปริมาณของไฟโบรเนกติน ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมทริกซ์นอกเซลล์จะถูกทำละลายด้วยเลมลีบัฟเฟอร์ และแยกด้วยไฟฟ้าบนอคริลามายด์เจลโดยเปรียบเทียบต่อจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน แล้วจึงถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยไฟฟ้า จากนั้นย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไฟโบรเนกตินและนำมาบ่มด้วยสารละลายเออีซี แถบสีที่ปรากฏแสดงถึงไฟโบรเนกตินที่เซลล์สร้างขึ้น ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้นในทุกระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์

ตัวเลขทางซ้ายมือแสดงถึงตำแหน่งของโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล F คือ ฟลูออไรด์ ppm คือ พีพีเอ็ม ตัวเลขทางด้านบนแสดงปริมาณฟลูออไรด์ที่ใช้ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 1, และ 10 พีพีเอ็ม ตามลำดับ เครื่องหมายลูกศรชี้แสดงถึงตำแหน่งของไฟโบรเนกตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 220 กิโลดาลตัน โดยผลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

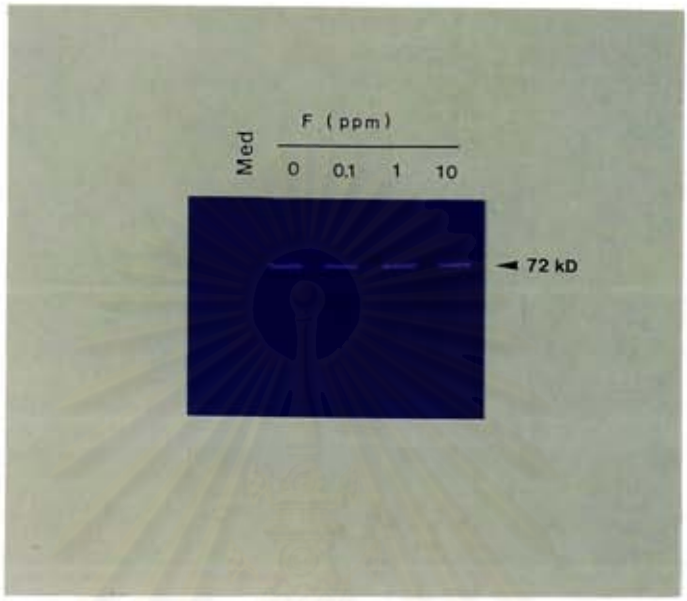


รูปที่ 4 ดอทบลอทอนาไลซิสแสดงปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

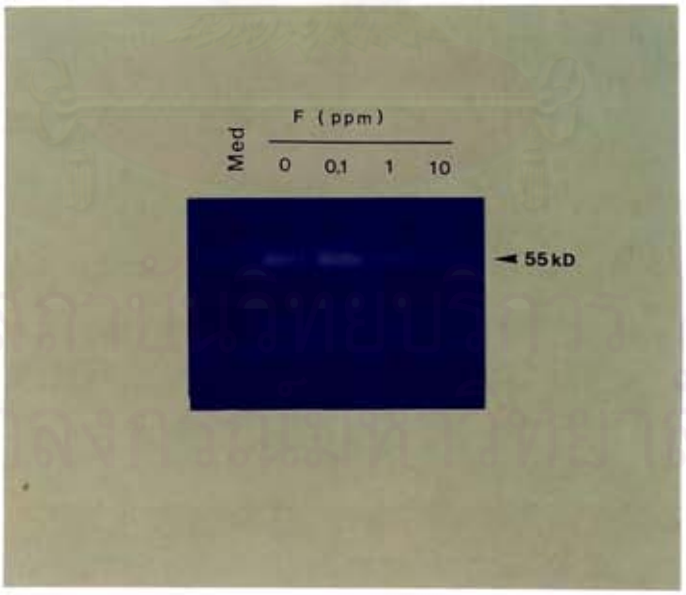
เซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในสภาวะที่มีกรดแอสคอร์บิคและซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจะทำละลายเมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยสารละลายกวอนิดีนไฮโดรคลอไรด์ สารละลายในแต่ละกลุ่มจะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ โดยแต่ละระดับจะแตกต่างกัน 1 เท่า จากนั้นนำสารละลายมาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยคิดเทียบต่อจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน และย้อมด้วยแอนติบอดีต่อคอลลาเจนชนิดที่ I จากนั้นจึงนำมาบ่มในน้ำยาขยายสัญญาณแบบเคมีและตรวจสอบสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ พบว่า ปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะเพิ่มขึ้นในระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 0.1 พีพีเอ็ม

COL I คือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 Dil คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย ตัวเลขทางซ้ายมือแสดงถึงระดับความเข้มข้นของสารละลายจากมากไปน้อยตามลำดับ โดย 1 คือ สารละลายเข้มข้น 1 เท่า 2 คือ สารละลายที่ถูกเจือจางลง 1 เท่า 3 คือ สารละลายที่ถูกเจือจางลง 2 เท่า F คือ ฟลูออไรด์ ppm คือ พีพีเอ็ม ตัวเลขทางด้านบนแสดงปริมาณฟลูออไรด์ที่ใช้ในระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, และ 10 พีพีเอ็ม ตามลำดับ โดยผลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

A



B



รูปที่ 5 ภาพ A เจลาตินเจล ไซโมกราฟฟี แสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

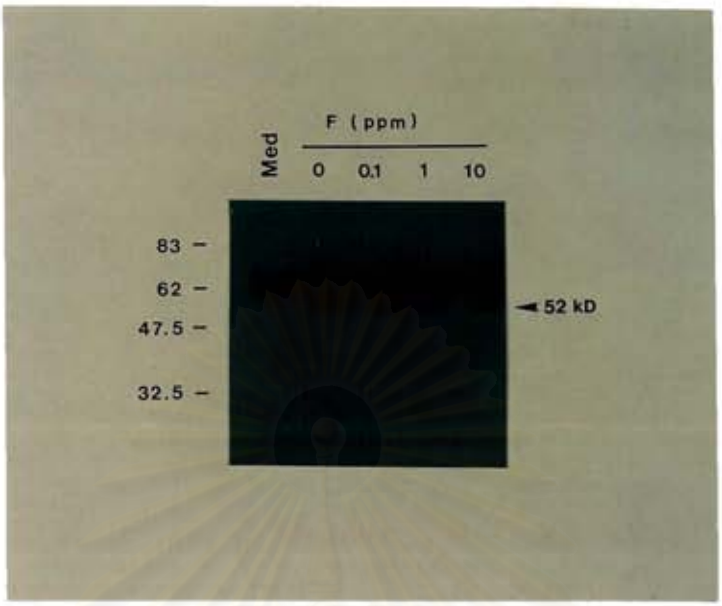
เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาแยกด้วยไฟฟ้าบนเจลาตินเจลโดยเปรียบเทียบบนจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน จากนั้นจึงนำเจลไปย้อมด้วยสีคูมาซีบริลเลียนบลู พบว่า ระดับของเอนไซม์ MMP-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกกลุ่มการทดลอง

ภาพ B เคซีนเจล ไซโมกราฟฟี แสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-3 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 เท่า โดยการเหวี่ยงที่ 7,500 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาแยกด้วยไฟฟ้าบนเจลาตินเจลโดยเปรียบเทียบบนจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน จากนั้นจึงนำเจลไปย้อมด้วยสีคูมาซีบริลเลียนบลู พบว่า ระดับของเอนไซม์ MMP-3 จะลดลงในระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 1 และ 10 พีพีเอ็ม ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ ฟลูออไรด์ 0.1 พีพีเอ็ม ไม่มีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-3

Med คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 1 ซึ่งใส่ในหลุมที่ไม่มีเซลล์ F คือ ฟลูออไรด์ ppm คือ พีพีเอ็ม ตัวเลขทางด้านบนแสดงปริมาณฟลูออไรด์ที่ใช้ในระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, และ 10 พีพีเอ็ม ตามลำดับ เครื่องหมายลูกศรชี้แสดงถึงตำแหน่งของเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72 กิโลดาลตัน (รูป A) และ 55 กิโลดาลตัน (รูป B) ตามลำดับ โดยผลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 เวสเทอร์นบลอทอนาไลซิส แสดงปริมาณของเอนไซม์ MMP-1 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 เท่า โดยการเหวี่ยงที่ 7,500 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาแยกด้วยไฟฟ้าบนอคริลามายด์เจลโดยเปรียบเทียบต่อจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน แล้วจึงถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยไฟฟ้า จากนั้นย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ MMP-1 จากนั้นจึงนำมาบ่มในน้ำยาขยายสัญญาณแบบเคมีและตรวจสอบสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ พบว่า ระดับของเอนไซม์ MMP-1 จะลดลงในระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 10 พีพีเอ็ม ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 0.1 และ 1 พีพีเอ็ม ไม่มีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-1

ตัวเลขทางซ้ายมือแสดงถึงตำแหน่งของโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล Med คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 1 ซึ่งใส่ในหลุมที่ไม่มีเซลล์ F คือ ฟลูออไรด์ ppm คือ พีพีเอ็ม ตัวเลขทางด้านบนแสดงปริมาณฟลูออไรด์ที่ใช้ในระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, และ 10 พีพีเอ็ม ตามลำดับ เครื่องหมายลูกศรชี้แสดงถึงตำแหน่งของเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52 กิโลดาลตัน โดยผลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย