จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

# การศึกษาผลของสารไดแลนตินโซเดียมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

พสุธา ธัญญะกิจไพศาล

กันยายน 2548

**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

# ทุนวิจัย

# กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

**รายงานผลงานวิจัย**

**“** การศึกษาผลของสารไดแลนตินโซเดียมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และ เนื้อเยื่อโพรงฟัน **”**

โดย

รศ. ทพ. ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล

เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบพระคุณ ศ.(พิเศษ) ทญ. ดร. วิสาขะ ลิ่มวงศ์ และ ผศ. ทญ. ดอลลี่ เมธาธราธิป ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ภาควิชาศัลยศาสตร์ และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์เพื่อการวิจัย

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|---|---|
| ชื่อโครงการวิจัย | การศึกษาผลของสารไดแลนตินโซเดียมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน |
| ชื่อผู้วิจัย | รศ. ทพ. ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล |
| ปีที่ทำวิจัยเสร็จ | มิถุนายน 2549 |

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาผลของสารไดแลนตินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน

**วัสดุและวิธีการ** เซลล์สร้างเส้นใยทดสอบด้วยสารไดแลนตินในระดับความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะปราศจากซีรัม จากนั้นวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ด้วยวิธี RT-PCR ข้อมูลที่ได้ถูกวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One way Analysis of Variance

**ผลการศึกษา** สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สารไดแลนติน ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก และสารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 5-20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ สารไดแลนติน (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

**สรุป** สารไดแลนติน ในช่วงระดับความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน ในรูปแบบที่แตกต่างกัน

**คำสำคัญ** : เซลล์สร้างเส้นใย ไดแลนติน คอลลาเจนชนิดที่ I เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 การเพิ่มจำนวนเซลล์

**Project title** Effect of dilantin sodium on cell proliferation and mRNA levels of type I collagen and MMP-1 in primary cultured gingival fibroblast, periodontal fibroblast and pulpal fibroblast.

**Name of the investigator** Associate Professor Dr. Pasutha Thunyakitpisal

**Year** June 2006

**Abstract**

**Objective :** To investigate the effect of dilantin on proliferation and mRNA levels of type I collagen and MMP-1 in primary gingival fibroblast, periodontal fibroblast and pulpal fibroblast.

**Materials and Methods :** Fibroblasts were treated with the designated concentration of dilantin in serum-free condition for 24 hr. The numbers of cell were measured by MTT assay. RT-PCR assay was used to detect the levels of collagen type I and MMP-1 mRNAs. The data were statistically analyzed by using One way Analysis of Variance.

**Results :** Dilantin, at concentration 10 and 20 μg/ml, significantly induced the proliferation of periodontal fibroblast and pulpal fibroblast ($p<0.05$). In addition, Dilantin (5 μg/ml) significantly increased the level of collagen type I mRNA in gingival fibroblasts. Dilantin (20 μg/ml) significantly decreased the level of collagen type I mRNA in periodontal and pulpal fibroblasts. Dilantin, at concentration 5-20 and 10 μg/ml, significantly upregulated the level of MMP-1 mRNA in gingival fibroblast and pulpal fibroblast, respectively. Dilantin, at concentration 20 μg/ml, significantly downregulated the level of MMP-1 mRNA in periodontal fibroblast.

**Conclusion :** Dilantin, at concentration 5-20 μg/ml, has the different, unique effects on proliferation and the level of type I collagen and MMP-1 mRNAs in gingival fibroblast, periodontal fibroblast and pulpal fibroblast.

**Key words :** fibroblasts, Dilantin, collagent type I, MMP-1, proliferation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iv |
| สารบัญ | v |
| บทนำ | 1-2 |
| การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3-8 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 9-13 |
| ผลการวิจัย | 14-15 |
| การอภิปรายผล | 16-19 |
| ข้อสรุป | 20 |
| บรรณานุกรม | 21-25 |
| รายการภาพประกอบ | |
| รูปที่ 1 | 26 |
| รูปที่ 2 | 27-28 |
| รูปที่ 3 | 29-30 |
| รูปที่ 4 | 31-32 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทนำ

ปัญหาฟันผุและโรคปริทันต์ นับเป็นปัญหาหลักทางด้านทันตสุขภาพของประชากรไทย[1] โดยโรคฟันผุก่อให้เกิดการทำลายเนื้อฟันและลุกลามถึงเนื้อเยื่อโพรงฟัน ส่วนโรคปริทันต์ก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ซึ่งประกอบไปด้วยเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน ทำให้ฟันไม่มีที่ยึดเกาะ โยก มีอาการปวดและไม่สามารถใช้งานในการบดเคี้ยวได้ ส่งผลให้ผู้ป่วยต้องถอนฟันไปในที่สุด ถึงการรักษาโรคฟันผุและโรคปริทันต์จะสามารถกำจัดสาเหตุของการเกิดโรคได้ แต่การสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทนของเนื้อฟันและอวัยวะปริทันต์ มักจะเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์หรือไม่เพียงพอกับการกลับมาทำงานอย่างปกติของฟันและอวัยวะปริทันต์[2]

โดยทั่วไปขั้นตอนการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทนประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่ต่อเนื่องกัน คือ 1) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) 2) การพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ทำงานที่สมบูรณ์ (differentiation and maturation) 3) การควบคุมการสร้างและการสลายสารเมกทริกซ์นอกเซลล์ (tissue remodeling)[3-4] โดยมีเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน ทำหน้าที่เป็นเซลล์หลักในการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนของเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อฟันตามลำดับ ซึ่งส่วนใหญ่ร้อยละ 90 เป็นโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ I[5] ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารที่มีผลในการกระตุ้นการสร้างเนื้อฟันและเอ็นยึดปริทันต์ เช่นการใช้ฮอร์โมนหรือสาร growth factor เป็นสารเฉพาะที่ (local application) ในบริเวณที่ต้องการเพื่อกระตุ้นการสร้างเนื้อฟันหรืออวัยวะปริทันต์ขึ้นมาใหม่[2] ซึ่งเป็นวัสดุที่มีราคาแพงและต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ ทำให้การนำมาใช้ในการรักษาประชาชนทั่วไปจึงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการค้นหาสารเคมีที่มีราคาถูกและมีความปลอดภัยในการใช้ เพื่อทดแทนหรือแทนที่สารฮอร์โมนหรือสาร growth factor ดูจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและเหมาะสมวิธีหนึ่ง

สารไดแลนติน เป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคลมชัก[6-8] ได้มีการรายงานถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการได้รับยาเป็นเวลานานต่อเนื่อง คือ เหงือกโตบวมหนาโดยที่การบวมโตของ

เหงือกจะกลับคืนสู่สภาพปกติเมื่อหยุดยา [9] ทำให้มีแนวความคิดนำสารไดแลนตินมาใช้เฉพาะที่ (local agent) เพื่อเร่งการหายของแผลบริเวณผิวหนัง แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก และแผลในช่องปาก[10-11] ดังนั้น สารไดแลนตินจึงเป็นสารที่น่าสนใจ ในการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาแผลในช่องปากและกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทนส่วนเนื้อเยื่อเหงือก เนื้อฟันและอวัยวะปริทันต์ ในผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในช่องปาก ฟันผุและโรคปริทันต์ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ดี ผลและกลไกของสารไดแลนตินที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่หลักในการสร้างและสลายเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน ตามลำดับ ในแง่ของการเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนหลักของเนื้อเยื่อและการสลายคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ยังไม่มีการศึกษาร่วมกันมาก่อน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นพื้นฐานในการพัฒนานำสารไดแลนตินมาประยุกต์ในทางด้านการแพทย์และทันตกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารไดแลนตินโซเดียม (Dilantin sodium, Phenytoin) [6-7]

สารไดแลนตินโซเดียม เป็นสารในกลุ่ม allantoin ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น 5,5 diphenylhydratoin สังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกโดย Biltz ในปี 1908 แต่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคลมชักในปี 1938 โดย Merritt และ Putnam [8] ปัจจุบันสารไดแลนตินจะเป็นยาที่ถูกเลือกใช้โดยทั่วไป (first hand of choice) ในการรักษาโรคลมชักในผู้ใหญ่ ซึ่งมีกลไกในการยับยั้งการผ่านเข้าออกของโซเดียมไอออนผ่านเมมเบรน (membrane-stabilizing effect ) ของเซลล์สมองส่วนสั่งทำงาน (motor cortex) [12]

ปริมาณยาไดแลนตินที่แนะนำให้ทานเพื่อรักษาโรคลมชักคือ 200-300 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งจะทำให้มีความเข้มข้นของสารไดแลนตินในซีรัมอยู่ที่ 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (therapeutic serum concentration) โดยสารจะถูกดูดซึมผ่านระบบทางเดินอาหาร จับกับโปรตีนอัลบูมินที่อยู่ในซีรัม จากนั้นเคลื่อนที่ไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะเป้าหมาย สารไดแลนตินจะถูกกำจัดโดยเอนไซม์กลุ่ม cytochrome p450 ที่ endoplasmic reticulum ของตับ

ความเป็นพิษของสารไดแลนตินขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ช่องทางการเข้าสู่ร่างกายของสาร ระยะเวลาที่ได้รับสารและปริมาณยาที่ใช้ โดยผลข้างเคียงอันแรกของการใช้ยาไดแลนตินเป็นระยะเวลานาน ที่อาจพบได้คือการบวมโตของเหงือก (ginvival enlargement) พบได้ประมาณร้อยละ 20 ซึ่งกลไกในการเกิดการบวมโตของเหงือกนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด[9] จากการศึกษาจากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยและสัตว์ทดลองที่ได้รับสารดังกล่าว พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเส้นใยคอลลาเจน[11,13-14] แต่อย่างไรก็ดีปัญหาเหงือกโตบวมนี้ สามารถแก้ไขได้ด้วยการทำความสะอาดเหงือกและดูแลสุขภาพช่องปากให้ดีโดยผู้ป่วยไม่ต้องหยุดยา

Dahllof และคณะ[15] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเกิดโรคปริทันต์และสภาพของเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยที่ได้รับสารไดแลนตินและผู้ป่วยที่ได้รับยาแก้ลมชักอื่น เพื่อรักษาโรคลมชักเป็น

ระยะเวลานาน ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับสารไดแลนตินมีการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันและการเกิดโรคปริทันต์น้อยกว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาป้องกันการชักชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Karsen และ Hellsing[16] ที่พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารไดแลนตินโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม เป็นเวลาติดต่อกันหกสัปดาห์ พบฟันที่ถูกเคลื่อนที่ด้วยการจัดฟันมีความหนาแน่นของเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อปริทันต์มากขึ้น มีความหนาของชั้น osteoid ของกระดูกเบ้าฟันมากขึ้น และพบจำนวนเซลล์สลายกระดูกน้อยกว่าฟันของหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารไดแลนติน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวได้เสนอแนะว่า สารไดแลนตินเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะไม่มีผลต่อการเกิดโรคปริทันต์และมีความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน

นอกเหนือจากการใช้รักษาโรคลมชักดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ปัจจุบันได้มีแนว ความคิดที่จะนำสารไดแลนตินมาประยุกต์ใช้ในการเร่งการหายของแผลที่บริเวณผิวหนัง, pressure sores, venous stasis, แผลในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน โดยพบว่าแผลที่ทาด้วยสารไดแลนตินมีอาการบวมและการอักเสบน้อยกว่ากลุ่มควบคุม มีการเร่งการสร้างเนื้อเยื่อซ่อมแซม และลดจำนวนแบคทีเรียบนผิวของบาดแผล โดยคาดว่าสารไดแลนตินสามารถกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากชั้นผิวหนังแท้ (dermis) ให้สร้างสาร glycosaminoglycans และคอลลาเจน[11, 13, 16-17] นอกจากนี้สารไดแลนตินยังมีผลต่อจีนอื่นๆ เช่น กระตุ้นการสร้าง keratinocyte growth factor, keratinocyte growth factor receptor และ นิวเคลียสโปรตีน NF-kB [18-19] ดังนั้นการศึกษาผลของสารไดแลนตินโซเดียมที่มีต่อการเพิ่มจำนวนและระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจน ชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ซึ่งเป็นจีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมกทริกซ์นอกเซลล์และการสร้างขึ้นมาใหม่ของเนื้อเยื่อ ในเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันจึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจในการนำสารดังกล่าวมาใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อซ่อมแซมหรือเนื้อเยื่อใหม่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์และโรคฟันผุตามลำดับ

<u>คอลลาเจนชนิดที่ I</u> [20-21]

คอลลาเจนชนิดที่ I เป็นสารอินทรีย์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่พบมากที่สุดในกระดูก เนื้อฟัน เอ็นยึดปริทันต์ เนื้อเยื่อเหงือก ผิวหนังแท้ (dermis) เอ็นกล้ามเนื้อ และพังผืด ซึ่งสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) นอกจากหน้าที่หลักเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (structural framework) แล้ว คอลลาเจนยังทำหน้าที่ในการควบคุมรูปร่างของเซลล์ การพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) และการควบคุมการทำงานของจีนต่างๆภายในเซลล์

ในระดับโมเลกุล คอลลาเจนประกอบด้วยสายโพลีเพ็บไทด์ (polypeptide) 3 สายที่พันเกลียวซึ่งกันและกัน ประกอบด้วย 2 สายของ $\alpha$1(I) [*COL1A1*] และ 1 สายของ $\alpha$ 2(I) [*COL1A2*] ซึ่งสร้างจากจีนคอลลาเจน COL1A1 ที่โครโมโซมคู่ที่ 17 และ COL1A2 ที่โครโมโซมคู่ที่ 7 ตามลำดับ โครงสร้างของโปรตีนคอลลาเจนมีลักษณะเฉพาะ ที่เรียกว่า G-X-Y domain ซึ่งจะพบเรียงซ้ำต่อกันไปตลอดสายโปรตีน โดย G คือ ไกลซีน (glycine) ส่วน X และ Y จะเป็นโพรลีน (proline) และไฮดรอกซีสโพรลีน (hydroxyproline) ตามลำดับ การที่มีไกลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เล็กที่สุด ทำให้เหมาะสมกับโครงสร้างของคอลลาเจนที่มีสายโปรตีนพันเกลียวซึ่งกันและกัน

ในโรคปริทันต์และฟันผุ พบมีการทำลายส่วนคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเอ็นยึดปริทันต์ เนื้อเยื่อเหงือก และกระดูกเบ้าฟัน รวมทั้งเนื้อฟัน ดังนั้นการใช้สารที่สามารถกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์ เนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อฟัน ให้สร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักเพิ่มมากขึ้น ย่อมทำให้ผลการรักษาคนไข้ประสบความ สำเร็จเพิ่มมากขึ้นด้วย

<u>เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1</u> (MMP-1, fibroblast collagenase, collagenase 1)

กลุ่มเอนไซม์เมทริกซ์ เมแทลโลโพรทิเนสหรือเอ็มเอ็มพี (matrix metalloproteinase ; MMP) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารเมททริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extra-cellular matrix)

ทั้งในสภาวะปกติ อาทิเช่น การปรับแต่งของเนื้อเยื่อ (remodeling) หรือสภาวะพยาธิสภาพที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อ เช่น โรคปริทันต์ โรคข้อต่ออักเสบ (arthritis) การลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น โดยกลุ่มเอนไซม์เมทริกซ์ เมแทลโลโพรทิเนสสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มเอนไซม์คอลลาจิเนส (collagenase) กลุ่มเอนไซม์เจละติเนส (gelatinase) กลุ่มเอนไซม์สโตรมิไลซิน (stromelysin) กลุ่มเมทริกไลซิน (matrilysins) และกลุ่มเมมเบรน (membrane type-MMPs) โดยเอนไซม์เหล่านี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันในของส่วนแคทาลิทิกโดเมน (conserved catalytic domain) และต้องการไอออนของสังกะสี ($Zinc^{2+}$) เพื่อการทำงาน[22] คล้ายกับเอนไซม์เอ็มเอ็มพีอื่นๆ เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ประกอบด้วยโดเมนต่างๆ ได้แก่ signal peptide, propeptide, catalytic และ hemopexin โดย signal peptide จะอยู่บริเวณ N-terminus ของสายโปรตีน มีความยาวประมาณ 18-30 กรดอะมิโน ซึ่งส่วนนี้จะถูกตัดออกระหว่างที่อยู่ในเซลล์ ก่อนหลั่งออกเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ส่วน propeptide domain จะอยู่ระหว่าง signal peptide กับ catalytic domain มีความยาวประมาณ 80 กรดอะมิโน โดยจะพบ conserved sequence คือ PRCGV/NPD ซึ่งจะมีการจัดเรียงตัวอยู่ใน active site ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) เมื่อส่วน propeptide domain ถูกตัดออก (proteolytic cleavage) จะทำให้เกิดการเรียงตัวของเอนไซม์ที่อยู่ในรูปที่พร้อมจะทำงาน [22-23]

เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 หรือเอนไซม์คอลลาจิเนส-1 สร้างโดยเซลล์สร้างเส้นใย เซลล์เคอราติน และเซลล์แม็คโครฟาสจ์ โดยมีหน้าที่หลักในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ I (ที่ตำแหน่ง $G_{775}/L_{776}$) , II, III, VI, VIII และ X รวมทั้งเจลลาติน ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ กระดูก และเนื้อฟัน โดยปกติเซลล์หรือเนื้อเยื่อจะมีระดับเอนไซม์ต่ำซึ่งแค่เพียงพอต่อการเกิด tissue remodeling เท่านั้น แต่เมื่อเกิดการอักเสบหรือพยาธิสภาพที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อ เช่น เหงือกอักเสบ โรคปริทันต์, rheumatoid arthritis จะพบระดับเอนไซม์สูงมากขึ้น โดยพบว่าสารไซโตคายด์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น IL-1 และ tumor necrosis factor-$\alpha$ สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็ม

พี-1 ได้ ในเซลล์เนื้องอกบางชนิดมีการสร้างและหลั่งเอนไซม์ในระดับที่สูงมาก ถึงแม้จะไม่มีสารไซโตไคน์มากระตุ้น [22-23]

นอกจากหน้าที่ในการย่อยเส้นใยคอลลาเจนและสารเมทริกซ์นอกเซลล์อื่นๆ แล้ว เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ยังมีหน้าที่เกี่ยวกับการหายของแผลผิวหนัง โดยช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเคอราตินเพื่อปกคลุมพื้นผิวของบาดแผล และการคงสภาพการเรียงตัวของเซลล์สร้างเคอราติน (cell directionality) [24]

การแสดงออกหรือการอ่านรหัสพันธุกรรมของจีนเอ็มเอ็มพี-1 (transcription) ถูกควบคุมด้วยนิวเคลียสโปรตีน AP-1 (Fos-Jun complex) ที่ -70, -186 และ -1602 นิวเคลียสโปรตีนตระกูล Ets family , glucocorticoid response element และ นิวเคลียสโปรตีน NF-ΚB ที่ -3030 จากจุดเริ่มต้นของการอ่านสายพันธุกรรม TATA box [25]

<u>การตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันเมื่อเกิดฟันผุและการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยในเนื้อเยื่อโพรงฟัน</u>[26]

การตอบสนองพื้นฐานเพื่อป้องกันตนเองของเนื้อเยื่อโพรงฟันเมื่อเกิดฟันผุ คือ 1. การลดความสามารถในการผ่านของสารพิษที่หลั่งจากเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อฟันและเนื้อเยื่อโพรงฟัน 2. การสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม (reparative dentin) และ 3. การตอบสนองของการอักเสบและภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยมีเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) เป็นเซลล์หลักที่รับผิดชอบในการปกป้องเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เซลล์สร้างเนื้อฟันเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์เมสเซนไคมอล (mesenchymal cell) โดยพบเรียงตัวเป็นเซลล์ชั้นเดียว รอบด้านในของเนื้อฟันที่ติดกับเนื้อเยื่อโพรงฟัน เมื่อเกิดฟันผุ เซลล์สร้างเนื้อฟันจะสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม เพื่อลดความสามารถในการผ่านของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสู่เนื้อเยื่อโพรงฟัน และเป็นการรักษาระยะห่างจากสิ่งรบกวนจากฟันผุกับเนื้อเยื่อโพรงฟัน แต่ถ้าหาก

เซลล์สร้างเนื้อฟันถูกทำลายจากสารพิษของแบคทีเรีย เซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์อันดิฟเฟอเรนซิเอเต็ดเมสเซนไคมอล (undifferentiated mesenchymal cell) ที่อยู่เนื้อเยื่อโพรงฟัน จะมีการเคลื่อนที่เข้ามาแทนที่เซลล์สร้างเนื้อฟัน เพื่อทำหน้าที่สร้างคอลลาเจน และเร่งการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม ดังนั้นเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในเนื้อเยื่อโพรงฟันจึงเป็นเซลล์ทีมีหน้าที่หลักในการสร้างเนื้อฟันขึ้นมาใหม่ในฟันที่ผุเหมือนกับเซลล์สร้างเนื้อฟัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน</u>

เซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟันจะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว[27] โดยเซลล์จะเตรียมจากเนื้อเยื่อของฟันกรามซี่ที่ 3 ของผู้ป่วยที่มารับการบริการถอนฟัน จากภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ เนื่องจากการจัดฟันหรือผ่าฟันคุด โดยฟันไม่มีการผุหรืออักเสบของเหงือก

โดยย่อคือ ฟันและเหงือกที่ติดมากับฟันที่ได้ จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อ ขูดเอ็นยึดปริทันต์จากบริเวณตอนกลางของรากฟันด้วยมีดผ่าตัด ส่วนชิ้นเนื้อของเนื้อเยื่อโพรงฟันและเหงือกจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1x1x1 มิลลิเมตร จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้แต่ละชนิดไปเลี้ยงแยกบนจานเพาะเลี้ยง (35 mm culture dish, Nunc, Denmark) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco Modified Eagle's Medium) ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ คือ ซีรัม (fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, เพนนิซิลิน-จี (penicillin-G) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดได้จาก GIBCO BRL (USA) จากนั้นเนื้อเยื่อจะถูกเลี้ยงในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เริ่มเจริญออกจากชิ้นเนื้อจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ก็จะถูกนำไปหว่าน (subculture) ในจานเพาะเลี้ยงใหม่ (60 mm culture dish, Nunc, Denmark) และนับเซลล์ที่หว่านนี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์จะถูกหว่านใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-7 โดยจะใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยอย่างน้อย 3 คน

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (Nunc, Denmark) ที่ความหนาแน่น 60,000 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากซีรัม 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่งโมง เพื่อล้างซีรัมออก แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและเติมสารไดแลนตินลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของสารไดแลนตินในซีรัมอยู่ที่ 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (therapeutic serum concentration) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์สารเอ็มทีทีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Freshney[28] เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้วัดความเป็นพิษ และ/หรือ ผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสารที่ศึกษา โดยอาศัยหลักการในการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ดีไฮโดรจิเนส ที่พบในไมโทคอนเดรีย ( mitochondrial dehydrogenase ) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของเซลล์ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีที เป็นผลึกฟอร์มาแซน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง เมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม จะสามารถนำไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาแซน (formazan) ของเซลล์ที่ทราบจำนวน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก สีม่วงของสารละลายของผลึกฟอร์มาแซนก็จะมีความเข้มข้นสูง ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งทำให้วิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้วัดสารทดสอบในแง่ของความเป็นพิษของสารและการเพิ่มจำนวนเซลล์

วิธีการศึกษาโดยย่อคือ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดลอง ในสภาวะที่มีสารไดแลนตินที่มีความเข้มข้นที่กำหนด (1-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด (DMEM without phenol red) ที่มีสารละลายเอ็มทีที (MTT) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นอาหาร

เลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่สารละลายไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาแซน (formazan) ของเซลล์ที่ทราบจำนวนดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์

ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้เซลล์จำนวน 3 หลุมในแต่ละความเข้มข้นของสารทดลอง การทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การวิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)[29]

เนื่องจากความเข้มข้นของสารไดแลนตินในกระแสเลือดที่มีผลในการรักษา (therapeutic serum concentration) มีค่าอยู่ในช่วง 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาใช้ในการศึกษาถึงผลระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอ็นไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ต่อไป

เซลล์สร้างเส้นใยจะถูกเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิเมตร เมื่อเซลล์แน่นเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยง (ร้อยละ 90) เซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ปราศจากซีรัม จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 3 ชั่วโมง จากนั้นจะทดสอบด้วยสารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้นที่พบในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับสารไดแลนตินในการรักษา และไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใย คือที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เซลล์จะถูกรวบรวมเพื่อแยกอาร์เอ็นเอต่อไป

อาร์เอ็นเอของเซลล์สร้างเส้นใย จะถูกแยกด้วยสาร TRIzol ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (Gibco BRL, USA) โดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่สาร TRIzol จากนั้นเซลล์จะถูก

รวบรวมใส่หลอดทดลอง นำไปเขย่าอย่างแรงเพื่อแยกกลุ่มโปรตีนออกจากสายอาร์เอ็นเอ และนำไปปั่นที่ความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที 30 นาที จากนั้นถ่ายชั้นสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสาร isopropanol ปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าและทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลอดทดลองจะถูกปั่นที่ความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที 30 นาที เพื่อตกตะกอนสายอาร์เอ็นเอนำรหัส ล้างสายอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยแอลกฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย UV-spectrophotometer ที่ OD 260/280 จากนั้นนำอาร์เอ็นเอ ปริมาณ 2 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองเปลี่ยนเป็น single strand cDNA โดยเอนไซน์ reverse transcriptase และขยายสัญญาณด้วยปฏิกิริยา PCR 25-30 รอบ โดยใช้ forward and reverse primers ที่ออกแบบให้สอดคล้อง (complementary) กับ cDNA ของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 โดยสัญญาณที่ได้จะแสดงถึงระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนที่สนใจ เพื่อเป็นการยืนยันว่า จำนวนอาร์เอ็นเอนำรหัสเริ่มต้นที่ใช้ในการขยายสัญญาณของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณของจีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น house keeping gene จะถูกนำมาขยายสัญญาณด้วย forward and reverse primers ที่ออกแบบให้สอดคล้อง (complementary) กับ cDNA ของจีน GADPH เพื่อเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดย PCR product จะนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (gel electrophoresis) เพื่อเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากแต่ละกลุ่มทดลอง

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

การวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารไดแลนตินกับกลุ่มควบคุม โดย

ใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจงทางเดียว (One-way Analysis of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ผลการวิจัย

## ผลการทดลอง

### สารไดแลนตินกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และ เนื้อเยื่อโพรงฟัน

เซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์ เมื่อทดสอบด้วยสารไดแลนติน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ $130.62 \pm 18.25$ และ $131.18 \pm 20.47$ ตามลำดับ ในขณะที่สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คิดเป็นร้อยละ $78.69 \pm 5.7$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่1)

เมื่อทดสอบเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟันด้วยสารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ $113.54 \pm 7.66$ และ $109.3 \pm 6.11$ ในขณะที่สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คิดเป็นร้อยละ $89.45 \pm 7.16$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่1)

ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เมื่อทดสอบด้วยสารไดแลนติน ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ $84.91 \pm 10.99$ ($p< 0.01$) และ $66.65 \pm 9.52$ ($p< 0.001$) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่1)

**สารไดแลนตินมีผลต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน**

จากการศึกษาพบว่าสารไดแลนตินมีผลต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันในรูปแบบที่แตกต่างกัน สารไดแลน-ตินที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณร้อยละ 25 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2) ในขณะที่สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณร้อยละ 15 และ 25 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3 และ 4)

**สารไดแลนตินมีผลต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน**

จากการศึกษาพบว่าสารไดแลนตินมีผลต่อการระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันในรูปแบบที่แตกต่างกัน

สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อโพรงฟัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณร้อยละ 25 และ 45 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สารไดแลนตินที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณร้อยละ 25 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

## การอภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารไดแลนตินที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยสาร MTT เพื่อวัดผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และวิธี reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อวัดผลต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนดังกล่าว

จากการวิเคราะห์ด้วยสาร MTT พบว่าสารไดแลนติน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) อย่างไรก็ดีสารไดแลนตินไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kato และคณะ และ Salo และคณะ ที่พบว่าสารไดแลนตินไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก [29-30-31] การที่สารไดแลนตินมีผลเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์นั้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Karsen และ Hellsing[16] ที่พบว่าในหนูทดลองที่ได้รับสารไดแลนตินด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เป็นเวลาติดต่อกันหกสัปดาห์ จะมีความหนาแน่นของเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อปริทันต์มากขึ้น นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก จะมีความไวต่อความเป็นพิษของสารไดแลนตินมากกว่าเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารไดแลนตินต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารไดแลนตินต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน คือ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ถึงแม้จากการศึกษาครั้งนี้ จะไม่สามารถอธิบายกลไกของสารไดแลนตินมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ แต่ได้มีการรายงานผลของสารไดแลนตินต่อการสร้าง growth factor ได้แก่ TGF-beta และ basic-fibroblast growth factor [18,33] ซึ่งสาร growth factor เหล่านี้ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า สารไดแลนตินกระตุ้นการสร้าง growth factor ดังกล่าว และส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมา (autocrine effect) ส่วนสาเหตุที่สารไดแลนตินมีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟันและเอ็นยึดปริทันต์ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือก รวมทั้งความแตกต่างของความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารไดแลนตินที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยทั้งสามชนิดนั้น อาจมีสาเหตุมาจากความจำเพาะของเซลล์ในแต่ละเนื้อเยื่อ (tissue specificity) ตัวอย่างเช่น เซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน มีความสามารถในสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนแคลเซี่ยม แต่เซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกกลับไม่มีความสามารถดังกล่าว[34] ข้ออธิบายที่อาจเป็นไปได้อีกประการหนึ่งคือ เซลล์สร้างเส้นใยเหล่านี้มีต้นกำเนิดที่แตกต่างกัน โดยเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อโพรงฟันและเอ็นยึดปริทันต์ พัฒนามาจาก neural crest cell เหมือนกัน แต่เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือกนั้น พัฒนามาจากเซลล์เมโซเดิร์ม (stomodeal mesoderm) [31-32]

ถึงแม้ผลของสารไดแลนตินต่อการสร้างอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนและเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกจะมีการรายงานโดยนักวิจัยกลุ่มอื่นแล้ว แต่กลไกที่แท้จริงนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบสารไดแลนตินสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีน NF-κB ในเซลล์สร้างเส้นใย[18] โดย NF-κB จะเป็นนิวเคลียสโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ในเซลล์เส้นเอ็น (tendon cell) และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์แม็คโครฟาส[37-38] นอกจากนี้สาร growth factor เช่น TGF-beta ที่สร้างโดยเซลล์สร้างเส้นใยที่ถูกทดสอบด้วยสารไดแลนติน สามารถเร่งการอ่านรหัส

พันธุกรรม (transcription regulation) ของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 โดยผ่านนิวเคลียสโปรตีน Ets1 อีกด้วย ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารไดแลนตินมีผลต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสต่อจีนคอลลาเจนและเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 จากโปรตีนNF-κB หรือ สาร growth factor อย่าง TGF-beta แต่อย่างไรก็ดี การทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันแนวความคิดดังกล่าว คงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการศึกษาครั้งต่อไป

เมื่อพิจารณาผลของสารไดแลนตินต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยทั้งสาม พบว่าสารไดแลนตินมีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนและจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก ( collagen ↑ MMP-1↑) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Swamy ที่พบว่าสารไดแลนตินมีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสทั้งสองจีน ในเซลล์สร้างเส้นใยจากผิวหนังแท้ (dermal fibroblast) การที่สารไดแลนตินมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์ ( collagen ↓ MMP-1 ↓) และสารไดแลนติน มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนและเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน ( collagen ↓ MMP-1↑) ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่ากลไกของสารไดแลนตินที่มีต่อระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันมีความแตกต่างกันไปของแต่ละเนื้อเยื่อ ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าเป็นประเด็นที่น่าสนใจศึกษาเพิ่มเติม ถึงกลไกที่แตกต่างกันของสารไดแลนตินในการควบคุมการอ่านรหัสพันธุกรรม (transcription regulation) ของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I และเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 โดยผ่านนิวเคลียสโปรตีน (transcription factor) ของแต่ละเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาผลของสารไดแลนตินต่อระดับโปรตีนคอลลาเจนและเอ็มไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อทั้งสาม

เพื่อเป็นข้อมูลวิทยาศาสตร์พื้นฐานในการใช้สารไดแลนตินเป็นตัวเร่งการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนในบริเวณช่องปาก โดยไม่มีผลข้างเคียงกับเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่ออื่นๆ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ข้อสรุป

สารไดแลนติน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือก

สารไดแลนตินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือก และที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สารไดแลนตินมีผลเพิ่มระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือก (5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเนื้อเยื่อโพรงฟัน (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์ (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**เอกสารอ้างอิง**


1. คณะกรรมการทันตสุขภาพแห่งชาติ, กองทันตสารธารณสุข. รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543-2544. กรุงเทพมหานคร : กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2545.
2. Quinones CR, Caffesse RG. Current status of guided periodontal tissue regeneration. Periodontol 2000. 1995;9:55-68.
3. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In : Bilezikian JP, Raisz LG, RodanGA, editors. Principle of Bone Biology 1st edition. San Diego : Academic Press,1996:69-88.
4. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. Biochem Cell Biol. 1998;76:899-910.
5. Antonio Nanci. Ten Cate's Oral Histology : Development, Structure and Function. 6th edition, St. Louis : Mosby, 2003.
6. Mutschler E, Derendorf H. Drug actions : Basic principle and therapeutic aspects. CRS Press. Tokyo 1995
7. Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's : The pharmacological basis of therapeutics. 10th edition. McGraw-Hill, New York, USA 2001.
8. Merritt HH, Putnam TJ. Sodium diphenylhydantoinate in treatment of convulsive disorders. Journal of the American Medical Association, 1938;111:1068-1073.
9. Babcock JR. Incidence of gingival hyperplasia associtated with Dilantin (sodium diphenylhydantoinate) therapy in a hospital polulation. JADA 1965;71:1447.

10. Goebel RW. Sodium diphenylhydantoin association with oral healing. J Oral Surgery 1972; 30:191-195.

11. Talas G, Brown RA, McGrouther D. Role of phenytoin in wound healing – A wound pharmacology perspective. Biochemical Pharmacology 1999;57:1085-94.

12. Yaari Y, Selzer ME, Pincus JH. Phenytoin : Mechanisms of its anticonvulsant action. Ann Neurol. 1986; 20:171-84.

13. DaCosta ML, Regan MC, al Sader M, Leader M, Bouchier-Hayes D. Diphenylhydantoin sodium promotes early and marked angiogenesis and results in increased collagen deposition and tensile strength in healing wounds. Surgery. 1998;123:287-93.

14. Habibipour S, Oswald TM, Zhang F, Joshi P, Zhou XC, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of sodium diphenylhydantoin on skin wound healing in rats. Plast Reconstr Surg. 2003;112:1620-7.

15. Dahllof G. Preber H, Eliasson S, Ryden H, Karsten J, Modeer T. Periodontal condition of epileptic adults on long-term medication with phenytoin or cabamazepine. Epilepsia, 1992;34:960-964.

16. Karsten J, Hellsing E. Effect of phenytoin on periodontal tissue exposed to orthodontic force- an experimental study in rats. British Journal of Orthodontics, 1997;24:209-215.

17. Bansal NK, Mukul Comparison of topical phenytoin with normal saline in the treatment of chronic trophic ulcers in leprosy. Int. J Dermatol. 1993;32:210-3.

18. Swamy SMK, Tan P, Zhu YZ, Lu J, Achuth HN, Moochhala S. Role of phenytoin in wound healing : microarray analysis of early transcriptional responses in human dermal fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004;314:661-6.

19. Das JD, Olsen I. Up-regulation of keratinocyte growth factor and receptor : a possible mechanism of action of phenytoin in wound healing. Biocheml and Biophy Res Commun. 2001;282:875-81.

20. John P. Bilezikian, Raisz LG, Rodan GA. Principle of bone biology, 2nd edition, San Diego, USA, Academic press. 2000.

21. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล : คอลลาเจนชนิดที่ I : การสร้างและการควบคุม. วารสารทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2544;24:145-54.

22. Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press. New York, USA 2000.

23. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as marker of tumor progression. Clinical Cancer Research. 2000;6:4823-30.

24. Pilcher BK, Sudbeck BD, Dumin JA, Welgus HG, Parks WC. Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. Arch Dermatol Res. 1998; 290(suppl) : S37-S46.

25. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis : integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. Arthritis Rev. 2002;4:157-164.

26. Okiji Takashi. Pulp as a connective tissue. In : Hargreaves KM and Goodis HE. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Quintessence Publishing Co.2002, p 95-117.

27. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล, กนกนัดดา ตะเวทีกุล, กุลวดี เหมกุญชร " สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน" วารสารทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2547,27, หน้า 47- 57

28. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3th edition. New York: Wiley-Liss, Inc., 1994.

29. Thunyakitpisal P, Chaisuparat R. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) in osteoblastic cells and HT1080 fibrosarcoma cells. J Pharmacol Sci 2004; 94:403-409.

30. Kato T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Morisaki I, Amano A. Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. J Periodontol. 2005;76:941-50.

31. Kato T, Okahashi N, Ohno T, Inaba H, Kawai S, Amano A. Effect of phenytoin on collagen accumulation by human gingival fibroblasts exposed to TNF-alpha in vitro. Oral Dis. 2006;12:156-62.

32. Salo T, Olikarinen KS, Olikarinen Al. Effect of phenotoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med 1990;19:404-7.

33. Saito K, Mori S, Iwakura M, Sakamoto S. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta, basic fibroblast growth factor and heparin sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. J Periodontal Res 1996;31:545-55.

34. Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res. 2001;36:131-41.

35. Lallier TE, Spencer A, Fowler MM. Transcript profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts. Periodontol. 2005;76:1044-55.

36. Cho M, Garant P. Development and general structure of the periodontium. Periodontology 2000. 2000; 24:1-9.

37. Tang JB, Xu Y, Ding F, Wang XT. Tendon healing in vtiro : promotion of collagen gene expression by bFGF with NF-kappaB gene activation. J Hand Surg [Am]. 2003;28:215-20.

38. Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC.2002, Role of nuclear factor-κB activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22;765-71.

39. Zhou X, Li YM, Ji WJ, Jiang TM, Sun XN,Zhu Y, Shi R. Phenytoin can accelerate the healing process after experiment myocardial infarction? Int J Cardiol. 2006;107:21-9.

40. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. Potential regulatory elements of the constitutive up-regulated α2(I) collagen gene in scelroderma dermal fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 2006;343:904-9.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

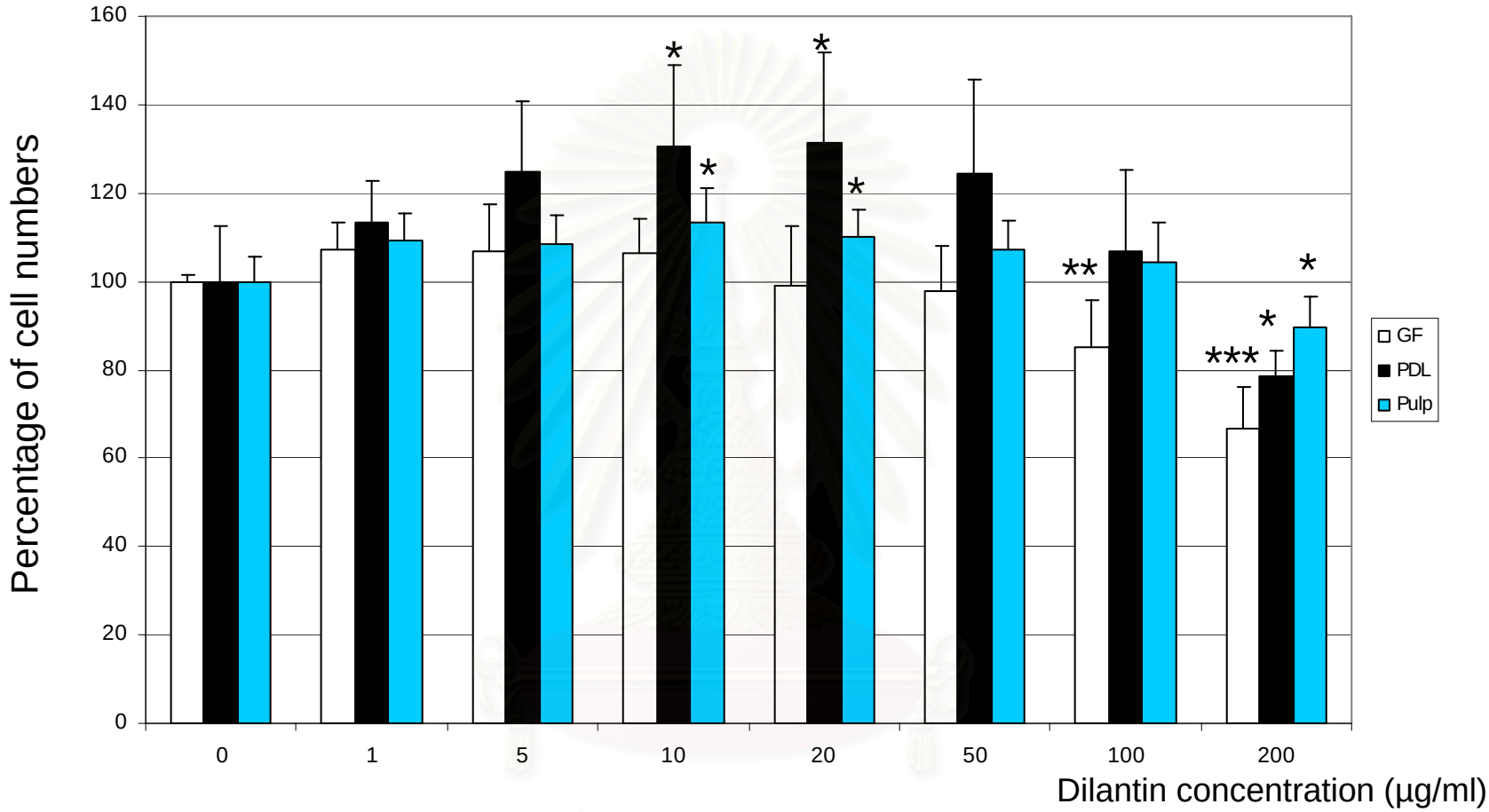


Figure 1. shows the effect of dilantin on the proliferation of primary gingival (GF), periodontal (PDL) and pulpal (Pulp) fibroblasts via the MTT assay. Cells were treated with dilantin at different protein concentrations for 24 hours.

Data showed in mean ± S.D from different three separate experiments.

(*, **, *** demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $p<0.01$ and $P<0.001$, respectively, n=9)

A.

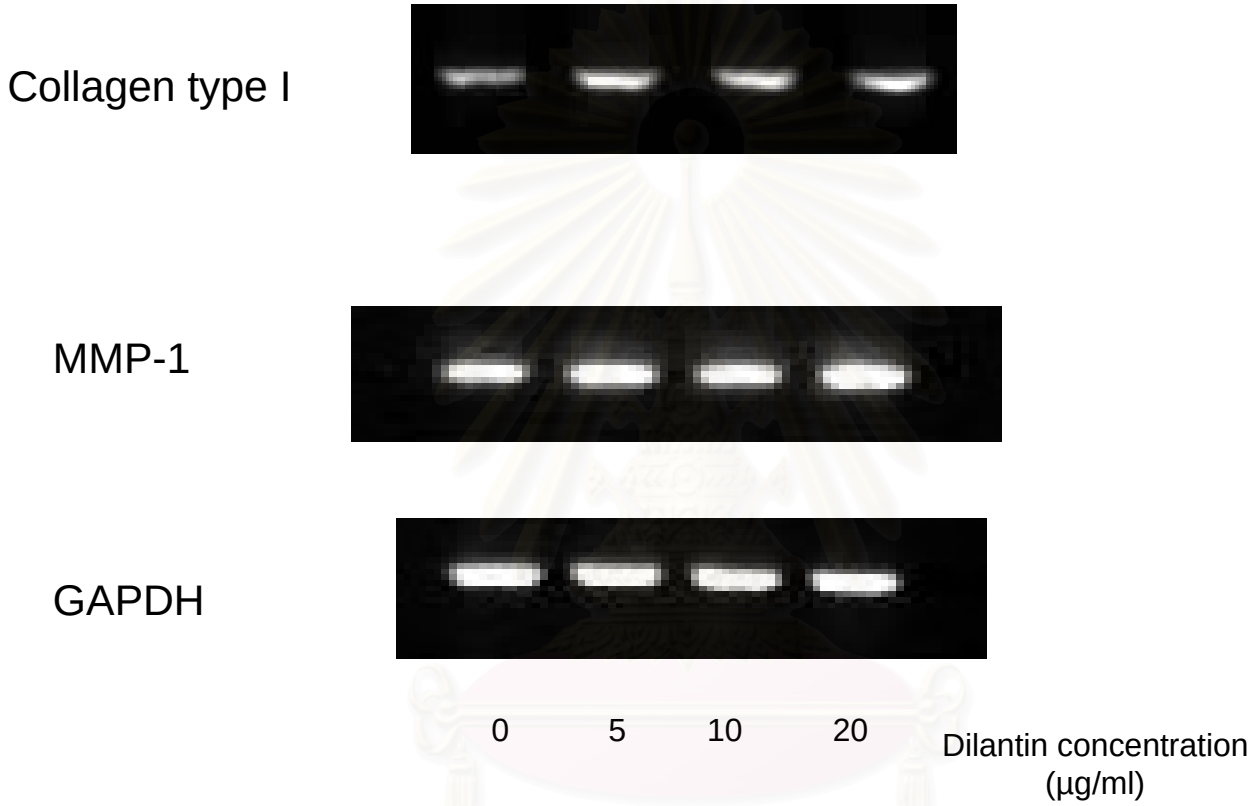


Figure 2. RT-PCR analysis of the effects of dilantin on collagen type I and MMP-1 mRNA levels in gingival fibroblasts.
A. Cells were cultured with dilantin (5, 10 and 20 µg/ml for 24 hours. GAPDH was used as an internal control.
B. Graph presents the relationship between relative ratio collagen type I and MMP-1 mRNAs expression level of treated group to untreatd control group and the concentrations of dilantin. Data are depicted as mean ± S.D. The data are representative of at least three separate experiments. * significantly different from the control group $P<0.05$.

B.

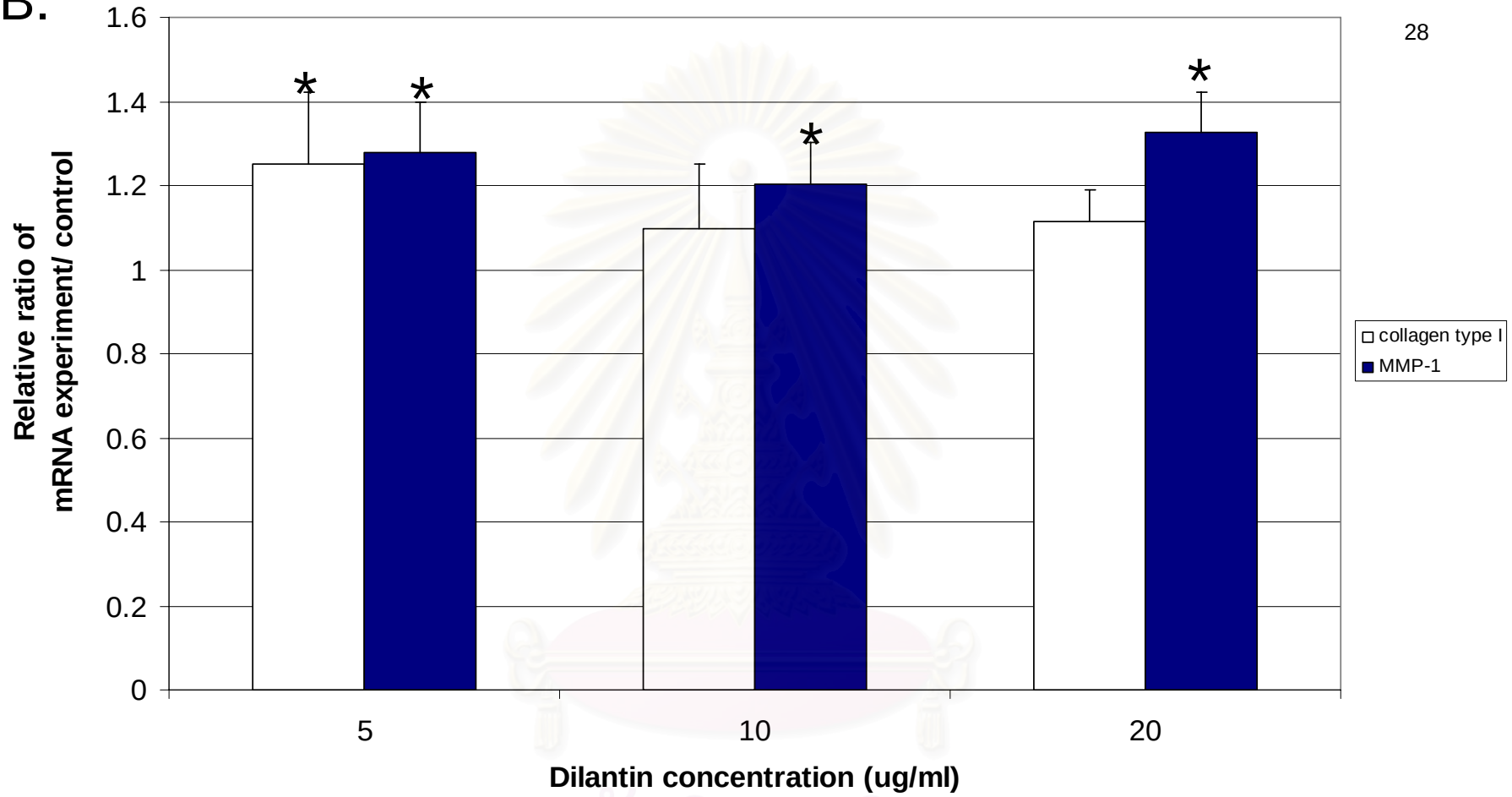


Figure 2. RT-PCR analysis of the effects of dilantin on collagen type I and MMP-1 mRNA levels in the gingival fibroblasts.

A. Cells were cultured with dilantin (5, 10 and 20 µg/ml for 24 hours. GAPDH was used as an internal control.

B. Graph presents the relationship between relative ratio collagen type I and MMP-1 mRNAs expression level of treated group to untreatd control group and the concentrations of dilantin. Data are depicted as mean ± S.D. The data are representative of at least three separate experiments. * significantly different from the control group $P<0.05$.

A.

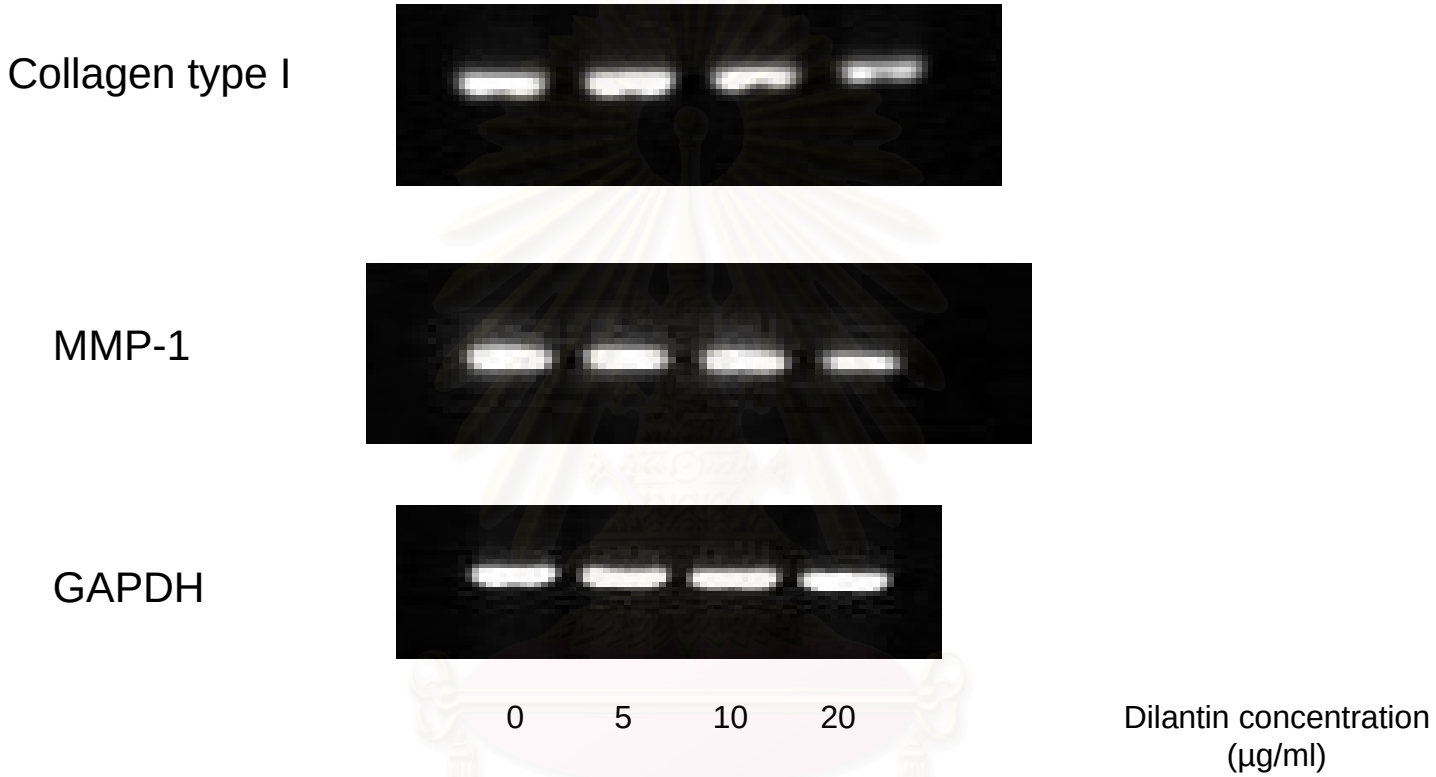


Figure 3. RT-PCR analysis of the effects of dilantin on collagen type I and MMP-1 mRNA levels in the periodontal fibroblasts.
A. Cells were cultured with dilantin (5, 10 and 20 µg/ml for 24 hours. GAPDH was used as an internal control.
B. Graph presents the relationship between relative ratio collagen type I and MMP-1 mRNAs expression level of treated group to untreatd control group and the concentrations of dilantin. Data are depicted as mean ± S.D. The data are representative of at least three separate experiments. * significantly different from the control group $P<0.05$.

**B.**

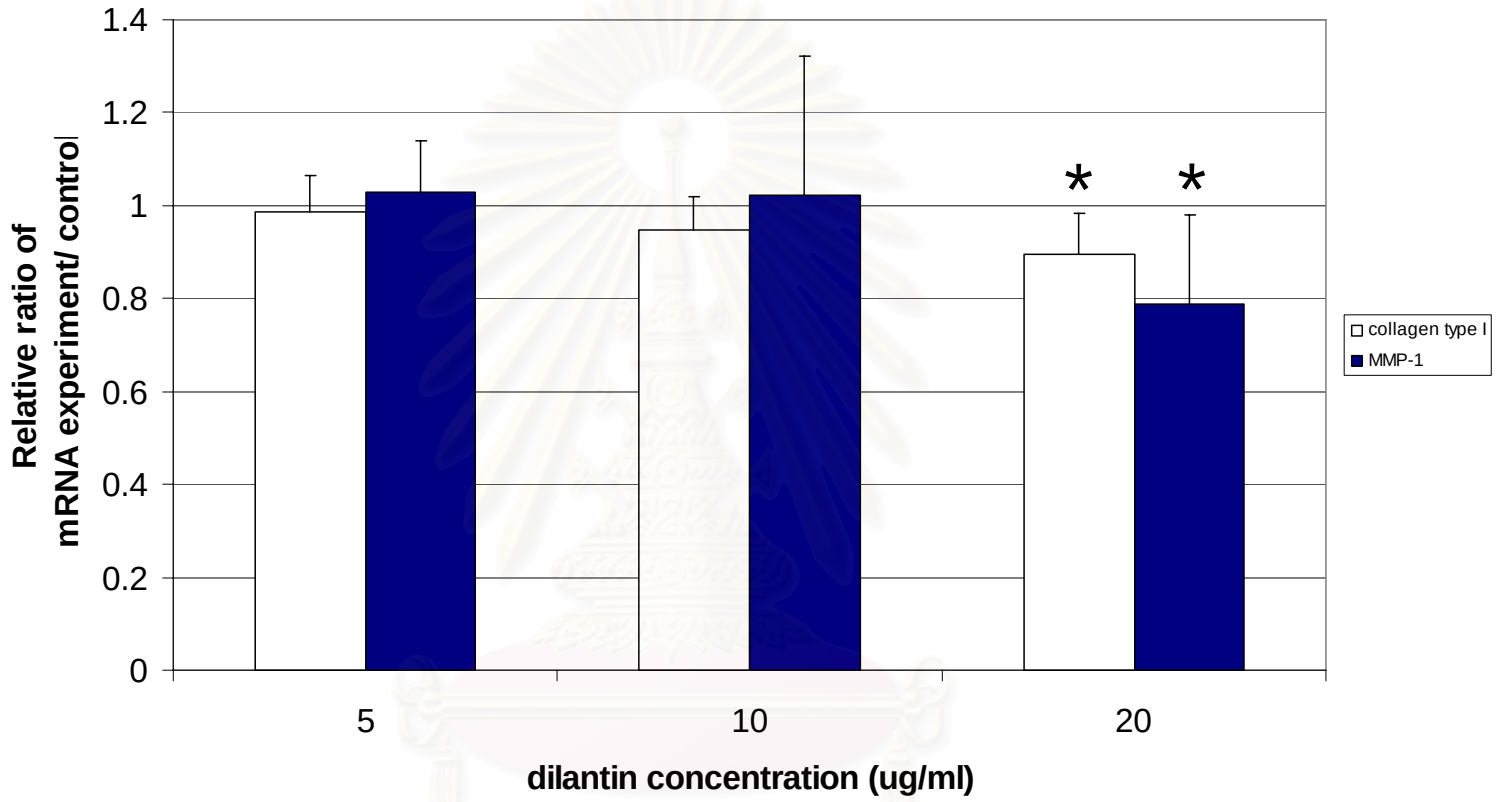


Figure 3. RT-PCR analysis of the effects of dilantin on collagen type I and MMP-1 mRNA levels in the periodontal fibroblasts.
A. Cells were cultured with dilantin (5, 10 and 20 µg/ml for 24 hours. GAPDH was used as an internal control.
B. Graph presents the relationship between relative ratio collagen type I and MMP-1 mRNAs expression level of treated group to untreatd control group and the concentrations of dilantin. Data are depicted as mean ± S.D. The data are representative of at least three separate experiments. * significantly different from the control group $P<0.05$.

A.

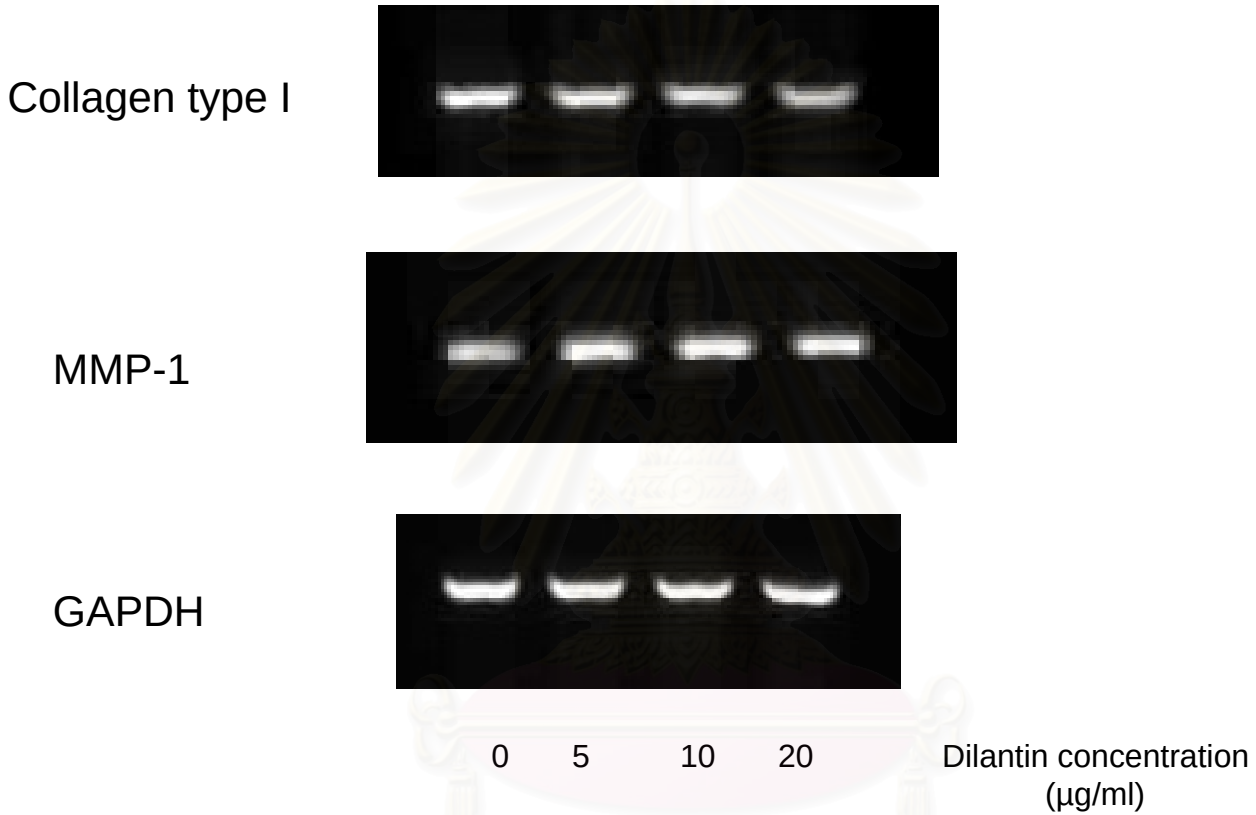


Figure 4. RT-PCR analysis of the effects of dilantin on collagen type I and MMP-1 mRNA levels in the pulpal fibroblasts.
A. Cells were cultured with dilantin (5, 10 and 20 µg/ml for 24 hours. GAPDH was used as an internal control.
B. Graph presents the relationship between relative ratio collagen type I and MMP-1 mRNAs expression level of treated group to untreatd control group and the concentrations of dilantin. Data are depicted as mean ± S.D. The data are representative of at least three separate experiments. * significantly different from the control group $P<0.05$.

**B.**

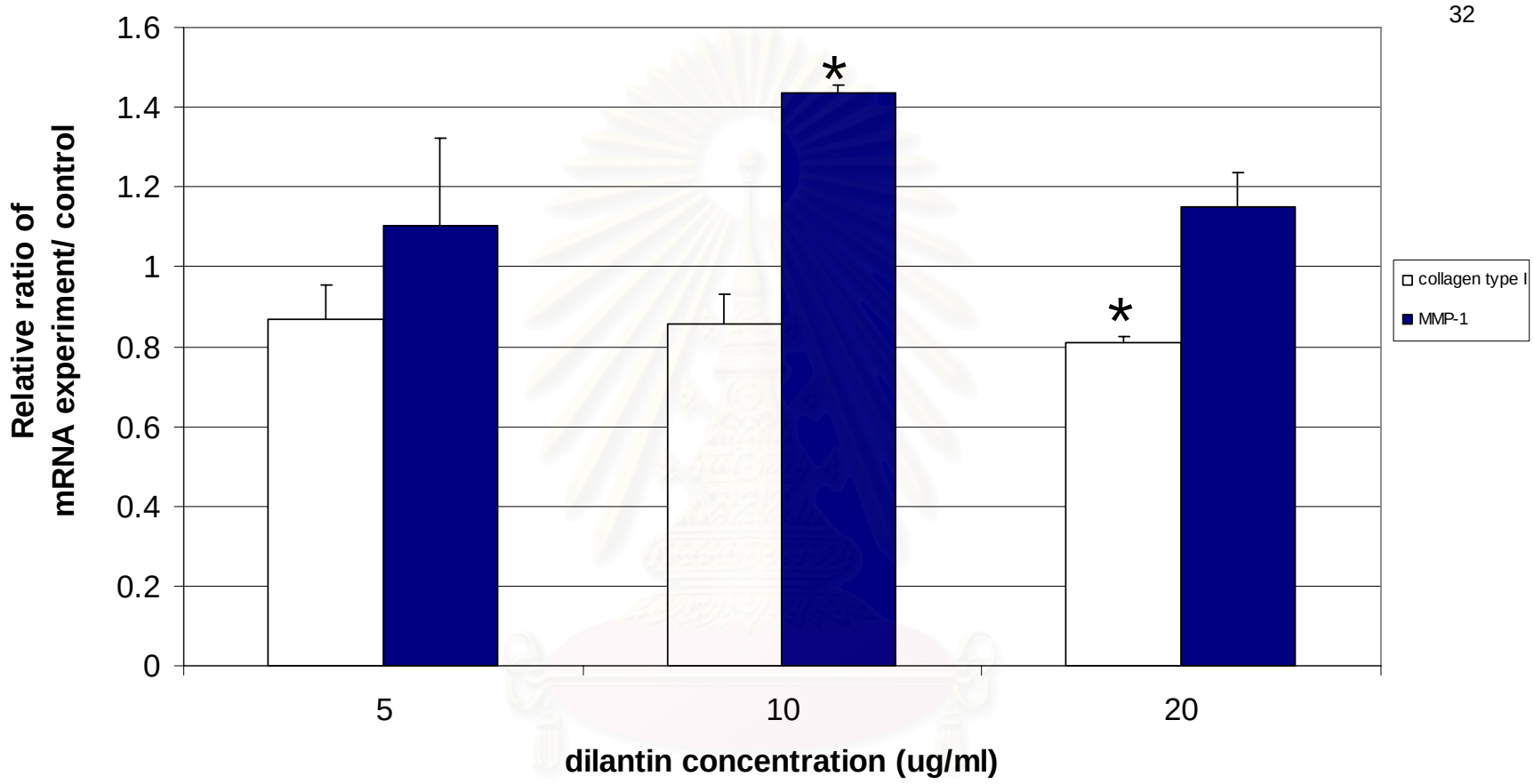


Figure 4. RT-PCR analysis of the effects of dilantin on collagen type I and MMP-1 mRNA levels in the pulpal fibroblasts.
A. Cells were cultured with dilantin (5, 10 and 20 µg/ml for 24 hours. GAPDH was used as an internal control.
B. Graph presents the relationship between relative ratio collagen type I and MMP-1 mRNAs expression level of treated group to untreatd control group and the concentrations of dilantin. Data are depicted as mean ± S.D. The data are representative of at least three separate experiments. * significantly different from the control group $P<0.05$.