ผลร่วมระหว่างฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟหรือพีดีจีเอฟ ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากโพรงฟันของมนุษย์

นายกฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก
หลักสูตรชีววิทยาช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0699-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20445180

COMBINATION EFFECTS BETWEEN FLUORIDE AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR/PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS *IN VITRO*

Mr. Kritchai Bespinyowong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences in Oral Biology

Program of Oral Biology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic year 2001

ISBN 974-03-0699-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลร่วมระหว่างฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟหรือพีดีจีเอฟที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากโพรงฟันของมนุษย์
โดย	นายกฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์
สาขาวิชา	ชีววิทยาช่องปาก
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สุรสิทธิ์ เกียรติพงษ์สาร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.รัตน์ เสรีนิราช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สุนทรา พันธ์มีเกียรติ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.พสุธา ธัญญะกิจไพศาล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุภัทรา อมาตยกุล)

กฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์ : ผลร่วมระหว่างฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟหรือพีดีจีเอฟที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากโพรงฟันของมนุษย์ (COMBINATION EFFECTS BETWEEN FLUORIDE AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR/PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS *IN VITRO*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ทพ. ดร.ประสิทธิ์ ภาสันต์ ; 58 หน้า. ISBN 974-03-0699-3

งานวิจัยในครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ทั้งในแง่ของการกระตุ้นอัตราการเจริญและการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกติน เซลล์โพรงฟันของมนุษย์เตรียมจากเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0 ถึง 10 ส่วนในหนึ่งล้านส่วนของ ฟลูออไรด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฟลูออไรด์สามารถกระตุ้นอัตราการเจริญและการสร้างไฟโบรเนกตินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสนับสนุนถึงบทบาทของฟลูออไรด์ที่มีต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน ในการทดลองส่วนที่สองเป็นการศึกษาผลร่วมระหว่างฟลูออไรด์และโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้งสองชนิดคือเบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟ ซึ่งต่างก็เป็นโกร๊ทแฟคเตอร์ที่มีบทบาทในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในร่างกาย โดยจะทดสอบในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ในแง่ของการกระตุ้นการเจริญและการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกตินด้วยเช่นเดียวกัน เซลล์ที่ได้จะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ส่วนในหนึ่งล้านส่วนของฟลูออไรด์ร่วมกับโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้งสองชนิดเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเท่ากัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อให้โกร๊ทแฟคเตอร์ร่วมกับฟลูออไรด์พบว่ามีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นมากกว่าการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์เพียงอย่างเดียว การกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับพีดีจีเอฟพบว่าเซลล์จะมีการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่การกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟกลับลดการสร้างไฟโบรเนกตินลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้งสองชนิดมีอิทธิพลต่อการตอบสนองของเซลล์โพรงฟันที่มีต่อฟลูออไรด์และฟลูออไรด์น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน

หลักสูตรชีววิทยาช่องปาก
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

KRITCHAI BESPINYOWONG : COMBINATION EFFECTS BETWEEN FLUORIDE AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR/PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS *IN VITRO.* THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRASIT PAVASANT, Ph.D. ; 58 pp. ISBN 974-03-0699-3

The aim of this study is to investigate the effects of fluoride on cell proliferation and fibronectin synthesis in cultured human pulpal fibroblasts. Human pulpal fibroblasts were prepared from the explants of pulp tissue obtained from extracted third molars. Cells were treated with sodium fluoride at various concentration ranging from 0 to 10 ppm of fluoride for 48 hours. The results showed that fluoride can stimulate cell proliferation and fibronectin synthesis. The results indicate the function of fluoride in the healing process of pulpal tissue. Since basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet derived growth factor (PDGF) are also play role in the healing process of soft tissue *in vivo*, the second part of this experiment is to investigate combination effects between fluoride and bFGF/PDGF on cell proliferation and fibronectin synthesis in cultured human pulpal fibroblasts. Cells were treated with 1 ppm of sodium fluoride for 48 hours with or without growth factors. In the present of growth factors, the effect of fluoride on cell proliferation was increased higher than treated with fluoride alone. Combination of PDGF and fluoride also upregulate fibronectin synthesis in the similar fashion. However, in the present of bFGF and fluoride, the amount of fibronectin was obviously decreased. These results indicate that both growth factors can influence the effects of fluoride on pulpal cells. In addition, fluoride may play an important role in the healing process of pulpal tissue.

Pragram of Oral Biology

Field of study Oral Biology Student's signature.....

Academic year 2001 Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหน่วยงานหลายๆฝ่ายและคณาจารย์หลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆที่มีคุณค่า และตรวจทานแก้ไข จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.รัตน์ เสรีนิราช, รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สุนทรา พันธ์มีเกียรติ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.พสุธา ธัญญะกิจไพศาล และอาจารย์ ดร.สุภัทรา อมาตยกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์, ภาควิชาสรีรวิทยา, ภาควิชารังสีวิทยา และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่และการดำเนินงานในส่วนของการปฏิบัติการเป็นอย่างดี ขอขอบคุณภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากที่ได้กรุณาจัดเก็บเนื้อเยื่อสำหรับงานวิจัย และเจ้าหน้าที่ห้องสมุดที่ช่วยเหลือในการค้นคว้าข้อมูล ตลอดจนผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้กล่าวในที่นี้

ขอขอบคุณฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาและครอบครัวของผู้วิจัย ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

ประโยชน์และความดีใดๆที่พึงได้รับจากวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1 **บทนำ**..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 สมมติฐานการวิจัย..... 9

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 9

1.4 ขอบเขตการของวิจัย..... 9

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น..... 10

1.6 คำสำคัญ..... 10

1.7 รูปแบบการวิจัย..... 10

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 10

2 **ระเบียบวิธีวิจัย**..... 11

2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง..... 11

2.2 วัสดุที่ใช้ในการวิจัย..... 12

2.3 อุปกรณ์การทดลองที่ใช้ในการวิจัย..... 13

2.4 วิธีการทดลอง..... 14

2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์โพรงฟัน..... 15

2.4.2 การทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน..... 16

2.4.3 การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์, เบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ..... 17

2.4.4 การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ..... 19

2.5 การคำนวณผลทางสถิติ..... 19

หน้า

3 ผลการทดลอง..... 20
3.1 การทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน..... 20
3.2 การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์, เบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ..... 21
3.2.1 ผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์..... 21
3.2.2 ผลต่อการสร้างไฟโบรเนกติน..... 24
3.3 การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ..... 28
3.3.1 ผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์..... 28
3.3.2 ผลต่อการสร้างไฟโบรเนกติน..... 30
4 อภิปรายผลการทดลอง ข้อเสนอแนะ และสรุปผลการทดลอง..... 34
4.1 อภิปรายผลการทดลอง..... 34
4.2 สรุปผลการทดลอง..... 39
4.3 ข้อเสนอแนะ..... 40
รายการอ้างอิง..... 42
ภาคผนวก..... 49
ภาคผนวก ก..... 50
ภาคผนวก ข..... 53
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 58

สารบัญภาพ

หน้า

บทที่ 1

รูปที่ 1.1 โครงสร้างและหน้าที่ของเบสิค-เอฟจีเอฟ..... 6

บทที่ 3

รูปที่ 3.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีในสภาวะที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50 และ 100 พีพีเอ็ม โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 21

รูปที่ 3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีในสภาวะที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็ม โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 22

รูปที่ 3.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีในสภาวะที่มีเบสิค-เอฟจีเอฟ ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 23

รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีในสภาวะที่มีพีดีจีเอฟ ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 24

รูปที่ 3.5 (บน) ภาพจากฟิล์มแสดงแถบสีดำของโปรตินไฟโบรเนกตินจากการทำเวสเทิร์นบลอทเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็ม (ล่าง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่วัดค่าได้จากเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ ในสภาวะที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็ม โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 25

หน้า

รูปที่ 3.6 (บน) ภาพจากฟิล์มแสดงแถบสีดำของโปรตีนไฟโบรเนกตินจากการทำเวสเทิร์นบลอท เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ล่าง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่วัดค่าได้จากเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ในสภาวะที่มีเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 26

รูปที่ 3.7 (บน) ภาพจากฟิล์มแสดงแถบสีดำของโปรตีนไฟโบรเนกตินจากการทำเวสเทิร์นบลอท เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ล่าง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่วัดค่าได้จากเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ในสภาวะที่มีพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 27

รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีในสภาวะที่ไม่มีฟลูออไรด์, มีฟลูออไรด์ 1 พีพีเอ็มและมีฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 29

รูปที่ 3.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีในสภาวะที่ไม่มีฟลูออไรด์, มีฟลูออไรด์ 1 พีพีเอ็มและมีฟลูออไรด์ร่วมกับพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 30

หน้า

รูปที่ 3.10 (บน) ภาพจากฟิล์มแสดงแถบสีดำของโปรตีนไฟโบรเนกตินจากการทำเวสเทิร์นบลอท เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีฟลูออไรด์, มีฟลูออไรด์ 1 พีพีเอ็มและมีฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ล่าง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่วัดค่าได้จากเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ในสภาวะที่ไม่มีฟลูออไรด์, มีฟลูออไรด์ 1 พีพีเอ็มและมีฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 31

รูปที่ 3.11 (บน) ภาพจากฟิล์มแสดงแถบสีดำของโปรตีนไฟโบรเนกตินจากการทำเวสเทิร์นบลอท เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีฟลูออไรด์, มีฟลูออไรด์ 1 พีพีเอ็มและมีฟลูออไรด์ร่วมกับพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ล่าง) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่วัดค่าได้จากเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ในสภาวะที่ไม่มีฟลูออไรด์, มีฟลูออไรด์ 1 พีพีเอ็มและมีฟลูออไรด์ร่วมกับพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 100..... 32