ว ทันต จุฬาฯ 2551;31:19-32
CU Dent J. 2008;31:19-32

บทวิทยาการ
Original Article

การตอบสนองของสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ที่มีต่อออสทิโอพอนทินและคอลลาเจนจากผิวหนังวัวเมื่อศึกษาด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์

ปภาตพงศ์ ศิริคุรุรัตน์ ท.บ.[1]
สุพจน์ ตามสายลม ท.บ., วท.ม. (ปริทันตศาสตร์), อ.ท. (ปริทันตวิทยา)[2]
Pi-Ling Chang Ph.D.[3]
สมพร สวัสดิสรรพ์ ท.บ., Ph.D.[4]

[1]นิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]Department of Nutrition Sciences, University of Alabama at Birmingham, USA
[4]ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลการตอบสนองของสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ต่อออสทิโอพอนทินและคอลลาเจนในแง่ของการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ และการยึดเกาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ ทำการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ร่วมกับคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังวัวและรีคอมบิแนนท์ออสทิโอพอนทินของหนู จากนั้นศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีสอบวิเคราะห์เอ็มทีทีในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงให้สัมผัสกับพื้นผิว 4 สภาวะ ได้แก่ พื้นผิวที่ไม่ได้รับการฉาบสารละลายใด ๆ พื้นผิวที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจน ด้วยสารละลายออสทิโอพอนทิน และด้วยสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน และศึกษาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ทั้ง 4 สภาวะ

ผลการศึกษา สารละลายคอลลาเจนและสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทินกระตุ้นการเพิ่มจำนวนสโตรมัลเซลล์ โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 106.52 ± 4.08 และ 114.78 ± 6.82 ตามลำดับ แต่สารละลายออสทิโอพอนทินมีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงเหลือร้อยละ 53.48 ± 12.20 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน เซลล์มีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี ในขณะที่กลุ่มที่ฉาบด้วยด้วยสารละลายคอลลาเจนสารละลายออสทิโอพอนทิน พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะดี แต่แผ่ตัวน้อยกว่าใน 2 กลุ่มแรก

สรุป สารละลายคอลลาเจนมีการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการยึดเกาะของสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ได้ดี โดยสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทินให้ผลดีที่สุด ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนและออสทิโอพอนทินให้ผลดีต่อสโตรมัลเซลล์ และอาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้เพื่อทำให้เกิดการงอกใหม่ของแผลกระดูก

(ว ทันต จุฬาฯ 2551;31:19-32)

คำสำคัญ: *การยึดเกาะของเซลล์; คอลลาเจน; สโตรมัลเซลล์จากไขกระดูก; ออสทิโอพอนทิน;*

บทนำ

การทำให้เกิดการงอกใหม่ของแผลกระดูก (bone regeneration) เป็นกระบวนการหายของแผลกระดูก ซึ่งอาจเป็นการหายตามปกติด้วยเซลล์ของผู้ป่วยเอง หรือมีการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ขึ้น (guided bone regeneration) ทดแทนกระดูกที่สูญเสียไป อันเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การบาดเจ็บจากภยันตราย (traumatic injury) โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) ความผิดปกติแต่กำเนิด (congenital defects) เป็นต้น เนื้อเยื่อกระดูกที่สร้างใหม่นี้ต้องมีลักษณะทางกายภาพและชีวภาพเหมือนปกติ และสามารถใช้งานได้ การทำให้เกิดการงอกใหม่ของแผลกระดูกเป็นกระบวนการที่มีการพัฒนาและนำมาใช้ในทางคลินิกอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นการใช้กระดูกปลูกถ่ายจากตนเอง (autograft) กระดูกปลูกถ่ายจากผู้อื่น (allografts) กระดูกปลูกถ่ายจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (xenografts) หรือสารทดแทนกระดูกที่สังเคราะห์ขึ้น (alloplasts)[1] กระดูกและสารทดแทนกระดูกเหล่านี้ ทำหน้าที่หลัก คือ เป็นโครงค้ำยัน (scaffold) ให้เซลล์ต้นกำเนิดภายในช่องไขกระดูก หรือสโตรมัลสเต็มเซลล์ (bone marrow stromal stem cell) เกิดการเคลื่อนที่ ยึดเกาะ และพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast)ได้ อย่างไรก็ตามการใช้กระดูกปลูกถ่ายและสารทดแทนกระดูกเหล่านี้มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป เช่น ในกรณีมีการปลูกถ่ายกระดูกด้วยกระดูกตนเอง ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวดมากขึ้นหลังการผ่าตัดทั้งจากตำแหน่งที่ตัดกระดูกออก (donor site) และตำแหน่งที่ปลูกกระดูก (recipient site) ในกรณีที่เป็นการปลูกถ่ายกระดูกจากผู้อื่นหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น อาจทำให้เกิดการกระตุ้นภาวะการอักเสบ ถ่ายทอดโรคติดเชื้อ และในบางครั้งอาจพบมีการสร้างไฟบรัสแคปซูล (fibrous capsule) มาห่อหุ้มกระดูกเหล่านั้น[2-4] ในปัจจุบัน วิทยาการใหม่ในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ คือ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ซึ่งเป็นวิธีการที่ผสานหลักการทางวิศวกรรมเข้ากับวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เพื่อให้ได้มาซึ่งสิ่งทดแทนทางชีวภาพ ที่ช่วยในการดำรง ซ่อมแซม และปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ วิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องการปัจจัยสำคัญ 3 ประการ ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) สัญญาณการกระตุ้น (morphogenic signals) และโครงค้ำยัน[5]

ปัจจัยแรก คือ เซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งสามารถแยกจากไขกระดูก (bone marrow) โดยภายในช่องไขกระดูก ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดที่เป็นแหล่งกำเนิดของเซลล์ที่จะพัฒนาไปทำหน้าที่ต่างๆ กัน เช่น เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary osteoblasts) เม็ดเลือดแดง เซลล์ไขมัน (adipocytes) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune cells) และที่สำคัญ คือ เซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์หลายชนิด[6-8] ปัจจัยที่สอง คือ สัญญาณการกระตุ้น มีการนำสารจำพวกโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) เช่น โบนมอร์โฟจีนีทิกโปรตีน (bone morphogenetic protein)[9] หรือเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix)[10] เช่น คอลลาเจน (collagen)[11,12] คอนดรอยทินซัลเฟต (chondroitin sulphate)[13-15] เฮพาแรนซัลเฟต (heparan sulphate)[14,15] และออสทิโอพอนทิน (osteopontin)[16] ซึ่งจัดเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นพัฒนาการของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิ[17-19] มาเป็นองค์ประกอบร่วมในโครงค้ำยันเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของชีววัสดุเหล่านั้น[20] ในส่วนของปัจจัยที่สาม หรือโครงค้ำยันนั้น ได้มีการนำสารหลายชนิดที่ได้จากธรรมชาติมาสร้างเป็นโครงค้ำยัน เช่น ไคโตซาน (chitosan) อัลจิเนต (alginate) และไกลโคซามิโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycans) แต่ที่มีความสำคัญ คือ โครงค้ำยันที่สร้างจากคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และเป็นองค์ประกอบสำคัญในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดของร่างกาย

รวมทั้งเป็นเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อกระดูก[21] ในทางการแพทย์และทันตกรรม พบว่ามีการนำคอลลาเจนมาใช้อย่างแพร่หลายมานานกว่า 40 ปี ในหลายรูปแบบ เช่น แบบคล้ายฟองน้ำ (sponge-like appearance) หรือแบบแผ่น (sheet) เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีในการห้ามเลือดบริเวณบาดแผลผ่าตัด[22,23] เกิดปฏิกิริยาการแพ้หรือปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมต่ำ[24] กระตุ้นการหายของบาดแผล และสามารถละลายตัวได้[25]

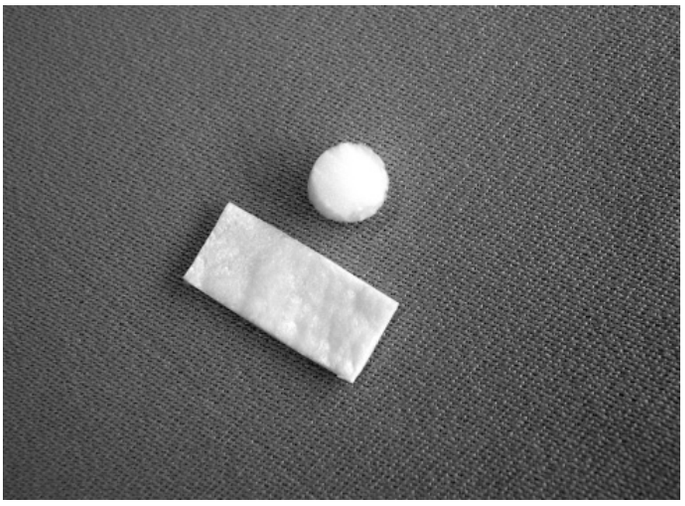
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการตอบสนองของสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ต่อออสทิโอพอนทินและคอลลาเจน ในแง่ของการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ และการยึดเกาะของเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางในการนำออสทิโอพอนทินและคอลลาเจนมาช่วยในการชักนำให้เกิดการหายของแผลด้วยวิธีวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางทันตกรรม

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาปฏิกิริยาของสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ต่อโปรตีนออสทิโอพอนทินและคอลลาเจน โดยเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษานี้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ และใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) ศึกษาลักษณะของเซลล์และการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิวที่ฉาบด้วยสารละลายออสทิโอพอนทินและคอลลาเจน การวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ จธ. 64/2550

การเตรียมคอลลาเจน

คอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเตรียมจากผิวหนังวัว (bovine skin) ด้วยวิธีการละลายในกรด[26] กระทำโดยนำผิวหนังวัวมาล้างให้สะอาด แยกชั้นไขมันและสิ่งสกปรกออก ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และใส่ในกรดแอซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปั่นหมุนให้เข้ากัน (stirring) ประมาณ 48 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) (6K15, Sigma, USA) ด้วยความเร็ว 11,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนลอย (supernatant) มาตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 1 คืน นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้ง ด้วยความเร็ว 11,200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนตะกอนมาละลายด้วยกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายคอลลาเจนใส่ในแบบพิมพ์และอบแห้งเยือกแข็ง (lyophilization) (Flexi-Dry MP, USA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คอลลาเจนที่ได้ มีลักษณะเป็นกลุ่มเส้นใยละเอียดสีขาวคล้ายฟองน้ำ (รูปที่ 1) ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในการศึกษานำมาละลายด้วยกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ได้สารละลายคอลลาเจนความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 1 แสดงลักษณะคล้ายฟองน้ำสีขาวของคอลลาเจนที่เตรียมได้จากผิวหนังวัว

Fig. 1 demonstrates the white sponge-like collagen prepared from bovine skin.

การเตรียมออสทิโอพอนทิน

ออสทิโอพอนทินที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนของออสทิโอพอนทินของหนู (recombinant rat osteopontin) ซึ่งอยู่ในลักษณะที่เป็นของแข็งสีขาว (lyophilized form) เมื่อนำมาใช้ในการศึกษา นำมาละลายในอัลฟาเอ็มอีเอ็ม (αMEM, Minimum Essential Medium Alpha, Gibco BRL, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายออสทิโอพอนทิน 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการศึกษานำร่องพบว่าเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ สารละลายออสทิโอพอนทินนี้ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าถึงเวลานำมาใช้ในการศึกษา

การเตรียมและเพาะเลี้ยงสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์

ตัวอย่างชิ้นกระดูกนำมาจากผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป จำนวน 3 ราย ที่ได้รับการผ่าตัดปุ่มกระดูกเพดานปาก (torus palatinus) เพื่อเตรียมช่องปากก่อนใส่ฟันเทียม ผู้ป่วยต้องไม่ได้รับยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) หรือยาปฏิชีวนะภายในระยะเวลา 3 เดือนก่อนการผ่าตัด และไม่อยู่ระหว่างการตั้งครรภ์ ก่อนการเก็บตัวอย่างกระดูก ผู้ป่วยจะได้รับทราบถึงข้อมูลที่จำเป็นเกี่ยวกับงานวิจัย และลงชื่อในใบยินยอมโดยความสมัครใจ

ชิ้นกระดูกที่ได้ นำมาล้างด้วยอัลฟาเอ็มอีเอ็มหลายครั้งก่อนที่จะตัดด้วยคีมตัดกระดูกให้เป็นชิ้นเล็กประมาณ 1-2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วางชิ้นกระดูกเหล่านี้ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร (Falcon, USA) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ท่วมชิ้นกระดูกเหล่านั้น ซึ่งในอาหารเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย อัลฟาเอ็มอีเอ็ม ฟีทัลโบไวน์ซีรัม (fetal bovine serum) ร้อยละ 10 สารละลายปฏิชีวนะและต้านเชื้อรา (antibiotic-antimycotic solution) ร้อยละ 1 แอลกลูตามีน (L-glutamine) ร้อยละ 1 และเติมสารกระตุ้นการสร้างกระดูก (osteogenic inducer) ซึ่งประกอบด้วย เบตากลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate) 10 มิลลิโมลาร์ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เดกซะเมธาโซน (dexamethasone) 100 นาโนโมลาร์[27,28]

เก็บจานเพาะเลี้ยงที่มีชิ้นกระดูกเหล่านี้ไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยง (TC2323, Shel Lab, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ศึกษาลักษณะและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกที่เพาะเลี้ยงทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ (inverted phase contrast microscope) ประมาณสัปดาห์ที่ 2 พบว่าเริ่มมีเซลล์เจริญเติบโตออกจากชิ้นกระดูก เมื่อเซลล์หนาแน่นแล้วจะทำการซับคัลเจอร์ (subculture) ด้วยสารละลายทริปซินอีดีทีเอ (trypsin-EDTA, Gibco BRL, USA) ในการศึกษานี้ใช้สโตรมัลเซลล์ในรุ่นที่ 5 ของการทำซับคัลเจอร์ เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ส่วนหนึ่งได้นำไปย้อมอลิซารินเรด (alizarin red) เพื่อยืนยันชนิดของเซลล์ที่พัฒนาจากสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูก

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีสอบวิเคราะห์เอ็มทีที

วิธีการวิเคราะห์นี้ ดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann[29] และ Kasugai และคณะ[30] โดยวัดจากปฏิกิริยาของสารเอ็มทีที (MTT; (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) กับเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดีไฮโดร-จีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งมีเฉพาะภายในเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยหว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (Falcon, USA) ด้วยความหนาแน่น 30,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่หลุมจานเพาะเลี้ยงถูกฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายออสทิโอพอนทิน 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายผสมของคอลลาเจน (0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับออสทิโอพอนทิน (0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยใช้หลุมที่ไม่มีการฉาบด้วยสารละลายใด ๆ เป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน เมื่อครบกำหนด เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นน้ำยาดีเอ็มอีเอ็มปราศจากฟีนอลเรด (DMEM or Dulbacco Medium Essential Medium without phenol red, Gibco BRL, USA) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (phosphate buffer saline) ที่

ผ่านการกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม เก็บจานเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายเอ็มทีทีทิ้ง และแทนที่ด้วยสารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) 1000 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกสีม่วงของเอ็มทีทีฟอร์มาซาน (MTT formazan) ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลายเอ็มทีทีกับเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดีไฮโดรจีเนส สารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร และนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเป็นร้อยละ โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมจะคิดเป็นร้อยละ 100 ดังนี้

$$\text{ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}}$$

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์กับค่าดูดกลืนแสงและการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ด้วยวิธีสอบวิเคราะห์เอ็มทีทีนี้ ใช้เซลล์แต่ละกลุ่มทดลองจำนวน 3 หลุม ในผู้ป่วยแต่ละราย และทำการทดลองซ้ำในผู้ป่วยแต่ละรายจำนวน 3 ครั้ง

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยโปรแกรมเอสพีเอสเอสเวอร์ชัน 13.0 (SPSS version 13.0) หาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) โดยทำการทดสอบการกระจายของข้อมูลด้วยการทดสอบวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอร์นอฟ (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) พบว่าข้อมูลกระจายไม่ปกติ จึงใช้สถิติการทดสอบครัสคาล-วอลลิสเอช (Kruskal-Wallis) เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์การยึดเกาะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

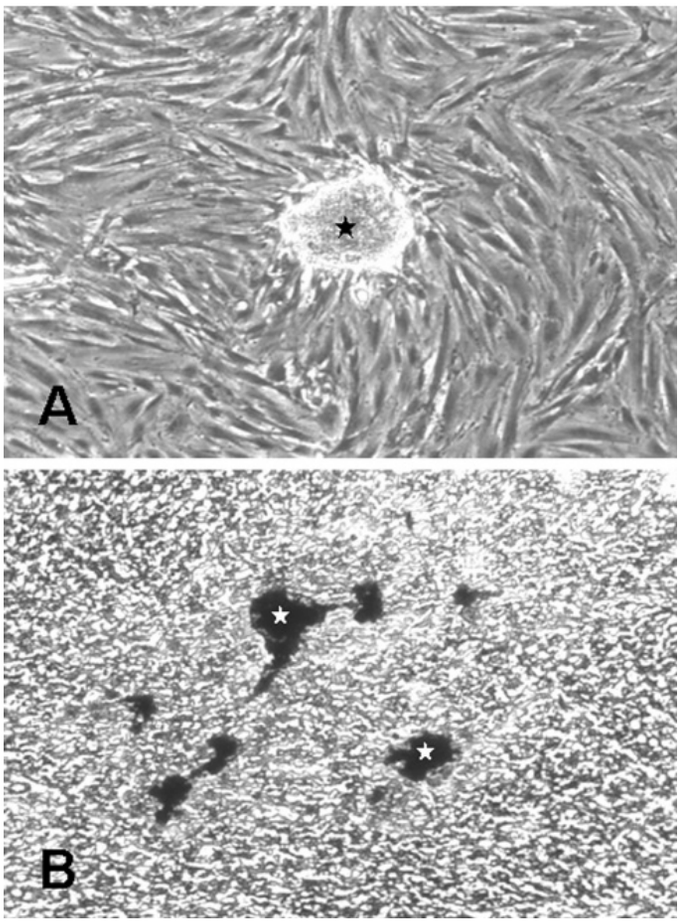
สโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ในรุ่นที่ 5 จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร ด้วยความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยภายในจานเพาะเลี้ยงมีแผ่นแก้วบาง (coverslip) บรรจุอยู่ แผ่นแก้วบางเหล่านี้ถูกฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจน สารละลายออสทิโอพอนทิน สารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน และใช้แผ่นแก้วที่ไม่ฉาบสารใดๆ เป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เซลล์มีการยึดเกาะกับแผ่นแก้วและเติบโตเต็มที่ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยการนำแผ่นแก้วบางไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพกลูทาร์-อัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (0.1 M phosphate buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 7.2 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และออสเมียมเททรอกไซด์ (osmium tetroxide, EMS, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันเป็นเวลาอย่างละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ด้วยการแช่ในเอธานอล (ethanol) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 90 และ 100 ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 15 นาที นำตัวอย่างบนแผ่นแก้วบางไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤต (critical point drying) ก่อนที่จะนำไปยึดติดบนแท่นทองเหลือง (specimen stub) และเคลือบผิวตัวอย่าง (coat) ด้วยอนุภาคทอง (gold particles) จากนั้นนำเซลล์ไปศึกษาการยึดเกาะบนพื้นผิวชนิดต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Jeol JSM-5410 LV, Japan) ที่ 15 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 100 และ 350 เท่า การศึกษาการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นแก้วบางที่ฉาบด้วยสารละลายชนิดต่างๆ ใช้การวิเคราะห์เชิงพรรณนา

ผลการศึกษา

เมื่อนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปย้อมด้วยอลิซารินเรด เพื่อยืนยันชนิดของเซลล์ที่พัฒนาจากสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูก พบว่าเซลล์เหล่านี้มีการสร้าง และสะสมเกลือแคลเซียม ซึ่งพบเห็นได้เป็นแคลซิไฟด์โนดูล (calcified nodule) อันเป็นลักษณะหนึ่งของเซลล์สร้างกระดูก (รูปที่ 2)

การสอบวิเคราะห์เอ็มทีที

จากผลการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที พบว่า สารละลายคอลลาเจนความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์อย่างมีนัย



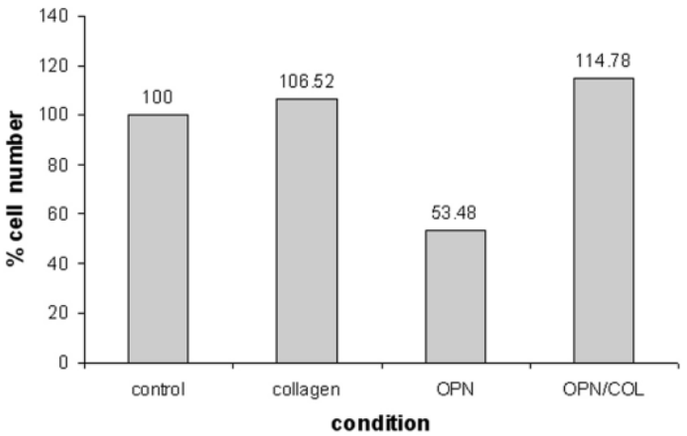
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของแคลซิไฟด์โนดูล (★) ที่สร้างโดยสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 30 วัน (A) แคลซิไฟด์โนดูลนี้ติดสีแดงเมื่อย้อมด้วยสีอลิซารินเรด (B) (กำลังขยายจากกล้องจุลทรรศน์ 40 เท่า)

Fig. 2 demonstrates the calcified nodules (★) in the 30 day old bone marrow stromal cell culture (A). These nodules stained red for alizarin red staining (B). (Original magnification 40X).

สำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 106.52 ± 4.08 และ 114.78 ± 6.82 ตามลำดับ แต่สารละลายออสทิโอพอนทินความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีผลลดจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยลดลงเหลือร้อยละ 53.48 ± 12.20 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 3) และในแต่ละกลุ่มทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สามารถจัดลำดับความสามารถในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนสโตรมัลเซลล์จากมากไปน้อยดังนี้ คือ กลุ่มสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน กลุ่มสารละลายคอลลาเจน กลุ่มควบคุม และกลุ่มออสทิโอพอนทิน ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม ($P < 0.05$)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

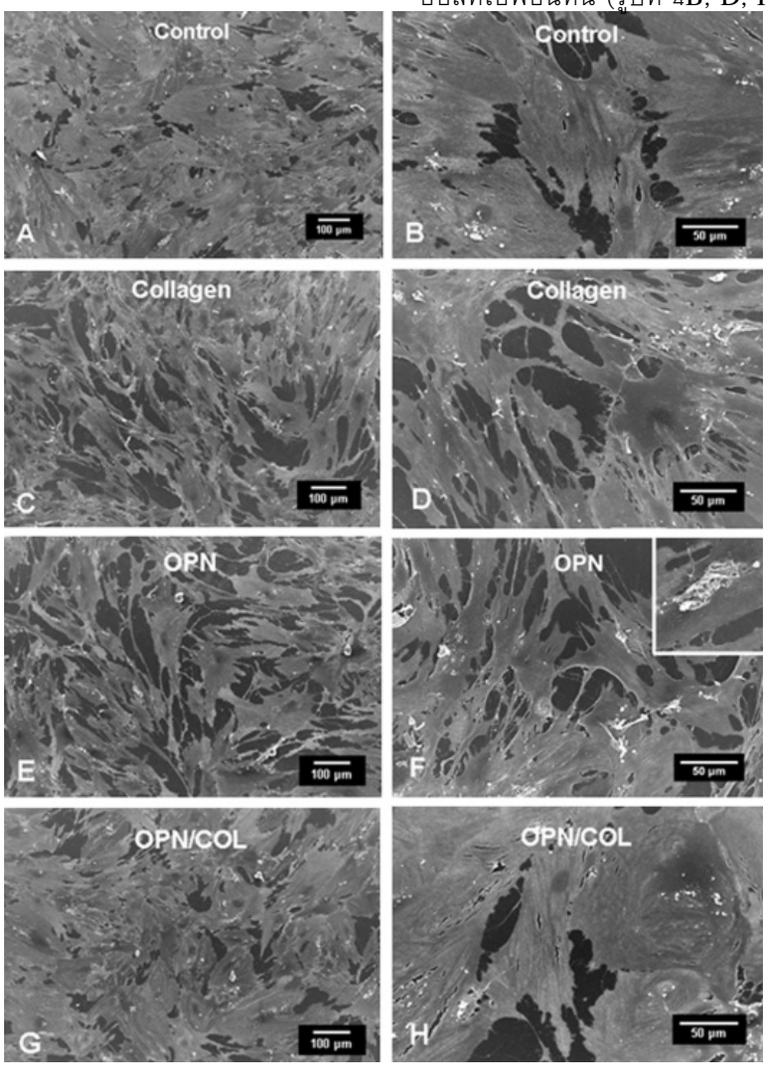
จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยายต่ำ เพื่อดูลักษณะการยึดเกาะของเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ที่ยึดเกาะ พบว่าในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแผ่นแก้วบางที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน เซลล์มีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี ในขณะที่กลุ่มที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจนและสารละลายออสทิโอพอนทิน พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะดี แต่มีการแผ่ตัวน้อยกว่าใน 2 กลุ่มแรก (รูปที่ 4A, C, E และ G) และเมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงขึ้น พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉาบแผ่นแก้วบางด้วยสารละลายคอลลาเจนผสม



รูปที่ 3 กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในถาดหลุมชนิด 24 หลุมที่ฉาบด้วยคอลลาเจน (collagen) ออสทิโอพอนทิน (OPN) และคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน (OPN/COL) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในถาดหลุมที่ไม่ได้รับการฉาบด้วยสารใด ๆ เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธีเอ็มทีที

Fig. 3 Graph, plotted from the MTT study, demonstrates the percentages of cell number when the cells were grown in the 24-well plate coated with collagen, ostepontin (OPN) or mixed collagen/osteopontin (OPN/COL) in comparison to the control group in which the cells were grown on the uncoated well plate.

ออสทิโอพอนทิน มีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี พบการแผ่ขยายส่วนยื่นของไซโทพลาซึม (cytoplasmic processes) ออกจากตัวเซลล์อยู่ทั่วไปเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิวที่เซลล์สัมผัสอยู่หรือประสานกับเซลล์ข้างเคียง ผิวของเซลล์มีลักษณะเรียบ ในขณะที่กลุ่มที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจนและสารละลายออสทิโอพอนทิน พบว่าเซลล์มีการแผ่ตัวน้อยกว่าใน 2 กลุ่มแรก โดยยังคงพบการแผ่ขยายส่วนยื่นของไซโทพลาซึมได้บ้าง และพบว่ามีการเกิดเป็นตุ่มพอง (bleb) ขึ้น ซึ่งตุ่มพองในบางตำแหน่งมีขนาดใหญ่ และพบการแตกของตุ่มพอง (disrupted bleb)โดยเฉพาะในกลุ่มที่ฉาบด้วยสารละลายออสทิโอพอนทิน (รูปที่ 4B, D, F และ H)



รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยายต่ำ (A, C, E, G) และที่กำลังขยายสูงขึ้น (B, D, F, H) แสดงลักษณะและการยึดเกาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิวที่ฉาบด้วยคอลลาเจน (collagen ในรูป C และ D) ออสทิโอพอนทิน (OPN ในรูป E และ F) คอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน (OPN/COL ในรูป G และ H) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิวที่ไม่ได้ฉาบด้วยสารใดๆ (control ในรูป A และ B) รูปเล็กในรูป F แสดงลักษณะการแตกของตุ่มพองที่ผิวของเซลล์ในกลุ่มที่ฉาบด้วยสารละลายออสทิโอพอนทิน

Fig. 4 Scanning electron micrographs at the low magnification (A, C, E, G) and higher magnification (B, D, F, H) show structures and adhesions of cells grown on the surfaces coated with collagen (C, D), ostepontin (OPN in E and F) and mixed collagen/osteopontin (OPN/COL in G and H) in comparison to the control group in which the cells were grown on the uncoated surface (A and B). The inset in F reveals disrupted blebs at the surface of the cell exposed to osteopontin.

วิจารณ์

ในการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้องค์ประกอบของการศึกษาที่ใกล้เคียงกับองค์ประกอบที่ใช้ในการทำให้เกิดการงอกใหม่ของแผลกระดูก เช่น ใช้สโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกของมนุษย์ ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้หากมีการกระตุ้นที่เหมาะสม ใช้คอลลาเจนซึ่งมีรายงานถึงการนำมาใช้ในการรักษาทางการแพทย์ในลักษณะต่าง ๆ และออสทิโอพอนทิน ซึ่งเป็นสัญญาณกระตุ้นการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเลือกวิธีทดสอบการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที ซึ่งวิธีการนี้เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยดูจากผลผลิตของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และ Mossman[29] ได้ศึกษาและสรุปว่าเป็นวิธีการที่มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาการมีชีวิต (cell survival) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จากการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลด้วยการทดสอบวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอร์นอฟ พบว่าข้อมูลมีการกระจายปกติ จึงใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวในการทดสอบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่ม

ผลจากการสอบวิเคราะห์เอ็มทีทีและจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดพบว่า สารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสนับสนุนการยึดเกาะและการแผ่ตัวของเซลล์ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ สารละลายคอลลาเจนเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ในกลุ่มสารละลายออสทิโอพอน-ทินมีจำนวนเซลล์ลดลง ผลการศึกษานี้สามารถอธิบายได้โดยพิจารณาจากกลไกในพัฒนาการและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตร่วมไปกับลักษณะสมบัติของคอลลาเจนและออสทิโอพอนทิน

กุญแจสำคัญของพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่มีหลายเซลล์คือความสามารถของเซลล์ในการติดต่อและทำปฏิกิริยากับเซลล์อื่นและกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งในการติดต่อระหว่างเซลล์กับเซลล์และเซลล์กับสิ่งแวดล้อมนั้น จะต้องพึ่งพาเมทริกซ์ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์หรือเมทริกซ์นอกเซลล์[31] ส่วนกลไกการเพิ่มจำนวนของเซลล์นั้น ขั้นแรกเซลล์จะต้องมีการยึดเกาะได้ดีกับพื้นผิวที่เซลล์สัมผัส โดยเซลล์จะทำปฏิกิริยากับเมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-extracellular matrix interaction) ที่มีอยู่รอบ ๆ เซลล์ผ่านทางตัวรับอินทิกริน (integrin receptor) เซลล์ที่มีการยึดเกาะที่ดีจะมีการจัดระเบียบของไซโทสเกเลตัน (cytoskeleton organization) และมีการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม (cell response) ที่เหมาะสม[32] ในขณะเดียวกันเซลล์ที่มีการยึดเกาะที่ดีจะมีการสร้างตัวรับต่อสารพวกโกรทแฟกเตอร์ (growth factor receptors) และทำปฏิกิริยากับโกรทแฟกเตอร์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ มากมายที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ต่อไป ขั้นตอนในกระบวนการเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์หลายขั้นตอน[32] จากกลไกดังกล่าวจะพบว่าเมทริกซ์นอกเซลล์มีความสำคัญต่อการยึดเกาะของเซลล์และการยึดเกาะของเซลล์ ก็เป็นสิ่งสำคัญต่อพฤติกรรม การเจริญเติบโต และพัฒนาการ ของเซลล์อย่างยิ่ง

คอลลาเจนและออสทิโอพอนทินที่ใช้ในการศึกษา จัดเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ โดยคอลลาเจนเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ที่มีมากที่สุดในร่างกายของสิ่งมีชีวิต มีส่วนของโมเลกุลที่สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์ และมีการนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง สำหรับออสทิโอพอนทินนั้น จัดเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดหนึ่ง และปัจจุบันจัดอยู่ในกลุ่มของเมทริเซลลูลาร์โปรตีน (matricellular protein) ด้วย โปรตีนในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดอื่นและสารพวกโกรทแฟกเตอร์ ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวและเจริญเติบโต มากกว่าการสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์[33] ดังจะเห็นได้จากการมีปริมาณของออสทิโอพอนทินสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งที่มีการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออื่น(metastasis)[34] ออสทิโอพอนทินมีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะเซลล์กระดูก ทั้งในแง่ของการยึดเกาะ การส่งสัญญาณ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูก[17,35] ออสทิโอพอนทินมีส่วนของโมเลกุลที่สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์โดยผ่านตัวรับอินทิกรินด้วยเช่นกัน[18,19] นอกจากนี้ออสทิโอพอนทินสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ผ่าน

ทางกระบวนการโฟคัลแอดฮีชันไคเนสฟอสโฟรีเลชัน (focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation pathway)[17] ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้[35]

ผลจากการวิจัยนี้พบว่าคอลลาเจนที่ฉาบบนพื้นผิวที่สโตรมัลเซลล์สัมผัสอยู่ ช่วยให้เซลล์มีการยึดเกาะที่ดี และเมื่อยึดเกาะได้ดีแล้วเซลล์จึงทำปฏิกิริยากับโกรทแฟกเตอร์ที่มีในซีรัมที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ และมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นทั้งในกลุ่มที่เซลล์สัมผัสกับพื้นผิวที่ฉาบด้วยคอลลาเจนอย่างเดียวและในกลุ่มที่สัมผัสกับพื้นผิวที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทิน และการที่เซลล์ในกลุ่มที่สัมผัสกับพื้นผิวที่ฉาบด้วยสารละลายคอลลาเจนผสมออสทิโอพอนทินมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด อาจเนื่องมาจากออสทิโอพอนทินที่ผสมอยู่มีส่วนช่วยในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์กับโกรทแฟกเตอร์ สนับสนุนให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น สำหรับกรณีที่เซลล์ในกลุ่มที่สัมผัสกับพื้นผิวที่ฉาบด้วยออสทิโอพอนทินอย่างเดียว แม้ว่ามีการยึดเกาะกับพื้นผิวได้ดี แต่มีจำนวนเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มอื่น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากบทบาทของออสทิโอพอนทินที่มีรายงานส่วนใหญ่เน้นหนักไปในด้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondroblasts) และเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) และควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการอักเสบและการเกิดมะเร็ง[36] มากกว่าในด้านการช่วยในการยึดเกาะและแผ่ตัวของเซลล์ เมื่อมีจำนวนเซลล์ยึดเกาะน้อยลงย่อมทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงด้วย นอกจากนี้จำนวนเซลล์ในกลุ่มนี้ยังน้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับคอลลาเจน และ/หรือออสทิโอพอนทิน จึงเป็นไปได้ว่าออสทิโอพอนทินที่ใช้ในกลุ่มทดลองนี้มีปริมาณและความเข้มข้นที่สูงเกินระดับที่เหมาะสม ทำให้เกิดผลในทางยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์ แม้ว่าจะไม่มีผลในด้านการเป็นพิษต่อเซลล์อย่างเห็นได้ชัดก็ตาม ซึ่งการยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์ในลักษณะนี้ อาจเป็นได้ว่าปริมาณที่มากเกินขนาดของออสทิโอพอนทินเป็นสัญญาณในทางลบที่ส่งผลให้เกิดการจัดระเบียบโครงสร้างภายในเซลล์ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการยึดเกาะของเซลล์ได้ ซึ่งปรากฏการณ์ที่ความเข้มข้นของสารทางชีววิทยามีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเซลล์เช่นนี้สามารถพบได้ในโกรทแฟกเตอร์ชนิดอื่น เช่น ทรานสฟอร์มิงโกรทแฟกเตอร์-เบตา (transforming growth factor-β) ที่ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นการสร้างและหลั่งเพลทเลทดีไรฟ์โกรทแฟกเตอร์ (platelet derived growth factor) และที่ความเข้มข้นสูงยับยั้งการสร้างตัวรับต่อเพลทเลทดีไรฟ์โกรทแฟกเตอร์ (platelet derived growth factor reeceptor)[37] แม้ว่าออสทิโอพอนทินจะแสดงผลในการลดจำนวนสโตรมัลเซลล์ในการศึกษานี้ก็ตาม แต่การใช้ออสทิโอพอนทินที่ความเข้มข้นต่ำลงร่วมกับคอลลาเจนแสดงผลดีในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ประกอบกับในการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการใช้โครงค้ำยันจากไฮดรอก-ซีอะพาไทต์ (porous hydroxyapatite) ที่ฉาบด้วยออสทิโอ-พอนทินร่วมกับเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูก ทำให้เกิดการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลองได้มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ฉาบออสทิโอพอนทินถึงร้อยละ 40[16] ดังนั้น ออสทิโอพอนทินจึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการหายของแผลกระดูก

สรุป

ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวน รวมถึงการยึดเกาะของสโตรมัลเซลล์จากไขกระดูกมนุษย์ด้วยสารละลายคอลลาเจนร่วมกับออสทิโอพอนทิน ดังนั้น จึงควรมีการนำสารดังกล่าว มาศึกษาและพัฒนา โดยเฉพาะการนำมาสร้างเป็นโครงค้ำยันเพื่อชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของกระดูก ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาผู้ป่วยในทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ขอขอบพระคุณบุคลากรของภาควิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทย-ศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้ความเอื้อเฟื้อในการทำงานวิจัยอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. Lancet. 1999;353(Suppl.I):28-9.
2. Yukna RA. Synthetic bone grafts in periodontics. Periodontol2000. 1993;1:92-9.
3. Virolainen P, Vuorio E, Aro HT. Different healing rates of bone autografts, synthetic grafts, and allografts in an experimental rat model. Arch Orthop Trauma Surg. 1997;116:486-91.
4. Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. Periodontol 2000. 2006;41:109-22.
5. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. Nature Biotechnol. 2003;21:1025-32.
6. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. Clin Orthop. 1989; 240:270-80.
7. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. Science. 1997; 276:71-4.
8. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem cells. 2001;19:180-92.
9. Hou LT, Liu CM, Liu BY, Chang PC, Chen MH, Ho MH, *et al.* Tissue engineering bone formation in novel recombinant human bone morphogenic protein 2-atelocollagen composite scaffolds. J Periodontol. 2007;78:335-43.
10. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials 2007;28:3587-93.
11. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, *et al.* Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. J Periodontol. 2004;75:1281-7.
12. Nagai N, Yunoki S, Suzuki T, Sakata M, Tajima K, Munekata M. Application of cross-linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. J Biosci Bio Eng. 2004;97:389-94.
13. van Susante JLC, Pieper J, Buma P, van Kuppevelt TH, van Beunungen H, van der Kraan PM, *et al.* Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. Biomaterials. 2001;22:2359-69.
14. Pieper JS, Oosterhof PJ, Dijkstra PJ, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. Biomaterials. 1999;20:847-58.
15. Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Hafmans T, Veerkamp JH, *et al.* Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. Biomaterials. 2000;21:1689-99.
16. Uemura T, Nemoto A, Liu YK, Kojima H, Dong J, Yabe T, *et al.* Osteopontin involvement in bone remodeling and its effects on *in vivo* osteogenic potential of bone marrow-derived osteoblasts/ porous hydroxyapatite constructs. Mater Sci Eng. 2001;17:33-6.
17. Yabe T, Nemoto A, Uemura T. Recognition of osteopontin by rat bone marrow derived osteoblastic primary cells. Biosci Biotechnol Biochem. 1997; 61:754-6.
18. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. Int J Exp Pathol. 2000;81:373-90.
19. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin-a molecule for all seasons. QJM. 2002;95:3-13.
20. Garcia AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone

formation. J Dent Res. 2005;84:407-13.

21. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen: an overview. Implant Dent. 2002;11:280-5.
22. Colen LB, Mathes SJ. The use of microcrystalline collagen in microsurgery and its effect in anastomotic patency. Ann Plast Surg. 1983;9: 471-4.
23. Watson SP. Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. Thromb Heamost. 1999;82: 365-76.
24. DeLustro F, Smith ST, Sundsmo J, Salem G, Kincaid S, Ellingsworth L. Reaction to injectable collagen: results in animal model and clinical use. Plast Reconstr Surg. 1987;79:581-94.
25. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. J Oral Implantol. 2002;28: 220-5.
26. Bazin S, Delaumay A. Preparation of acid and citrate soluble collagen. In: Hall DA, editor. The methodology of connective tissue research. Oxford: Joynson-Bruvvers, 1976:13-8.
27. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem. 1997;64:295-312.
28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284:143-7.
29. Mosmann T. Rapidly colimeric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immonol. 1983;65:55-63.
30. Kasugai S, Hasekawa N, Okura H. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. J Dent Res. 1991;70:127-30.
31. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. The extracellular matrix of animals. In: Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002:1090-112.
32. Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol. 1993;120:577-85.
33. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell matrix interaction: SPARC, tenascin and thrombospondin. J Biol Chem. 1991;266:14831-4.
34. Matsuzaki H, Shima K, Muramatsu T, Ro Y, Hashimoto S, Shibahara T, *et al.* Osteopontin as biomarker in early invasion by squamous cell carcinoma in tongue. J Oral Pathol Med. 2007; 36: 30-4.
35. Liu YK, Uemura T, Nemoto A, Yabe T, Fujii N, Ushida T, *et al.* Osteopontin involvement in integrin-mediated cell signaling and regulation of expression of alkaline phosphatase during early differentiation of UMR cells. FEBS Letters. 1997;420:112-6.
36. Sodek J, da Silva APB, Zohar R. Osteopontin and mucosal protection. J Dent Res. 2006;85:404-15.
37. Gronwald RG, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Differentiation regulation of expression of two platelet-derived growth factor receptor subunits by transforming growth factor-beta. J Biol Chem. 1989;214:8120-5.

The response of human bone marrow stromal cells to osteopontin and bovine dermal collagen: an *in vitro* study

Papatpong Sirikururat D.D.S.[1]
Suphot Tamsailom D.D.S., M.Sc., Diplomate, Thai Board of Periodontology[2]
Pi-Ling Chang Ph.D.[3]
Somporn Swasdison D.D.S., Ph.D.[4]

[1]Graduate Student, Department of Periodontology, Faculty of Dentisty, Chulalongkorn University
[2]Department of Periodontology, Faculty of Dentisty, Chulalongkorn University
[3]Department of Nutrition Sciences, University of Alabama at Birmingham, USA
[4]Department of Oral Pathology, Faculty of Dentisty, Chulalongkorn University

Abstract

Objectives To study the response including cell proliferation and cell attachment of human bone marrow stromal cells to collagen and osteopontin *in vitro.*

Materials and methods The study was performed by co-culturing human bone marrow stromal cells with bovine dermal collagen and recombinant rat osteopontin. MTT assay was utilized to determine the cell proliferation and cytotoxicity resulted from the cells being exposed to four conditioned surfaces, uncoated, collagen-coated, osteopontin-coated and mixed collagen/osteopontin-coated. Cell attachment to these four conditioned surfaces was also investigated under the scanning electron microscope.

Results The cells exposed to the collagen-coated and the mixed collagen/osteopontin-coated surfaces demonstrated the increasing of cell proliferation to 106.52 ± 4.08% and 114.78 ± 6.82% respectively, whereas the cells exposed to the osteopontin-coated surface revealed the decrease in cell number to 53.48 ± 12.20% when compared to the control group. Scanning electron microscopy showed good cell attachment in all studied groups.

Conclusion Both collagen containing solutions enhanced the human bone marrow stromal cell proliferation and attachment. The enhancement is increased with the addition of osteopontin. These results suggest that collagen and osteopontin are advantageous to the bone marrow stromal cells. Therefore, it might be worth introducing them to the field of bone regeneration.

(CU Dent J. 2008;31:19-32)

Key words: *bone marrow stromal cells; cell attachment; collagen; osteopontin*