

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแยก เพาะเลี้ยง เพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือรก และเยื่อหุ้มกระดูก และการศึกษาการแสดงออกของยีนในการเปลี่ยนแปลง เป็นเซลล์กระดูก โดยสารชักนำจากเยื่อบุลำไส้เล็กหนูและเนื้อเยื่อกระดูก

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และคณะ

กันยายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแยก เพาะเลี้ยง เพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือรก และเยื่อหุ้มกระดูก และการศึกษาการแสดงออกของยีนในการเปลี่ยนแปลง เป็นเซลล์กระดูก โดยสารชักนำจากเยื่อบุลำไส้เล็กหนูและเนื้อเยื่อกระดูก

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|--------------------------------|-----------------------|
| 1. ผศ.นพ. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. รศ.นพ. วรณัฐ ธนาภิจ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. น.ส. ปิยนุช บำรุงพนิชถาวร | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 4. นาย สุภากร จิตติเศรษฐ์ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 5. ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเรียบร้อยได้ด้วยดี ผู้ทำวิจัยต้องขอขอบพระคุณพี่เลี้ยงที่ปรึกษาโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ นามแพทย์ยง ภูววรรณ ที่ได้ให้ความกรุณาช่วยเหลือ เอาใจใส่ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยด้วยดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ร่วมทำวิจัยทุกท่าน รศ.นพ. วรนุช ธนากิจ นางสาวปิยนุช บำรุงพนิชถาวร นายฐาภร จิตติเศรษฐ์ นางสาวเบญจมาศ ดีไพศาลสกุล และนางสาวณัฐฐาภรณ์ แซ่ตัน ซึ่งทำให้งานวิจัยสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และศูนย์วิจัย Chulalongkorn Medical Research Center (Chula MRC) ตลอดจนห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาชีวเคมีให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ ในการวิจัยของโครงการวิจัยนี้

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยโครงการนี้ให้สามารถทำการศึกษาวิจัยได้สำเร็จลงด้วยดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG4980017

ชื่อโครงการ: การแยก เพาะเลี้ยง เพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือรก และเยื่อหุ้มกระดูกและการศึกษาการแสดงออกของยีนในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกโดยสารชักนำจากเยื่อบุลำไส้เล็กหนู และเนื้อเยื่อกระดูก

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: sittisak.h@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการวิจัย 3 ปี

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถของลำไส้เล็กหนูชั้นลำตัว (small intestinal submucosa; SIS) และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralized bone matrix; DBM) ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก โดยทำแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือ 7 วัน หลังจากทำการเพาะเลี้ยง พบเซลล์ลักษณะคล้าย fibroblasts เรียงตัวอยู่โดยรอบชั้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของ DBM และ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วย tryphan blue staining assay พบว่าเซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูกหลังจากกระตุ้นด้วย SIS มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นที่ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม และในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS ผสมกับ DBM พบว่ามีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) ส่วนเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อสายสะดือมีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงหลังจากกระตุ้นด้วย DBM จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เช่น ยีน Runx-related transcription factor 2 (RUNX2) ยีน alkaline phosphates (ALP) และยีน collagen type I (COL I) เป็นต้น ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน RUNX2 COL I และ ALP ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM และ DBM ผสมกับ

SIS และมีการแสดงออกของยีน RUNX2, SMAD2, VDR, TGF β 2 และ CD36 มีระดับการแสดงออกสูงขึ้น หลังจากกระตุ้นด้วย DBM ส่วน SMAD7 พบว่ามีการแสดงออกลดลงหลังจากได้รับการกระตุ้น ใน การศึกษาความสามารถการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay พบว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มอื่น เช่นเดียวกับเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อสายสะดือมีระดับการทำงานของ ALP สูงขึ้นหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM ซึ่งสอดคล้องกับการทำ alkaline phosphatase staining ซึ่งเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นมีการย้อมติดสีแดง การวิเคราะห์ความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง (Wistar rat) พบว่า DBM และ DBM ผสมกับ SIS มีความสามารถในการกระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น ส่วนในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SIS พบว่าไม่มีการสร้างกระดูก

คำหลัก: กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่, ลำไส้หนูชั้นสับมิวโคซา, การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไป เป็นเซลล์สร้างกระดูก

Abstract

Project Code: DBG4980017

Project Title: Osteoinductive Potential of Porcine Small Intestinal Submucosa and
Demineralized Bone Matrix

Investigator: Assistant Professor Sittisak Honsawek, MD.

Chulalongkorn University

E-mail Address: sittisak.h@chula.ac.th

Project Period: 3 Years

The objective of this research was to study osteoinductive potential of porcine small intestinal submucosa and demineralized bone matrix. We analyzed the effects of demineralized bone matrix (DBM) and porcine small intestinal submucosa (SIS) on proliferation of periosteal derived stem cells using Trypan blue staining assay. The results showed that SIS exhibited highest proliferation at 5 and 10 mg. The cells treated with DBM or mixture (DBM + SIS) were significantly increased compared with controls ($p < 0.05$). Furthermore we analyzed gene expression of osteoblastic markers for osteoblast differentiation including runt-related transcription factor 2 (RUNX 2), collagen type I (COL I) and alkaline phosphatase (ALP) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the cells stimulated with DBM and mixture (DBM+SIS) highly expressed RUNX2 COL I and ALP. Then we studied osteoblast differentiation of periosteal derived stem cells treated with DBM, SIS and mixture (DBM + SIS) using alkaline phosphatase assay. The result showed that the cells stimulated with mixture (DBM+ SIS) had high ALP activity. Then we analyzed osteoinductive potentials of DBM, SIS and mixture (DBM + SIS) using in vivo animal (Wistar rat) bioassay. The

result showed that DBM and mixture (DBM+SIS) had capability to induce new bone formation whereas SIS did not exhibit such capability.

Keywords: Demineralized bone matrix, Small intestinal submucosa, Osteoblast differentiation

บทนำ

วัสดุทดแทนกระดูก demineralized bone matrix (DBM) หรือที่รู้จักกันดีว่าเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ ซึ่งเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด กระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และมีการสร้างกระดูกใหม่ ส่วนวัสดุที่ได้จากธรรมชาติที่หาได้ง่าย และสะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้ ได้แก่ porcine small intestinal submucosa (SIS) ซึ่งได้จากชั้นใต้เยื่อผิวของลำไส้เล็กหนู มีองค์ประกอบเป็น คอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% และมี growth factors เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), IGF-1 และ glycosaminoglycans, fibronectin, chondroitin sulfates, hyaluronic acid, heparins, heparin sulfates เป็นต้น สารดังกล่าวมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ [1, 2] จากการศึกษาท่อนี้ของ Alper และคณะ ในปี 1989 ความสามารถของ hydroxyapatite และ DBM ในการเป็นตัวชักนำการสร้างกระดูกในกระดูกที่ไม่เชื่อมติดกัน โดยทำการฝัง hydroxyapatite และ DBM ในหนูตัวผู้ พบว่าในกลุ่ม hydroxyapatite ชนิดเดียวมีการลดลงของการสร้างกระดูกซึ่งมีความสัมพันธ์กับกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการวิเคราะห์แคลเซียม alkaline phosphatase และ bone gla protein พบว่าในกลุ่มที่ฝังด้วย DBM มีการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้นร้อยละ 16 ส่วนในกลุ่ม hydroxyapatite ชนิดเดียว และกลุ่มผสม hydroxyapatite กับ DBM ผสมกัน พบว่ามีการลดลงถึงร้อยละ 80 ทำให้ทราบว่ากระบวนการสร้างกระดูกในกระดูกที่ไม่เชื่อมติดกันจะมีการสร้างมากขึ้นโดยการกระตุ้นของ DBM [3] เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Oztürk A และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ได้ศึกษาความสามารถของ hydroxyapatite/tri-calcium phosphate และ DBM ในการรักษาแผลกระดูกของหนู (Wistar rat) โดยการฝัง hydroxyapatite/tri-calcium phosphate หรือ DBM ชนิดเดียวและทั้งสองชนิดผสมกัน พบว่า DBM ชนิดเดียวมีความสามารถในการรักษาดีที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ และกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในระหว่าง 2 กลุ่มที่เหลือและกลุ่มควบคุม [4] จากที่กล่าวมาข้างต้นถึงกระดูกที่ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ หรือ DBM สามารถเตรียมขึ้นจากการนำลำกระดูกยาวท่อนกลาง (diaphysis) มาบดให้ได้ขนาดระหว่าง 125 – 850 ไมครอน แล้วจึงนำมาผ่านกระบวนการลดปริมาณแคลเซียมและแร่ธาตุ ซึ่งนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกเจือจางในการละลายสารแร่ธาตุออกจากกระดูก ทำให้เนื้อกระดูกคงเหลือแต่คอลลาเจน และ bone morphogenetic protein ช่วยในการกระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกได้ จากนั้นนำมาล้างให้สะอาดจนได้วัสดุที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น ที่เรียกว่า demineralized bone matrix หรือ DBM [3] DBM มีคุณสมบัติเป็น osteoinductive agent ซึ่ง DBM ชักนำ osteogenesis

ในกระบวนการสร้างกระดูกใหม่แบบ endochondral ossification [5] ได้มีการนำ DBM มาใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการรักษาความผิดปกติของกระดูกและโรคที่เกี่ยวกับฟัน ในการศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 ทำการศึกษาใน in vivo (หนูทดลอง athymic mice) และใน in vitro (human periosteal cells) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความสามารถในการชักนำการสร้างกระดูกของ DBM โดยทำการฝัง DBM ในชั้นกล้ามเนื้อของหนู พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive) มากกว่าการฝังที่ได้ผิวหนัง และการสร้างกระดูกใหม่ในกลุ่มที่ฝังในชั้นกล้ามเนื้อมีการสร้างกระดูกใหม่ในระหว่างสัปดาห์ที่ 1-4 และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนัก ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า เริ่มมีการเพิ่มขึ้นของวัสดุที่เอาออกมา แสดงให้เห็นว่าในช่วงนี้มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการฝังวัสดุในปริมาณที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงผลการตอบสนองของความเข้มข้นของวัสดุที่ใช้แตกต่างกัน พบว่าใน in vivo ที่ 20 มิลลิกรัม ของ DBM มีการตอบสนองดีที่สุด ส่วนการศึกษาใน in vitro วิเคราะห์ด้วย alkaline phosphatase activity ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของ osteoblasts พบว่าในวันที่ 5 หลังเติม DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงสุด และในการศึกษาปริมาณของ DBM ที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม ของ DBM มีระดับ alkaline phosphatase activity มากที่สุด ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการศึกษาใน in vivo กับ in vitro พบว่าใน in vitro ปริมาณ DBM ที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการเป็นสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductivity) ของ DBM [24] รายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ DBM โดย Gao J และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งได้ทำการศึกษาความสามารถของ allogeneic demineralized bone matrix ต่อ resurface osteochondral defect ในกระต่าย โดยจากการสันนิษฐานถึง intrinsic cytokines ใน DBM จะชักนำให้เซลล์เจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สายพันธุ์ osteochondrogenic จาก bone marrow และทำหน้าที่ซ่อมแซม osteochondral defect ได้ ซึ่งทดสอบโดยการเลี้ยง bone marrow-derived mesenchymal stem cells ลงบนโครงร่างวัสดุ demineralized trabecular bone matrix แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์เกาะกับโครงร่างวัสดุ และเจริญอยู่ใน demineralized trabecular bone matrix จากนั้นจึงนำไปฝังลงในบริเวณ osteochondral defect ของกระต่ายเป็นเวลา 6-12 สัปดาห์ พบว่ามีการซ่อมแซมบริเวณที่กระดูกบกพร่องมากถึง 95% ส่วนการใช้ demineralized cortical bone matrix พบว่ามี subchondral bone และชั้นบนสุดพบมีกระดูกอ่อน (cartilage) เรียงและแทรกอยู่ แต่ส่วนมากจากการซ่อมแซมโดยใช้ demineralized trabecular bone matrix จะพบ fibril ที่พื้นผิวและไม่มีการแทรกตัวของกระดูกอ่อน ซึ่งจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า demineralized cortical bone matrix อาจจะมีคุณสมบัติในการซ่อมแซม osteochondral defect ได้ [7]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าชนิดของ DBM มีผลต่อการสร้างกระดูกในปี ค.ศ. 2005 Schouten และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถของ DBM ในการชักนำการสร้างกระดูกในหนูทดลอง (rat) โดยทำการฝัง DBM และ morsellized DBM (MDBM) ต่อการสร้างกระดูกที่ intramuscular ของหนูทดลองเป็น

เวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในบริเวณที่ฝัง DBM มีกระดูกใหม่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับการฝัง MDBM โดยบริเวณที่ทำการฝังด้วย DBM พบมีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น 2.6% ส่วน MDBM มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น 1.9% จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า DBM มีคุณสมบัติเป็น osteoinductive agent ซึ่ง DBM ชักนำ osteogenesis ใน endochondral ossification การฝังด้วย MDBM ไม่มีผลสำคัญต่อการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้น และพบว่าการฝังที่ชั้นกล้ามเนื้อมีผลต่อการสร้างกระดูก (ectopic bone) ได้ดีกว่าการฝังที่ได้ผิวหนัง [8,9]

Small intestinal submucosa (SIS) ซึ่งได้มาจากลำไส้เล็กของหนูชั้น submucosa โดยการลอกเอาชั้น tunica serosa และ tunica muscularis ออก SIS มีองค์ประกอบเป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% และยังพบคอลลาเจน ชนิดที่ 5 จำนวนเล็กน้อย [10] นอกจากนี้ใน SIS ยังมีโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ กระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นสารประเภทไซโตไคน์ (cytokines) เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) และ IGF-1 เป็นต้น ซึ่งมีผลทำให้มีการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดได้ รวมทั้ง SIS กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้น้อย มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดได้ [1, 2] Zhao Lin และคณะ ได้ทำการศึกษา tissue-engineer membrane เลียนแบบเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ที่เตรียมใน in vitro เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ โดยใช้ porcine SIS เป็น scaffold ในการเพาะเลี้ยง MSCs ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำให้เกิด bone defect เพื่อตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก พบว่า tissue-engineer membrane นี้มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ [11] Suckow และคณะ ในปี 1999 ได้ทำการศึกษาความสามารถของ SIS ต่อการเจริญของกระดูกที่เกิดความบกพร่องของกระดูกยาวใน Sprague-Dawley rat เนื่องจาก SIS เป็นวัสดุที่นำมาใช้ศึกษาทดลองได้ง่าย โดยนำมาใช้ในการทดลองทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในการศึกษานี้ได้ทำการฝัง SIS, demineralized cortical bone หรือ ovalbumin เข้าไปยังบริเวณกระดูกที่บกพร่อง แล้วดูการเจริญพัฒนาของกระดูกที่บกพร่องในสัปดาห์ที่ 3, 6, 12 และ 24 ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า หลังจากฝัง SIS หรือ demineralized cortical bone นาน 3 สัปดาห์ ลักษณะที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการแทรกตัวของ mononuclear cells แล้วยัง พบว่ามีเนื้อเยื่อเกิดขึ้นใหม่ใน 3 สัปดาห์แรกพบมีกระดูกอ่อนเกิดขึ้น และ 6 สัปดาห์ พบมีการสร้างกระดูกในหนูที่ถูกฝังด้วย SIS แสดงว่า SIS เป็นวัสดุที่มีความสามารถในการชักนำการเจริญพัฒนาของกระดูกใหม่ในกระดูกที่เกิดความบกพร่องได้ จึงเป็นประโยชน์ในการนำ SIS มาใช้เป็นวัสดุในการซ่อมแซมกระดูก [12]

ในกระบวนการสร้างกระดูกนั้นสามารถตรวจสอบได้หลายวิธีโดยตรวจการแสดงออกของตัวบ่งชี้ต่าง ๆ ของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) เช่น alkaline phosphatase activity assay และ

osteogenesis specific gene expression เช่น collagen type I, osteopontin, ALP, RUNX2, bone sialoprotein และ osteocalcin เป็นต้น หรือด้วยวิธีการย้อมสี เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เช่น การทำ von Kossa staining เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อดูการสะสมแคลเซียมที่เกิดขึ้น alizarin red staining เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อวิเคราะห์แคลเซียมในเนื้อเยื่อ ในปี ค.ศ. 1992 Gutkin และคณะ ได้ศึกษากลไกของกระบวนการสร้างกระดูกที่เกิดขึ้นผิดปกติ (ectopic site) โดยการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกด้วย DBM ซึ่งในการวิเคราะห์ถึงการสร้างกระดูกใหม่โดยการวิเคราะห์จากการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของ osteoblasts คือ alkaline phosphatase activity พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ของกระบวนการสร้างกระดูกมีการแสดงออกของ alkaline phosphatase activity ในระดับต่ำ ในสัปดาห์ที่ 2-3 มีระดับ alkaline phosphatase activity สูงขึ้น และในสัปดาห์ที่ 4-6 ระดับของ alkaline phosphatase activity คงที่ [13] ซึ่ง alkaline phosphatase ที่กล่าวถึงนั้นเป็น hydrolase enzyme ชนิดหนึ่งที่พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ osteoblasts ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) และกระบวนการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ซึ่ง alkaline phosphatase สามารถเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเจริญพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกได้ [14]

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

CO₂ cell culture incubator, centrifuge, micro centrifuge high speed, laminar flow hood, ultrasonic, multiskan EX, water bath, thermocycler, spectrophotometer, electrophoresis chamber set

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียม demineralized bone matrix

นำกระดูกตัดให้มีชิ้นขนาดประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำชิ้นกระดูกที่ได้มาทำความสะอาด จากนั้นนำชิ้นกระดูกที่ได้ทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilization) โดยนำเข้าเครื่อง freeze drier นำกระดูกที่ได้ไปบดเป็นผงแล้วทำการคัดกรองขนาด จากนั้นทำการลดปริมาณเกลือแร่ของเนื้อเยื่อกระดูกด้วยสารละลาย HCl ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนสารละลาย HCl ใหม่ โดยทำการเปลี่ยนทุก ๆ ชั่วโมง จนครบ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างผงกระดูกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำ DBM ที่ได้ทำให้แห้งโดยการทำ lyophilization (รูปที่ 1) และนำส่วนหนึ่งมาทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณแคลเซียม (calcium assay) โดยตรวจวัดปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ด้วย calcium reagent Arsenazo III (DBM ที่นำมาใช้ในการวิจัย ต้องมีปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ไม่เกิน 3% ของปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่มี) และก่อนที่จะนำ DBM ไปใช้ต้องผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยการอบ ethylene oxide gas

2. การเตรียม small intestinal submucosa (SIS)

นำลำไส้เล็กของหนูที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ล้างทำความสะอาด และตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3 นิ้ว จากนั้นทำการลอกชั้น muscularis externa ชั้น serosa และชั้น mucosa ออกเพื่อให้เหลือแต่ชั้น submucosa ของลำไส้หนูเท่านั้น แล้วนำไปแช่ด้วย 70% ethanol นำชิ้นที่ได้แช่ในน้ำ sterile cold deionized water ที่มี antibiotic (penicillin + streptomycin 200 หน่วย/มิลลิลิตร) (รูปที่ 2) แล้วนำมาเข้าเครื่องบดปั่น (grinder mill) ให้ละเอียด จากนั้นนำมาแช่ใน 3 % acetic acid ผสมกับ 0.1% pepsin และล้างกรดออกให้หมดด้วยน้ำกลั่น หรือ phosphate buffer saline แล้วนำไปทำ lyophilization นำ SIS ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80°C (รูปที่ 3) ก่อนที่จะนำไปใช้ได้ผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยการอบด้วย ethylene oxide gas

3. การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) และสายสะดือรก (Wharton's jelly)

นำเยื่อหุ้มกระดูกและสายสะดือรก มาทำ primary culture โดยวิธี outgrowth technique (รูปที่ 4) และทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้

4. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

4.1 การวิเคราะห์ Cell Surface marker (CD antigen) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือรก และจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วยเทคนิค flow cytometry

ทำการรวบรวมเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาแล้วประมาณ passage ที่ 2 – 3 ด้วยวิธี trypsinization ปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS ที่มีส่วนผสมของ sodium azide และ BSA และทำการแบ่งเซลล์ลง 15 ml centrifuge tube ให้ได้หลอดละประมาณ 500,000 เซลล์ โดยใช้เซลล์หนึ่งหลอดต่อการทดสอบ CD antigen หนึ่งชนิด และมีอีกหนึ่งหลอดที่ไม่ทำการย้อมด้วย antibodies ใดๆ ให้เป็น negative control จากนั้นนำ CD marker antibodies แต่ละตัว (CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD 105) มา incubate ในที่มืด แช่ในน้ำแข็งประมาณ 20 นาที จากนั้นนำมาล้างใน PBS จำนวน 2 รอบ แล้วทำการ fix เซลล์ใน PBS ที่มีส่วนผสมของ 0.5% formaldehyde เป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด จากนั้นจึงนำเข้าเครื่อง BD FACSCalibur เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์ต่อไป แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม BD CellQuest Pro Software

4.2 การศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือและเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

4.2.1 นำเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือมาแบ่งกลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มตัวอย่าง : กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม
- กลุ่มควบคุม : ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM

4.2.2 นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมากระตุ้นด้วยสารกระตุ้นที่แตกต่างกัน ดังนี้

- กลุ่มตัวอย่าง: - กระตุ้นด้วย SIS 5, 10, 20 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 2.5 มิลลิกรัม/flask ผสมกับ SIS 2.5 มิลลิกรัม/flask

กลุ่มควบคุม: ไม่ได้รับการกระตุ้น

แล้วทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก ซึ่งวิเคราะห์จากจำนวนเซลล์ด้วยวิธี tryphan blue staining assay (เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีย้อมของ tryphan blue ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีย้อมของ tryphan blue เป็นสีน้ำเงิน)

การคำนวณจำนวนเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} = \text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

10^4 คือ ปริมาตรต่อหนึ่ง square

4.3 การศึกษาผลของ DBM และ SIS ต่อการเกิด osteoblast differentiation โดยการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก

4.3.1 ศึกษาการแสดงออกของยีนในการเจริญเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อสายสะดือโดยแบ่งเป็นกลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มตัวอย่าง: กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม
- กลุ่มควบคุม: ไม่ได้รับการกระตุ้น

4.3.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis โดยทำการแบ่งเป็นกลุ่ม ดังนี้

กระตุ้นด้วย SIS 5 มิลลิกรัม

- DBM 5 มิลลิกรัม, SIS ผสมกับ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม
- กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น)

ทำการกระตุ้นเป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน

4.3.3 การสกัด RNA

ทำการสกัด RNA จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือด้วย RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen) จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น RNA ที่ได้ด้วย spectrophotometer

4.3.4 การตรวจวิเคราะห์ด้วย osteogenic cDNA array analysis

จากการทดลองแยกสกัด RNA ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ DBM และกลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการแยกสกัด RNA นำ total RNA ที่แยกสกัดได้มาทำการเปลี่ยนเป็น cDNA ซึ่งติดฉลากด้วย biotin จากนั้นทำการ hybridization เข้ากับ cDNA array เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนใดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกระดูกบน human osteogenesis gene arrays ซึ่งมีจำนวน 96 ยีน จากการ

วิเคราะห์ภาพที่ได้โดยอาศัยโปรแกรม ScanAlyze ภาพที่ได้จากการวางเทียบกับจุดตำแหน่งบน array และวิเคราะห์แต่ละจุดบน array ทำโดยการวัดความเข้มโดยปรับเทียบค่าพื้นหลังของแผ่น array แล้วนำมาหาค่าอัตราส่วนความเข้มของแต่ละจุดของแต่ละยีน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม อัตราส่วนที่มีค่ามากกว่า 2 แปลผลว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) อัตราส่วนที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 แปลผลว่ามีการแสดงออกลดลง (down-regulation) ตารางที่ 1 แสดงชื่อ หมายเลข และรายละเอียดของยีนแต่ละยีนที่อยู่บนแผ่น cDNA array ในแผ่น cDNA array นี้มียีน PUC18 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และยีน GAPDH, cyclophilin A, RPL13A และ β -actin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและเทียบค่าพื้นฐานให้เท่ากัน

4.3.5 การตรวจพิสูจน์ผลการศึกษการแสดงออกของยีน cDNA array

ทำการตรวจพิสูจน์การแสดงออกของยีน cDNA array ด้วยวิธี RT-PCR analysis โดยใช้ RNA ของเซลล์กลุ่มควบคุม และเซลล์กลุ่มทดลอง เช่นเดียวกับที่ใช้ศึกษาด้วยวิธี cDNA array แล้วทำการตรวจยืนยันด้วย RT-PCR analysis โดยการเลือกยีน biglycan สำหรับยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และยีน collagen 14A1 สำหรับยีนที่มีการแสดงออกลดลง และใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม พบว่า ผลที่ได้จาก RT-PCR สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี cDNA array ดังแสดงในรูปที่ 5, 6, 7 และ 8 เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับการแสดงออกโดยการวัดความเข้มของแถบ (band) ที่ได้เปรียบเทียบกัน สามารถยืนยันผลการทดลองข้างต้นได้ดังกราฟ ซึ่งสอดคล้องกันกับผลที่ได้จาก cDNA array analysis

4.3.6 การสังเคราะห์ cDNA ของยีน osteoblastic marker ด้วยวิธี RT-PCR

4.3.6.1 โดยใช้ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ RUNX2, SMAD2, SMAD7 และใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม (ตารางที่ 4)

4.3.6.2 โดยใช้ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ alkaline phosphatase (ALP), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) และ collagen type I (COL I) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ภาพกำหนดจุดตำแหน่งที่ตรงกันในแต่ละยีนซึ่งปรากฏอยู่ใน cDNA array

ALPL 1	ANXA5 2	ARSE 3	BGLAP 4	BGN 5	BMP1 6	BMP2 7	BMP3 8
BMP4 9	BMP5 10	BMP6 11	BMP7 12	BMP8B 13	BMPR1A 14	CASR 15	CD36 16
SCARB1 17	RSL1D1 18	COL10A1 19	COL11A1 20	COL12A1 21	COL14A1 22	COL15A1 23	COL16A1 24
COL17A1 25	COL18A1 26	COL19A1 27	COL1A1 28	COL2A1 29	COL3A1 30	COL4A3 31	COL4A4 32
COL4A5 33	COL5A1 34	COL7A1 35	COL9A2 36	CSF2 37	CSF3 38	CTSK 39	DCN 40
EGF 41	EGFR 42	FGF1 43	FGF2 44	FGF3 45	FGFR1 46	FGFR2 47	FGFR3 48
FLT1 49	FN1 50	GDF10 51	ICAM1 52	IGF1 53	IGF1R 54	IGF2 55	ITGA1 56
ITGA2 57	ITGA3 58	ITGAM 59	ITGAV 60	ITGB1 61	SMAD1 62	SMAD2 63	SMAD3 64
SMAD4 65	SMAD5 66	SMAD6 67	SMAD7 68	SMAD9 69	MMP10 70	MMP13 71	MMP2 72
MMP8 73	MMP9 74	MSX1 75	MSX2 76	NFKB1 77	PDGFA 78	RUNX2 79	SERPINH1 80
SERPINH1 81	SOX9 82	SPARC 83	SPP1 84	TGFB1 85	TGFB2 86	TGFB3 87	TGFB1 88
TGFB2 89	TNF 90	TWIST1 91	VCAM1 92	VDR 93	VEGF 94	VEGFB 95	VEGFC 96
PUC18 97	PUC18 98	PUC18 99	Blank 100	Blank 101	Blank 102	GAPDH 103	GAPDH 104
PPIA 105	PPIA 106	PPIA 107	PPIA 108	RPL13A 109	RPL13A 110	ACTB 111	ACTB 112

ตารางที่ 2 รายชื่อ หมายเลข และรายละเอียดของยีนที่แสดงบน osteogenesis cDNA array

Position	GeneBank	Symbol	Description
1	NM_000478	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
2	NM_001154	ANXA5	Annexin A5
3	NM_000047	ARSE	Arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)
4	NM_199173	BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)
5	NM_001711	BGN	Biglycan
6	NM_006129	BMP1	Bone morphogenetic protein 1
7	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
8	NM_001201	BMP3	Bone morphogenetic protein 3 (osteogenic)
9	NM_130851	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
10	NM_021073	BMP5	Bone morphogenetic protein 5
11	NM_001718	BMP6	Bone morphogenetic protein 6
12	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
13	NM_001720	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b (osteogenic protein 2)
14	NM_004329	BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA
15	NM_000388	CASR	Calcium-sensing receptor (hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism)
16	NM_000072	CD36	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)
17	NM_005505	SCARB1	Scavenger receptor class B, member 1
18	NM_015659	RSL1D1	Ribosomal L1 domain containing 1
19	NM_000493	COL10A1	Collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia)
20	NM_080629	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1
21	NM_004370	COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1
22	NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)
23	NM_001855	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1
24	NM_001856	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1
25	NM_000494	COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1

Position	GeneBank	Symbol	Description
26	NM_030582	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1
27	NM_001858	COL19A1	Collagen, type XIX, alpha 1
28	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
29	NM_001844	COL2A1	Collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia)
30	NM_000090	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)
31	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
32	NM_000092	COL4A4	Collagen, type IV, alpha 4
33	NM_033380	COL4A5	Collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)
34	NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1
35	NM_000094	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic)
36	NM_001852	COL9A2	Collagen, type IX, alpha 2
37	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
38	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
39	NM_000396	CTSK	Cathepsin K (pseudotumor)
40	NM_001920	DCN	Decorin
41	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
42	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene)
43	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
44	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
45	NM_005247	FGF3	Fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2))
46	NM_000604	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
47	NM_000141	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome,)
48	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
49	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor receptor)
50	NM_002026	FN1	Fibronectin 1
51	NM_004962	GDF10	Growth differentiation factor 10

Position	GeneBank	Symbol	Description
52	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
53	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
54	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
55	NM_000612	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
56	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1
57	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
58	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
59	NM_000632	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)
60	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
61	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, MDF2, MSK12)
62	NM_005900	SMAD1	SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)
63	NM_005901	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
64	NM_005902	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)
65	NM_005359	SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)
66	NM_005903	SMAD5	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila)
67	NM_005585	SMAD6	SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)
68	NM_005904	SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)
69	NM_005905	SMAD9	SMAD, mothers against DPP homolog 9 (Drosophila)
70	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
71	NM_002427	MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
72	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
73	NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
74	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
75	NM_002448	MSX1	Msh homeobox homolog 1 (Drosophila)
76	NM_002449	MSX2	Msh homeobox homolog 2 (Drosophila)
77	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)

Position	GeneBank	Symbol	Description
78	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
79	NM_004348	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
80	NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), (collagen binding protein 1)
81	NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), (collagen binding protein 1)
82	NM_000346	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)
83	NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
84	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I)
85	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
86	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
87	NM_003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
88	NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase)
89	NM_003242	TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
90	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
91	NM_000474	TWIST1	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)
92	NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
93	NM_000376	VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
94	NM_003376	VEGF	Vascular endothelial growth factor
95	NM_003377	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B
96	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
97	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
98	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
99	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
100			
101			
102			
103	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Position	GeneBank	Symbol	Description
104	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
105	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
106	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
107	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
108	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
109	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
110	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
111	NM_001101	ACTB	Actin, beta
112	NM_001101	ACTB	Actin, beta

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ RUNX2, ALP, COL I, SMAD2, SMAD7 และ GAPDH

Name	Sequence (5'-3')	Size product (bp)	Tm (°C)
Runx2	Forward : 5' CCCCACGACAACCGCACCAT 3' Reverse: 5' CACTCCGGCCCCACAAATC 3'	270	64
ALP	Forward : 5' TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA 3' Reverse: 5' ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC 3'	453	60
COL I	Forward : 5' TAACCACTGCTCCACTCTGG 3' Reverse: 5' GGACACAATGGATTGCAAGG 3'	461	60
SMAD2	Forward : 5' AGAGAGTTGAGACACCAGTTTTGC 3' Reverse: 5' ATAGTCATCCAGAGGCGGAAGTT 3'	86	60
SMAD7	Forward : 5' GAATCTTACGGGAAGATCAACCC 3' Reverse: 5' CGCAGAGTCGGCTAAGGTG 3'	67	60
GAPDH	Forward : 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' Reverse: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	452	60

4.4 การศึกษาผลของ DBM และ SIS ต่อการเกิด osteoblast differentiation ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay

4.4.1 ทำการศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเกิด osteoblast differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยแบ่งเป็นกลุ่มจากการกระตุ้น ดังนี้

- กระตุ้นด้วย SIS 5 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 2.5 มิลลิกรัม/flask ผสมกับ SIS 2.5 มิลลิกรัม/flask
- กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น)

เป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน จากนั้นทำการคำนวณวิเคราะห์ระดับการทำงานของ alkaline phosphatase โดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์

4.4.2 การศึกษาผลของ DBM ต่อการเกิด osteoblast differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือ โดยแบ่งเป็นกลุ่มจากการกระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM

4.5 การศึกษาผลของ DBM osteoblast differentiation ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay

การทดลองนี้ต้องการทดสอบการแสดงออกของ alkaline phosphatase ระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM และเซลล์ที่ได้รับ DBM โดยวิธี alkaline phosphatase staining assay ซึ่งทำได้โดยเซลล์จะถูก fix ด้วย formaldehyde/methanol แล้วทำการย้อมด้วย propandiol solution ซึ่งมี 1-naphthyl phosphate sodium salt เป็นสารตั้งต้น และ variamine blue B salt เป็นสารย้อม ปฏิบัติการที่ได้ผลลบต่อ alkaline phosphatase staining assay เซลล์จะติดสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าไม่มี osteoblastic differentiation ปฏิบัติการที่ได้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase staining assay เซลล์จะติดสีม่วงแดง แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก

4.6 การศึกษาการกระตุ้นให้เกิด new bone formation ของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในสัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลอง โดยทำการแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ทำการฝัง ดังนี้

- | | |
|-------------|--|
| กลุ่มควบคุม | - Gel foam® |
| กลุ่มทดลอง | - กระตุ้นด้วย SIS 20 มิลลิกรัม |
| | - กระตุ้นด้วย DBM 20 มิลลิกรัม |
| | - กระตุ้นด้วย DBM 10 มิลลิกรัม ผสมกับ SIS 10 มิลลิกรัม |

โดยทำการฝังสารตัวอย่างลงในชั้นกล้ามเนื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากครบกำหนดเวลา ทำการเก็บเนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อรอบ ๆ บริเวณที่ทำการฝังสารตัวอย่าง แล้วนำชิ้นเนื้อเนื้อมาทำการวิเคราะห์ โดยทำการย้อมสีด้วย hematoxylin & eosin เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณของกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่

การวิเคราะห์ข้อมูล

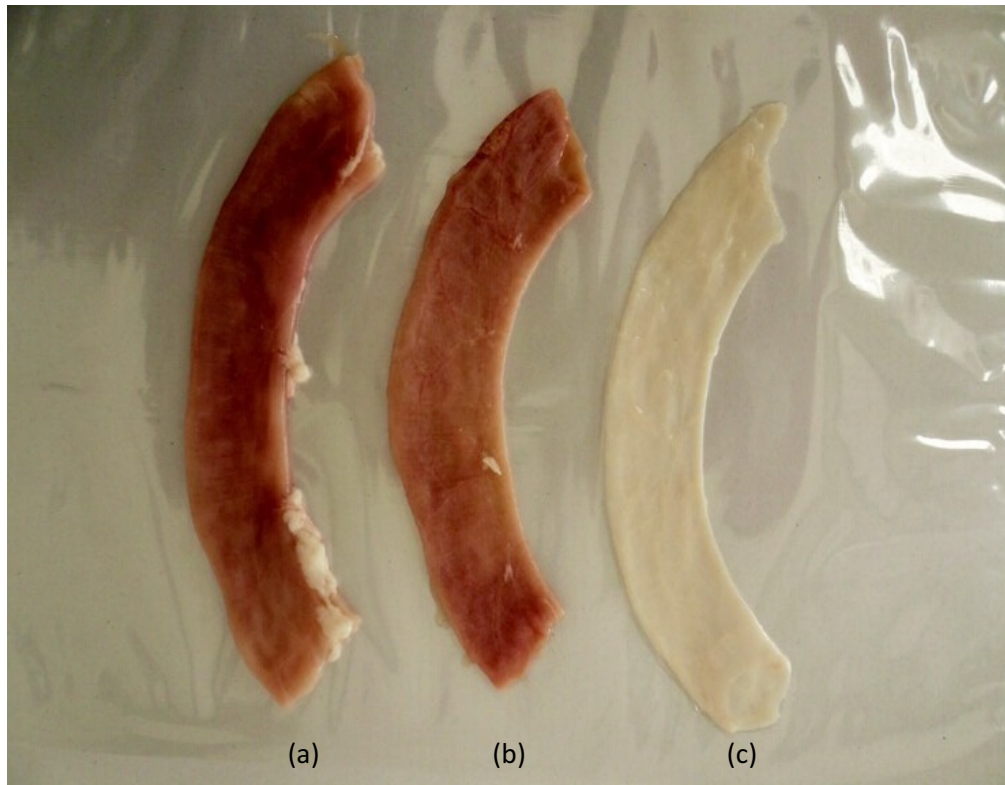
ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละกลุ่ม นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ได้แก่ unpaired t-test หรือ Chi-square tests โดยจะถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

การศึกษาศักยภาพในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหนูชั้นสับมิวโคซา และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ ในการเตรียมลำไส้หนูชั้น submucosa พบว่าหลังจากทำการลอกชั้น muscularis externa และชั้น serosa ออก ลำไส้หนูมีลักษณะเป็นเยื่อสีขาว มีความเหนียว (รูปที่ 2) จากนั้นนำลำไส้หนูส่วนที่ได้บดปั่นให้ละเอียดมากที่สุดแช่ใน 3 % acetic acid ผสมกับ 0.1% pepsin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งด้วยกระบวนการ lyophilization พบว่าลำไส้หนูมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนที่มีความเหนียว (รูปที่ 3) และจากการเตรียม DBM พบว่ามีลักษณะเป็นผงขนาดระหว่าง 125–850 ไมครอน มีสีขาวขุ่น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะของ DBM

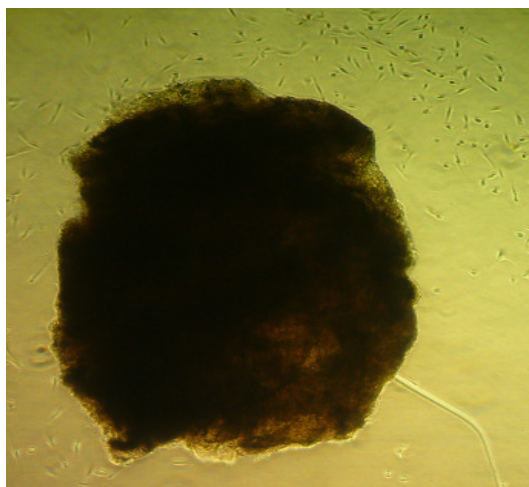


รูปที่ 2 ลักษณะของ (a) ลำไส้เล็กหมูสด
 (b) ลำไส้เล็กหมูชั้น muscularis externa
 (c) ลำไส้เล็กหมูชั้น submucosa

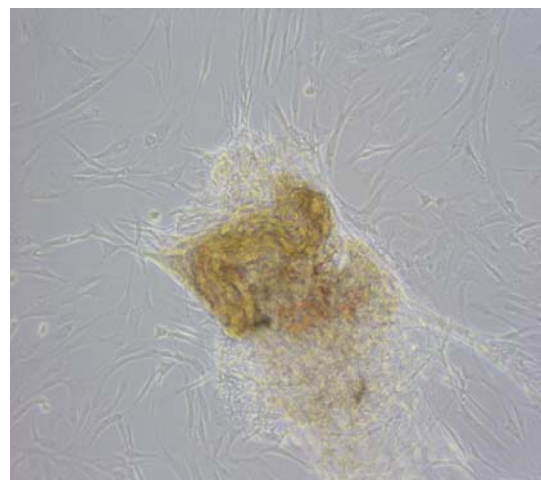


รูปที่ 3 ลักษณะของ SIS

การแยกเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือรกและเยื่อหุ้มกระดุก ด้วยวิธี outgrowth technique (primary cell culture) โดยนำเนื้อเยื่อสายสะดือรกจากการคลอดปกติ นำมาแยกตัดหลอดเลือดออก แล้วเก็บเนื้อเยื่อรอบหลอดเลือดที่เรียกว่า Wharton's jelly และเยื่อหุ้มกระดุก พบว่าหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน T25 flask เพื่อทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดุกเป็นเวลา 7 วัน พบมีเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบขึ้นเนื้อเยื่อเช่นเดียวกันกับจากสายสะดือ (รูปที่ 4) และเมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้น จึงทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการลอกเซลล์ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย 0.25% trypsin ทำการเพาะเลี้ยงใน T75 flask ที่มี α -MEM, 10% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือเซลล์ที่ได้มีรูปร่างหลายลักษณะ โดยส่วนใหญ่เซลล์มีรูปร่างเรียวยาวคล้ายกระสวย (spindle-shaped cells) และเซลล์รูปร่างกลมรีขนาดเล็ก และเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดุกมีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblast (รูปที่ 5) เมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดและวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดุก



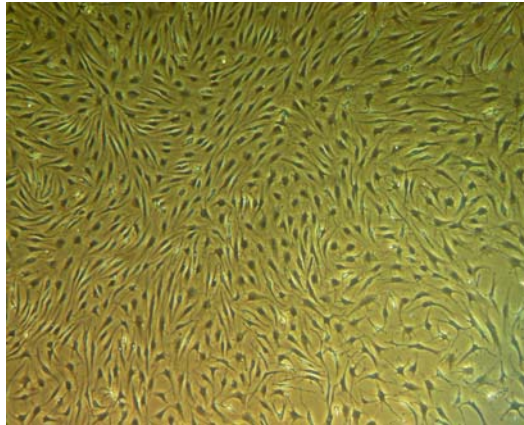
(a)



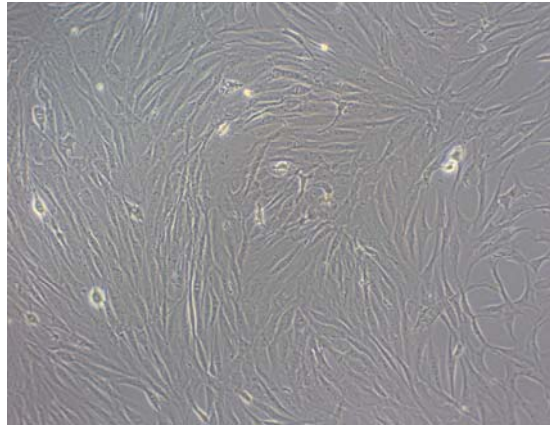
(b)

รูปที่ 4 เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบ (a) ขึ้นเนื้อเยื่อหุ้มกระดุก (กำลังขยาย x4)

(b) ขึ้นเนื้อเยื่อสายสะดือรก (กำลังขยาย x10)



(a)

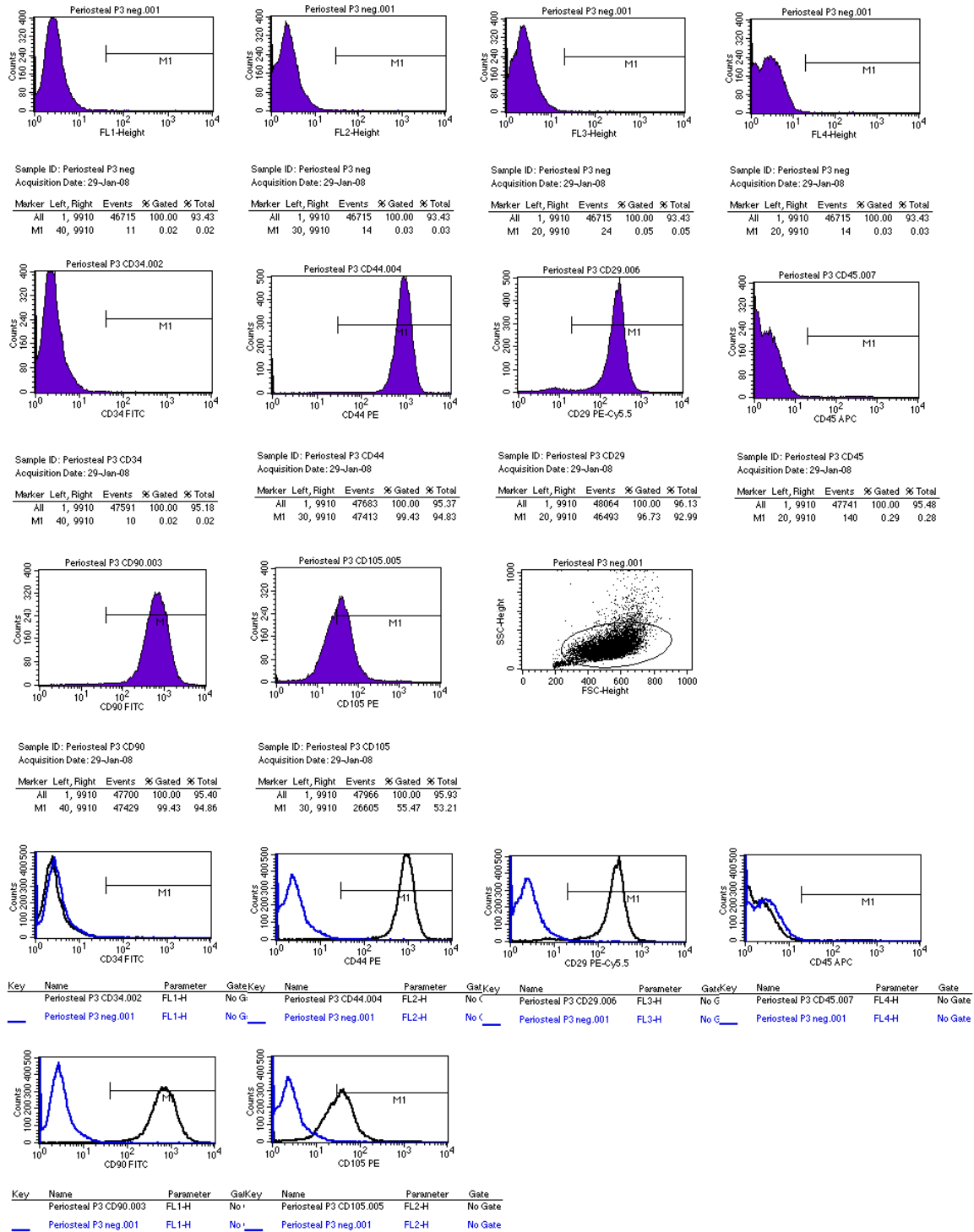


(b)

รูปที่ 5 ลักษณะของ (a) เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (กำลังขยาย x10)

(b) เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือรก (กำลังขยาย x10)

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์โดยเลือก CD34 และ CD45 ซึ่งเป็น hematopoietic stem cell (HSC) markers ใช้เป็น rule out exclusion และเลือก CD29, CD44, CD90 และ CD105 ซึ่งเป็น mesenchymal stem cell (MSC) marker (rule in inclusion) ปรากฏว่าเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อสายสะดือไม่มีการแสดงออกของ HSC markers (น้อยกว่า 1%) โดยมีการแสดงออกของ CD34 < 0.66% และ CD45 < 0.17% ตามลำดับ ในขณะที่มีการแสดงออกของ MSC markers ในระดับสูง (CD29, CD44, CD90 และ CD105 มีการแสดงออกจำนวน 99.50%, 99.36%, 99.51% และ 22.37% ตามลำดับ) (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงกล่าวในเบื้องต้นได้ว่าเซลล์ปฐมภูมิ Wharton's jelly derived cells มีคุณสมบัติของเซลล์ mesenchymal stem cells ส่วนเซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูก ปรากฏว่าไม่มีการแสดงออกของ HSC markers (น้อยกว่า 1%) โดยมีการแสดงออกของ CD34 < 0.02% และ CD45 < 0.29% ตามลำดับ ในขณะที่มีการแสดงออกของ MSC markers ในระดับสูง (CD29, CD44, CD90 และ CD105 มีการแสดงออกจำนวน 92.99%, 99.43%, 99.43% และ 55.47% ตามลำดับ) (รูปที่ 7) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลล์ปฐมภูมิ periosteal derived cells มีคุณสมบัติของเซลล์ mesenchymal stem cells



รูปที่ 7 แสดง 2D histogram จาก CD antigen ชนิดต่างๆของเซลล์ periosteal derived cells