



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณลักษณะของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจาก  
เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีรียดปริทันต์

โดย

ดร วีรชัย สิงห์นัตกิจ

มิถุนายน 2555

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณลักษณะของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห่องปฏิบัติการจาก  
เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อเอ็นดปริทันต์

ดร วีรัชย์ สิงหนัดกิจ

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ  
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

---

รหัสโครงการ: MRG5380193

ชื่อโครงการ: การศึกษาคุณลักษณะของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจากเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อเอ็นดอปรีทันต์

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร. วีรัชย์ สิงหนัดกิจ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

อีเมล: s-wrch@tu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกจากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเอ็นดอปรีทันต์ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ใช้โครงร่างรองรับเซลล์ โดยการเรียนรู้จะประเมินความสามารถในการเกิดก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกจากการเกิดผลึกแร่ธาตุ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระดูกใหม่ ปริมาณโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ผลการศึกษาพบว่าก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกสามารถสร้างได้จากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเอ็นดอปรีทันต์ในห้องปฏิบัติการและการเกิดก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกนี้ขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น โดยพบว่า เมื่อเทียบกับก้อนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการกระตุ้นให้เป็นกระดูก ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูก (ที่ได้รับการกระตุ้น) มีปริมาณผลึกแร่ธาตุ โปรตีน และการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส มากกว่าถึง 10 5 และ 4 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกยังมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระดูกใหม่สูงกว่าก้อนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อนำก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกกลับไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ปกติ พบว่ามีเซลล์เจริญออกมาจากก้อนเนื้อเยื่อดังกล่าวได้ การศึกษานี้สรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเอ็นดอปรีทันต์มีศักยภาพในการใช้สร้างก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกสามมิติในห้องปฏิบัติการโดยไม่ใช้โครงร่างรองรับเซลล์

คำหลัก : จำนวน 3-5 คำ

Abstract

---

Project Code : MRG5380193

Project Title : Characterization of *in vitro* bone-like pellets in micromass culture of putative periodontal ligament stem cells

Investigator : Dr. Weerachai Singhatanadgit

E-mail Address : s-wrch@tu.ac.th

Project Period : 2 years

**Abstract:**

*Objective:* The present study was aimed to investigate the osteogenic potency of scaffold-free three-dimensional (3D) spheres of periodontal ligament stem cells (PDLSCs). *Study Design:* The osteogenic potency of PDLSC spheres was determined by the ability to form mineralization and to express key osteogenesis-associated genes. The alkaline phosphatase (ALP) activity and the protein content of PDLSC spheres were also measured. *Results:* The 3D sphere developed its osteogenic potency in a time-dependent manner, containing approximately 10 folds higher of the mineralization, 5 folds higher protein content and 4 folds greater ALP activity than those in the controls. The expression of key osteogenic genes was also up-regulated in the 3D PDLSC spheres. Cellular outgrowth was observed when re-introduced into 2D culture. *Conclusion:* PDLSCs were able to undergo osteogenic differentiation in a scaffold-free 3D culture, producing bone-like mineralization *in vitro*. This suggests, at least *in vitro*, the osteogenic potency of the 3D PDLSC spheres.

Keywords : Sphere; Stem cells; Mineralization; Periodontal ligament; Bone engineering

### บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกจากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเอ็นดอทีรันทันต์ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ใช้โครงร่างรองรับเซลล์ โดยการศึกษานี้จะประเมินความสามารถในการเกิดก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกจากการเกิดผลึกแร่ธาตุ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระดูกใหม่ ปริมาณโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ผลการศึกษาพบว่าก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกสามารถสร้างได้จากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเอ็นดอทีรันทันต์ในห้องปฏิบัติการและการเกิดก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกนี้ขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น โดยพบว่า เมื่อเทียบกับก้อนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการกระตุ้นให้เป็นกระดูก ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูก (ที่ได้รับการกระตุ้น) มีปริมาณผลึกแร่ธาตุ โปรตีน และการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส มากกว่าถึง 10 5 และ 4 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกยังมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระดูกใหม่สูงกว่าก้อนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อนำก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกกลับไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ปกติ พบว่ามีเซลล์เจริญออกมาจากก้อนเนื้อเยื่อดังกล่าวได้ การศึกษานี้สรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเอ็นดอทีรันทันต์มีศักยภาพในการใช้สร้างก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกสามมิติในห้องปฏิบัติการโดยไม่ใช้โครงร่างรองรับเซลล์

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

*Objective:* The present study was aimed to investigate the osteogenic potency of scaffold-free three-dimensional (3D) spheres of periodontal ligament stem cells (PDLSCs). *Study Design:* The osteogenic potency of PDLSC spheres was determined by the ability to form mineralization and to express key osteogenesis-associated genes. The alkaline phosphatase (ALP) activity and the protein content of PDLSC spheres were also measured. *Results:* The 3D sphere developed its osteogenic potency in a time-dependent manner, containing approximately 10 folds higher of the mineralization, 5 folds higher protein content and 4 folds greater ALP activity than those in the controls. The expression of key osteogenic genes was also up-regulated in the 3D PDLSC spheres. Cellular outgrowth was observed when re-introduced into 2D culture. *Conclusion:* PDLSCs were able to undergo osteogenic differentiation in a scaffold-free 3D culture, producing bone-like mineralization *in vitro*. This suggests, at least *in vitro*, the osteogenic potency of the 3D PDLSC spheres.

## Executive Summary

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยที่มีความพิการของกระดูกอันเนื่องมาจากความผิดปกติ พิการ หรือต้องสูญเสียอวัยวะในบริเวณกะโหลกศีรษะและใบหน้าจากสาเหตุต่างๆ อาทิ โรคมะเร็งในช่องปาก อุบัติเหตุ ความพิการแต่กำเนิด (ปากแหว่ง เพดานโหว่) ตลอดจนโรคปริทันต์อักเสบ ต้องอาศัยวัสดุทดแทนไม่ว่าจะเป็นวัสดุที่ได้จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้น เพื่อใช้ในการซ่อมแซมและทดแทนเนื้อเยื่อกระดูกที่สูญเสียหรือถูกทำลายไป แต่เนื่องจากวัสดุเหล่านี้ยังคงมีข้อจำกัดที่ทำให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร จึงได้มีการคิดค้นวิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue engineering) เพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูกที่ถูกทำลายไปขึ้นใหม่และมีแนวโน้มที่จะได้รับการพัฒนาให้เป็นวิธีการรักษามาตรฐานในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถชดเชยข้อด้อยและมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม วิธีการนี้อาศัยองค์ประกอบหลักสามประการ คือ 1) เซลล์ ซึ่งปัจจุบันส่วนใหญ่จะหมายถึงเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) เนื่องจากคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ได้อย่างรวดเร็วและไม่มีขีดจำกัด ตลอดจนสามารถพัฒนาการ (differentiate) ไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ รวมถึงเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ได้ในภาวะที่เหมาะสม (Bianco and Robey, 2001) 2) scaffold หรือ matrix และ 3) โมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecules) รวมถึง ไซโตไคน์ (cytokines) โกรทแฟกเตอร์ (growth factors) และ ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factors) ซึ่งส่งเสริมการแบ่งตัวและการพัฒนาการของเซลล์ต้นกำเนิดไปสู่เซลล์ที่ต้องการ (Langer and Vacanti, 1993).

การค้นพบเซลล์ที่มีลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดในเนื้อเยื่อจากช่องปาก ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อในโพรงฟัน (dental pulp-derived stem cells, DPSCs) (Gronthos *et al.*, 2000) จากฟันน้ำนม (stem cell from exfoliated deciduous teeth, SHED) (Miura *et al.*, 2003) รวมถึงจากเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament-derived stem cells, PDLSCs) (Seo *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นแหล่ง (source) ที่สามารถเข้าถึงและเก็บเนื้อเยื่อมาใช้ได้ง่าย ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเป็นความหวังใหม่ของการรักษาผู้ป่วยในรูปแบบเวชศาสตร์การฟื้นฟูสภาพ (regenerative medicine) และยังส่งผลให้วงการทันตแพทย์ตื่นตัวและหันมาให้ความสนใจในความเป็นไปได้ของการนำเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย ขณะนี้คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยก PDLSCs

บริสุทธิ์โดยเทคนิค cloning และสามารถเพาะเลี้ยงให้เซลล์นี้พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูก (bone-like pellets) ได้ในห้องปฏิบัติการ (Singhatanadgit et al., 2009)

ดังที่กล่าวข้างต้น วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเพื่อรักษาความพิการของกระดูกต้องอาศัย scaffold เพื่อเป็นโครงร่างให้เซลล์ต้นกำเนิดเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและสร้างกระดูกต่อไป โดยส่วนใหญ่ scaffold ที่ใช้จะเป็นวัสดุสังเคราะห์ (artificial/synthetic scaffold) หรือ วัสดุธรรมชาติ (natural matrix scaffold) อย่างไรก็ตามการใช้ scaffold ทั้งสองประเภทนี้ยังมีข้อถกเถียงกันอยู่ทั้งในเรื่องความปลอดภัยและคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่น ปัญหาที่ว่าเนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธ์ที่มักได้มาจากรกของกระดูกนั้น หลังจากผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อการเก็บรักษาแล้วมักจะสูญเสียคุณสมบัติเชิงกลของกระดูกไปและยังอาจเกิดปัญหาการติดเชื้อจากผู้บริจาค (disease transmission) (Vaccaro, 2002) ส่วนวัสดุสังเคราะห์นั้น นอกจากไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างกระดูก (osteoinductive) แล้วยังอาจกระตุ้นกระบวนการอักเสบของร่างกายได้ในระยะยาว (Bianco and Robey, 2001; Risbud and Shapiro, 2005) ความไม่แน่นอนในเรื่อง biocompatibility และ biodegradability ของ artificial scaffold (Freed et al., 1998) และยังมีปัญหาที่วัสดุเหล่านี้ไม่สามารถเกิดการ remodeling ไปพร้อมกับกระดูกที่อยู่โดยรอบได้ (Bucholz, 2002) การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย micromass culture technology เพื่อใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกจึงกำลังได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ scaffold (Handscheil et al., 2007) อย่างไรก็ตาม ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานในการสร้างก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกโดยใช้ PDLSCs ร่วมกับ micromass culture ยังมีจำกัดมาก โครงการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาคุณลักษณะของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกจาก PDLSCs ในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิค osteogenic micromass culture ซึ่งถือเป็นการวิจัยพื้นฐานเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่จะนำไปใช้ในการวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (osteogenesis-related genes) ของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจากการเพาะเลี้ยง PDLSCs โดยใช้เทคนิค osteogenic micromass culture



- 2) เพื่อวัดระดับ alkaline phosphatase (ALP) activity ของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจากการเพาะเลี้ยง PDLSCs ด้วยเทคนิค osteogenic micromass culture
- 3) เพื่อวัดปริมาณและการกระจายตัวของ mineralized nodules ในก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจากการเพาะเลี้ยง PDLSCs ด้วยเทคนิค osteogenic micromass culture
- 4) เพื่อประเมินความอยู่รอด (viability) ของเซลล์ในก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจากการเพาะเลี้ยง PDLSCs ด้วยเทคนิค osteogenic micromass culture

### 3. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) ในห้องปฏิบัติการที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อเอ็นดัยทรีทันต์

#### 1) การเพาะเลี้ยง และดูแล PDLSCs

ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ PDLSCs ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Prof I Olsen ซึ่งเป็นนักวิจัยที่ปรึกษาของโครงการนี้ โดยเซลล์ดังกล่าวได้ผ่านการทดสอบว่ามีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด (Singhatanadgit et al., 2009) โดยเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 cm<sup>2</sup> โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงชนิด  $\alpha$  minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) ที่ประกอบด้วย FCS 15 % และมี penicillin และ streptomycin เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 37°C ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด เมื่อเซลล์จน confluent แล้ว detach เซลล์ด้วย trypsin-EDTA และตรวจสอบว่าเซลล์ที่ detached แล้วมีการกระจายตัว (disperse) ไม่เกาะเป็นกลุ่มก้อน โดยดูจากกล้อง light microscope นำเซลล์นี้ไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอัตราส่วน 1:6 ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 cm<sup>2</sup> เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 2) เทคนิค osteogenic micromass culture เพื่อสร้างก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกในห้องปฏิบัติการจาก PDLSCs

นำ cell pellets ของ PDLSCs (จำนวน  $2.5 \times 10^5$  เซลล์) มาเพาะเลี้ยงใน  $\alpha$ -MEM ที่ประกอบด้วย 10% FCS 1% penicillin/streptomycin (control samples) และเพาะเลี้ยงใน  $\alpha$ -MEM ที่ประกอบด้วย 10% FCS 1% penicillin/streptomycin 100 nM dexamethasone 0.1 mM L-ascorbic acid 2-phosphate และ 10 mM  $\beta$ -

glycerophosphate (osteogenic media; OM) (OM samples) โดยเปลี่ยน OM ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ จากนั้นนำ control samples และ OM samples ไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆดังรายละเอียดด้านล่าง

### 3) การทดสอบการแสดงออกของ osteoblastic markers (Runx2, Osx, Dlx5, ALP, BSP, OC) mRNA โดยวิธี quantitative real-time PCR

สกัด total RNA จาก control samples และ OM samples ที่มีอายุ 3 7 14 และ 21 วัน โดยใช้ RNeasy Kit (Qiagen) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต mRNA จะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA (reverse transcription) ขั้นตอนการทำ quantitative real-time PCR เริ่มโดยเจือจาง cDNA ที่ได้ข้างต้นด้วย nuclease-free water ในอัตราส่วน (1:2) ปฏิบัติ PCR นี้จะทำใน 96-well plates โดยใช้ primers และ probe ที่เฉพาะเจาะจงกับ sequence ของ Runx2 Osx Dlx5 ALP BSP และ OC) และทำการทดสอบใน iQ5 BioRad thermocycler ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ Runx2 Dlx5 ALP BSP และ OC mRNA (relative quantification) โดยใช้วิธี comparative C<sub>T</sub> method (Livak and Schmittgen, 2001) โดยใช้ GAPDH เป็น endogenous control

### 4) การวัด ALP activity โดย วิธี biochemical method

การวัด ALP activity ทำได้โดยสกัดแยกโปรตีนจาก ก้อนเนื้อเยื่อ control samples และ OM samples ที่มีอายุ 3 7 14 และ 21 วัน มาผสมกับ 10 mM *p*-nitrophenyl-phosphate จากนั้นทำการวัดปริมาณของ *p*-nitrophenol (PNP) โดยอ่านค่า absorbance ที่ 405 nm และค่าของ activity จะคำนวณจาก สารละลาย PNP standard

### 5) การเตรียม paraffin-embedded sections

Sections ของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกอายุ 3 สัปดาห์ จะถูกเตรียมด้วยวิธี paraffin-embedded method และทดสอบการสร้าง mineralized nodule ตามรายละเอียดด้านล่าง

### 6) การทดสอบการสร้าง mineralized nodule โดย Alizarin Red S staining

นำ sections ของก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกและ ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูก อายุ 3 สัปดาห์ ย้อมด้วย 1% Alizarin Red S (pH 4.2) นาน 15 นาที และทำการสกัดสีและวัด optical density (OD) ของสี Alizarin Red S จาก ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกโดยใช้ spectrophotometer

### 7) การทดสอบ viability ของเซลล์ในก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูก

นำ control samples และ OM samples อายุ 3 สัปดาห์ มาทดสอบ viability ของเซลล์ในก้อนเนื้อเยื่อ  
คล้ายกระดูกโดยดู re-outgrowth ของเซลล์ออกจากก้อนเนื้อเยื่อคล้ายกระดูกบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา  
1-2 สัปดาห์ และตรวจสอบ re-outgrowth ของเซลล์จากก้อนเนื้อเยื่อกระดูกภายใต้ light microscope

#### 8) การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม SPSS ผลการทดลองที่ได้จะแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จาก  
ตัวอย่างอย่างน้อย 3 ตัวอย่างต่อกลุ่ม และในแต่ละชุดของการทดลองจะทำในลักษณะเดียวกันซ้ำอีกอย่างน้อย 3  
ครั้ง และใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) และ Bonferroni test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทาง  
สถิติที่  $p < 0.05$

#### 4. แผนการดำเนินการวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรมขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือนที่ (ระยะเวลา 24 เดือน)				ผลที่จะได้รับ
	1-6	7-12	13-18	19-24	
1. เพาะเลี้ยงและดูแล PDLSCs	↔				ได้ PDLSCs จำนวนมากพอเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป
2. ทดสอบการแสดงออกของ osteogenic genes ใน micromass samples โดยใช้ Real-time PCR	↔	↔			ทราบถึงการแสดงออกของ osteogenic genes ใน OM samples เปรียบเทียบกับ ใน control samples
3. วัด ALP activity ใน micromass samples ด้วย biochemical method		↔			ทราบถึง ALP activity ของ OM samples เปรียบเทียบกับ ใน control samples
4. ทดสอบการสร้าง mineralized nodule จาก micromass samples โดยตรง			↔		ทราบถึงปริมาณ mineralized nodules ของ OM samples เปรียบเทียบกับใน control samples
5. ทดสอบการสร้าง mineralized nodule จาก micromass sample sections			↔		ทราบถึงปริมาณและการกระจายตัวของ mineralized nodules ของ OM samples เปรียบเทียบกับใน control samples
6. ทดสอบ viability ของเซลล์ในก้อน micromass samples			↔		ทราบถึง viability ของเซลล์ใน OM samples เปรียบเทียบกับใน control samples
7. วิเคราะห์ผลและเขียนรายงานผล				↔	รายงานผลการวิจัย

## 5. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่คาดว่าจะตีพิมพ์

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: -

ชื่อวารสารนานาชาติที่คาดว่าจะตีพิมพ์: -

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Characterization of *in vitro* bone-like pellets in

a micromass culture of putative periodontal ligament stem cells

ชื่อวารสารนานาชาติที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Tissue Engineering Part A (มี impact factor 4.697)

## 6. งบประมาณโครงการ

รายการ	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ			
- ค่าสารเคมีและน้ำยาสำหรับสกัด RNA และการทำ real-time PCR	90,000	-	90,000
- ค่าสารเคมีและน้ำยาสำหรับ ALP	10,000	-	10,000
- ค่าอาหารเหลว สารเคมี และพัสดุในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด	10,000	40,000	50,000
- ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์และน้ำยาทั่วไป	10,000	30,000	40,000
- ค่าสารเคมีและน้ำยาสำหรับ alizarin red assay	-	20,000	20,000
- ค่าเตรียมเนื้อเยื่อและ paraffin sections	-	30,000	30,000
3. หมวดค่าใช้สอย	-	-	-
4. หมวดค่าจ้าง	-	-	-
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

## Objectives

- 1) To examine the expression of osteogenesis-related genes in osteogenic micromass of PDLSC *in vitro*
- 2) To measure the ALP activity in the osteogenic micromass of PDLSC *in vitro*
- 3) To quantify and localize mineralized nodules in the osteogenic micromass of PDLSC *in vitro*
- 4) To assess the viability of the osteogenic micromass of PDLSC *in vitro*

## **Materials and Methods**

### **Culture of PDLSCs**

PDLSCs were kindly provided by Prof I Olsen from the UCL Eastman Dental Institute, London, UK. The PDLSCs were previously shown to possess characteristic features of stem cells.<sup>15</sup> Cells were cultured in  $\alpha$ -Modified Eagle's Medium ( $\alpha$ -MEM) (Gibco Life Technologies Ltd, Paisley, UK) containing 15% fetal calf serum (FCS) (PAA Laboratories, Yeovil, UK) (15% FCS-MEM) supplemented with 200 U/ml penicillin, 200  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (all from Gibco) (standard medium) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Cells between passages 3 and 5 were used.

### **3D spheroid culture and osteogenic induction of PDLSCs**

Conical polypropylene tubes were used for the formation of 3D sphere by aggregation of PDLSCs, as previously described with some modifications.<sup>15</sup> Briefly, a cell suspension ( $1 \times 10^6$  cells) was centrifuged at 200 g for 5 min in a 15 ml polypropylene tube. The cells were resuspended with 1 ml of standard medium, centrifuged at 200 g for 5 minutes and incubated at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The samples were changed to cultured in standard medium and in osteogenic medium (OM; 10% FCS-MEM and osteogenic supplements containing dexamethasone, ascorbate-phosphate, and  $\beta$ -glycerolphosphate) to form non-induced and OM-induced PDLSC spheres, respectively, (defined as samples at Day 0) at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> for up to 21 days, with the culture media being changed every three days.

### **Alizarin red S staining and quantification**

Non-induced and OM- induced spheres obtained at 21 days of culture were fixed with cold methanol for 30 min at 4°C and washed with distilled water. The samples were

incubated for 10 min at room temperature with 1% alizarin red S (Sigma) (pH 4.2), rinsed twice with cold methanol and photographed. Mineralization of the ECM was visualized as bright red deposits, which were quantified by solubilizing in 10% cetylpyridinium chloride (Sigma) and measuring the absorbance at 570 nm ( $A_{570}$ ). The  $A_{570}$  thus corresponds to the amount of ECM mineralization.

#### **Preparation of paraffin section and Hematoxylin & Eosin (H&E) staining**

PDLSC spheres were prepared and cultured in OM for 21 days, as described above, with the culture media being changed every three days. The samples were fixed with 4% paraformaldehyde (PFM). Paraffin sections (5  $\mu$ m) were prepared and were stained with H&E and with alizarin red S, as described above.

#### **RNA extraction and Quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR)**

Total RNA was extracted from the PDLSC spheres using RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, West Sussex, UK), in accordance with manufacturer's instructions. To assess the quality of the extracted RNA and as an internal RT-PCR standard, the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also amplified. For reverse-transcription reaction, 1  $\mu$ g of total RNA were used with 5 ng oligo-dT (Promega, Madison, WI) in 40  $\mu$ l of water. After 5 min at 65°C, the first strand of cDNA was synthesized in a total volume of 50  $\mu$ l, containing 50 U of cloned Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) reverse transcriptase, 1x M-MuLV buffer, 40  $\mu$ M of each dNTP, and 40 U of RNase block (all Stratagene, La Jolla, CA). After incubation at 37°C for 60 min, the enzyme was inactivated by incubation for 5 min at 90°C, after which 1  $\mu$ l of each cDNA sample were used in Q-PCR, as described below.



The cDNA were used for amplifications performed with specific primers for the runt-related transcription factor 2 (Runx2), distal-less homeobox 5 (Dlx5), alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OC) and GAPDH genes (Applied Biosystems, Cheshire, UK), the sequences of which were designed with the Primer Express<sup>®</sup> program from Applied Biosystems. Q-PCR using the TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay in an ABI Prism<sup>®</sup> 7300 Sequence Detector was performed in accordance with manufacturer's instructions. All PCR reactions were performed in triplicate and each of the signals was normalized to the GAPDH signal in the same reaction.

#### **Measurement of PDLSC sphere metabolic activity**

Metabolic activity of the samples was determined by an increase in their protein content and a key osteogenic enzyme ALP activity. For total protein measurement, samples were gently washed twice with PBS and lysed in ice cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF) and 1 µg/ml of each of aprotinin, leupeptin, pepstatin (all from Sigma). Protein concentration was measured using the Biorad DC protein assay kit (Biorad, Hemel Hempstead, UK). For the determination of ALP activity, lysis buffer (20mM Tris, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1% Triton X) was added to each sample. Cell lysates were then centrifuged at 2500 rpm for 30 min and supernatants were obtained for analysis. The aliquots with an equal amount of protein content were analyzed for ALP activity by addition of 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP, Sigma), incubated at 37°C for 10 min and the reaction was then stopped by 3 N NaOH. The

amount of *p*-nitrophenol (*p*-NP) produced, corresponding to the ALP activity, was measured at A<sub>405</sub>.

#### **Viability Assay for PDLSC spheres**

The viability of PDLSC spheres was determined by their ability to re-outgrowth from the 3D sphere when re-introduced into 2D cell culture system. PDLSC spheres were cultured in standard culture medium and in OM for 21 days, and the samples were transferred into standard 2D cell culture dishes for 7 days. The samples were then fixed with 4% PFM and stained with 0.25% crystal violet. Alizarin red S staining was also performed to confirm the presence of matrix mineralization, as described above.

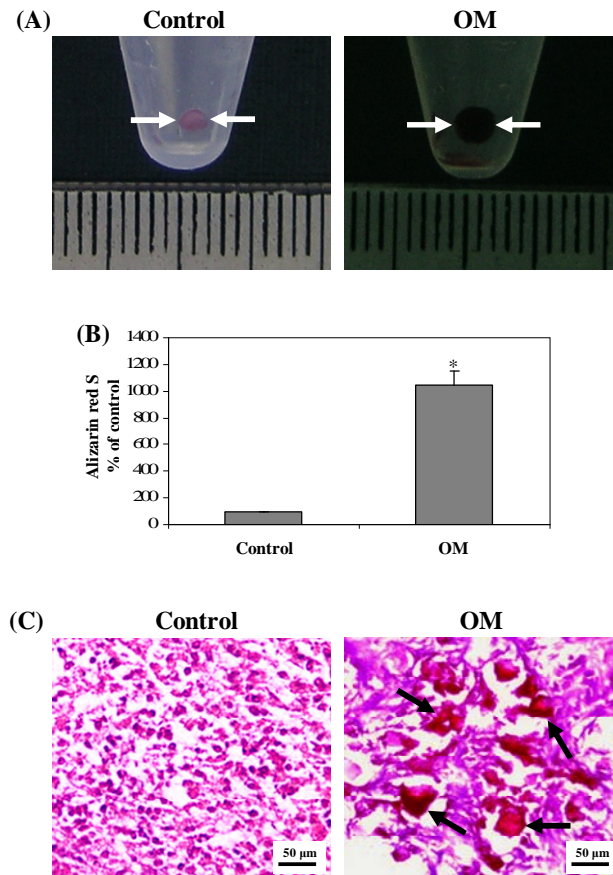
#### **Statistical analysis**

The data are presented as the mean  $\pm$  SD of measurements from three independent samples, with the experiments being performed in triplicate. Statistical differences between the mean of the test group (or the samples at Days 3, 7, 14 and 21) and the control group (or the samples at Day 0) were analyzed by single sample *t*-test, with  $p < 0.05$  considered significant. The *t*-test program in the SPSS 11.0 software (SPSS, Chicago, IL) was used for the analyses.

## Results

### ECM mineralization of PDLSC spheres

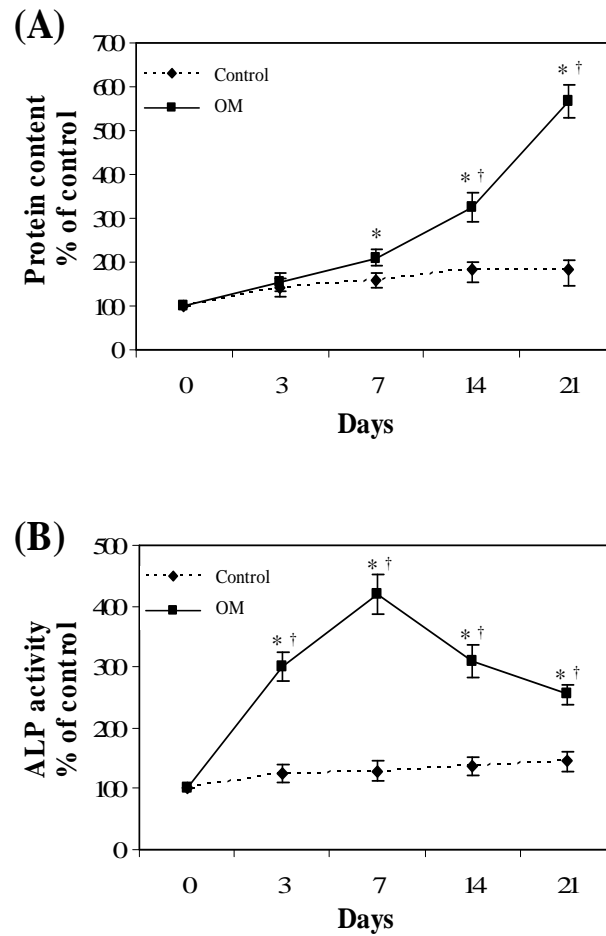
The results of alizarin red S staining in Fig. 1A show that OM-induced spheres were positive to alizarin red S while control non-induced spheres appeared to be negative. Moreover, while samples in OM had diameter of approximately  $3 \pm 0.2$  mm, samples in control culture media had a smaller diameter of  $2 \pm 0.2$  mm ( $p < 0.05$ ) with a slight irregularity in shape. A summary of the amount of alizarin red S-positive mineralized ECM is shown in Fig. 1B, which revealed that OM-induced samples contained approximately 10 folds higher of the mineralization compared with the non-induced samples ( $p < 0.05$ ). Representative H&E and alizarin red S staining results in Fig. 1C show the presence of bone-like deposits in the OM-induced sphere, as indicated by arrows. Spheroid cultures of PDLSCs in standard media did not form any mineralized deposit that could be observed by either H&E or alizarin red S staining (Fig.1C).



**Fig.1.** ECM mineralization of PDLSC spheres. PDLSCs were cultured as 3D spheres in standard culture medium and in OM for 21 days, as described in the Materials and Methods. Panel A shows representative alizarin red S staining of spheres cultured in standard culture media (control) and in OM. Similar results were observed in three separate experiments. In Panel B, quantification of stained alizarin red S extracted (per 1 mg of protein) from control non-induced spheres and from OM-induced spheres is summarized. The data are expressed as the mean percent  $\pm$  SD of extracted alizarin red S compared with that of the control sample, defined as 100%. Results are from one representative experiment of three independent experiments. \*  $p < 0.05$  vs control. In Panel C, paraffin sections were prepared from control non-induced and OM-induced spheres and the sections were stained using H&E and alizarin red S, as described in the Materials and Methods. Representative H&E and alizarin red S staining sections are shown here. Arrows indicate alizarin red S-positive deposits.

### **Metabolic activity of PDLSC spheres**

In the present study, metabolic activity of the spheres was examined by determining the total protein content and the activity of an important osteogenic enzyme ALP. The results revealed that compared with control non-induced samples, only little change in the level of the protein content in OM-induced samples at Day 3 and Day 7 was observed ( $p>0.05$ ) whereas the protein content was significantly increased by approximately 300% and 550% at Day 14 and Day 21, respectively ( $p<0.05$ ) (Fig. 2A). In addition, the results in Fig. 2B show that the ALP activity in OM-induced spheres was significantly up-regulated over the course of osteoblast differentiation of PDLSC spheres (Day 3-Day 21) compared with that in control spheres ( $p<0.05$ ), with the peak expression being observed at Day 7 (approximately 400% up-regulation).



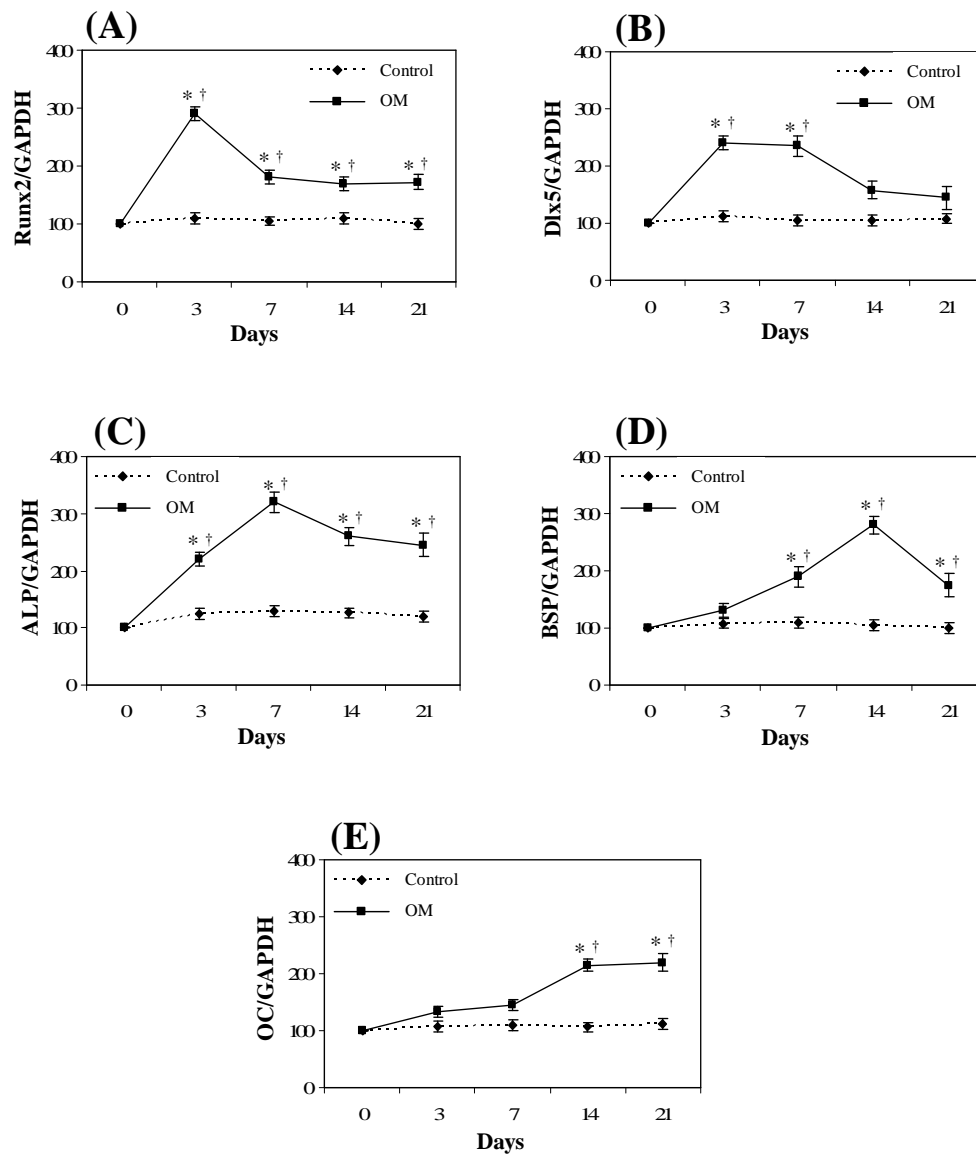
**Fig. 2.** Metabolic activity of PDLSC spheres. In Panel A, the protein content of control non-induced and OM-induced spheres was measured at the indicated times, as described in the Materials and Methods. The data are expressed as the mean percent protein  $\pm$  SD compared with that of the sample on Day 0, defined as 100%. \*  $p < 0.05$  vs sample at Day 0;  $^{\dagger} p < 0.05$  vs control non-induced sample at the same culture periods. In Panel B, the ALP activity of control non-induced and OM-induced spheres was measured at the indicated times, as described in the Materials and Methods. The data are expressed as the mean percent ALP activity  $\pm$  SD compared with that of the sample on Day 0, defined as 100%. \*  $p < 0.05$  vs sample at Day 0;  $^{\dagger} p < 0.05$  vs control non-induced sample at the same culture periods.

### **Expression of the osteogenesis-related genes in PDLSC spheres**

The expression of key osteogenesis-associated genes, *i.e.*, Runx2, Dlx5, ALP, BSP and OC, in PDLSC spheres during the course of osteoblast differentiation (0-21 days) was examined by Q-PCR. The results showed that while the expression of these osteogenic genes in the control non-induced sphere appeared to be unchanged throughout the times studied, the expression of these genes was differentially regulated in the OM-induced spheres (Fig. 3). The results in Fig. 3A demonstrate that the expression of a pivotal osteogenic transcription factor Runx2 in OM-induced spheres was significantly up-regulated throughout the entire course of osteogenic induction compared with that in control spheres ( $p<0.05$ ), with the peak expression being observed at Day 3 (approximately 300% up-regulation). In Fig.3B, increased expression of another important osteogenic transcription factor Dlx5 was observed from Day 3 to Day 7 (200% increase;  $p<0.05$ ) although its expression was gradually decreased thereafter. As with Runx2, the results in Fig. 3C show that the expression of ALP in OM-induced spheres was significantly up-regulated over the course of osteoblast differentiation of PDLSC spheres (Day 3- Day21) compared with that in control spheres ( $p<0.05$ ), with the peak expression being observed at Day 7 (approximately 300% up-regulation). The expression of BSP appeared to be gradually increased from Day 0 to Day14 (Fig. 3D). Compared with the expression level observed in Day 0, BSP expression was increased by approximately 200% at Day 7 ( $p<0.05$ ), reached its peak of a 300% increase at Day 14 ( $p<0.05$ ) and down-regulated thereafter to the level observed at Day7 at the end of the course of osteogenic induction tested (Day 21) (Fig. 3D). Moreover, the expression of OC, a marker associated with the late stage of osteoblast differentiation, in spheroid culture was not

stimulated by osteogenic induction in the early time points, but it was significantly up-regulated and reached its expression peak from Day 14 to Day 21 (approximately 200% up-regulation;  $p<0.05$ ) (Fig. 3E).

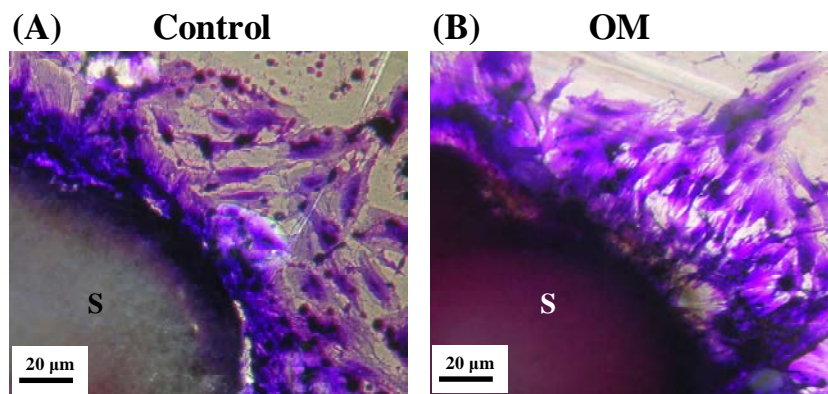




**Fig. 3.** Expression of the osteogenesis-related genes in control non-induced and OM-induced PDLSC spheres. Total RNA was extracted from the samples at the indicated times and the Q-PCR analysis for Runx2, Dlx5, ALP, BSP and OC genes is summarized in Panels A-E, respectively. The Q-PCR results are presented as the mean percent  $\pm$  SD of the level of each of transcript relative to that of GAPDH, defined as 100% in sample at Day 0. \*  $p < 0.05$  vs sample at Day 0;  $^{\dagger} p < 0.05$  vs control non-induced sample at the same culture periods.

### Viability of osteogenic PDLSC spheres

The viability of 3D PDLSC spheres was determined by the presence of cellular re-outgrowth when re-introduced into 2D culture dishes. The results demonstrated that following osteogenic culture of 3D spheres for 21 days, cellular outgrowth mimicking that of normal tissue-derived primary explanted cells was first detected within 24 h at the periphery of spheres in 2D culture dishes (data not shown). After 7 days, a discernable number of cells surrounding the spheres were observed (Fig. 4B). Similar pattern of cellular re-outgrowth was also found in non-induced PDLSC spheres (Fig. 4A). Alizarin red S staining confirmed the formation of mineralization in osteogenic-induced PDLSC spheres (Fig. 4B).



**Fig. 4.** Viability of non-induced PDLSC spheres (A) and OM-induced PDLSC spheres (B). PDLSCs were cultured as a 3D sphere in standard culture medium (control) and in OM medium for 21 days, and the samples were transferred to maintain in a conventional 2D cell culture dish for 7 days. The samples were then stained with alizarin red S and crystal violet as described in the Material and Methods. S: sphere.

## Discussion

Regeneration of certain microtissues can be obtained by a re-aggregation approach using a 3D culture technique.<sup>16,17</sup> While most investigations concerning 3D culture technology were performed in developmental studies (such as chondrogenesis in skeletal development),<sup>18,19</sup> little is known about the use of this technique in tissue engineering, including bone engineering.<sup>6</sup> In the present study, we have established that using highly purified PDLSCs, the formation of viable bone-like 3D spheres could be achieved without the use of non-physiologic scaffold *in vitro*. Developing osteogenic PDLSC spheres expressed a number of key markers related to osteoblast differentiation and contained calcified deposits positive to alizarin red S staining. In addition, following long term maintenance of the osteogenic spheres *in vitro*, cells in the 3D PDLSC spheres remained viable and highly active when re-introduced into a conventional 2D culture.

The bone-like 3D culture technology depends significantly on the presence of the ECM, which exerts both direct and indirect impacts on osteoprogenitors and consequently modulates their behavior and function.<sup>6</sup> Moreover, these cells influence the composition of the ECM in a variety of fashions, including differential expression of certain ECM protein components and/or proteolytic enzymes by cells in the surrounding microenvironment via adhesion molecule-mediated cell-to-cell and cell-to-ECM interactions.<sup>6,20-25</sup> It has been reported that in 3D culture, cells had numerous cell-to-cell contacts both focal points and apposition with long plasma membrane areas.<sup>11</sup> Microspheroid cultures formed in a high density multilayer manner contain abundant extracellular collagen fibrils whereas monolayer cultures show only a small amount of collagen fibrils in the ECM.<sup>11</sup> It has also been shown that cells in cultured spheres formed a multilayer of cells and possessed a

high number of rough endoplasmic reticulum, mitochondria, ribosomes and vesicles,<sup>11</sup> indicating that cells are highly active in protein synthesis and metabolic activity, as also observed in the PDLSC spheres in the present study. A significantly high protein synthesis in OM-induced spheres, especially at Days 14 and 21, may be attributed to the synthesis of bone ECM proteins by osteoprogenitor cells developed from the PDLSCs in the sphere.

A number of culture techniques have been used to prepare spheres of various cell types in order to generate organ-like tissues, such as cartilage, lung and bone.<sup>6-11</sup> A cell micropellet cultured at the medium/air interface on a stainless steel grid has been shown to develop mineralized bone matrix quite fast (only after 7 days under osteogenic induction), but this technique seems to be technically complicated and may result in an irregular shape of the sphere.<sup>26</sup> Although it has been suggested that formation of spheres in poly-2-hydroxyethylmethacrylate (poly-HEMA)-coated 96-well plates may be a convenient way to culture homogeneous osteogenic spheres,<sup>10</sup> it is possible that the addition of poly-HEMA to prevent cell adhesion may influence the growth, differentiation and importantly the viability of spheres. Moreover, the use of a 96-well plate significantly limits the size of bone-like spheres obtained. In contrast, a culture technique using a polypropylene tube culture, currently used in the present study, produces a much greater size of the osteogenic spheres compared with that cultured in the 96-well plate,<sup>10</sup> and also allows osteogenic differentiation of PDLSCs, as shown in the present study.

The results of the present study showed that under osteogenic induction, PDLSC spheres formed a high amount of alizarin red S-positive calcium containing deposits, suggesting that PDLSCs in 3D spheres are able to undergo osteoblast differentiation as in

the conventional 2D culture system. This is supported by the Q-PCR results which showed that all key markers associated with osteoblast differentiation examined were up-regulated throughout the time course studied (Fig. 3). In contrast, there was only little, if any, calcified deposits in the spheres cultured under standard non-induced media (without the addition of dexamethasone, ascorbate-phosphate, and  $\beta$ -glycerolphosphate), suggesting that PDLSCs in the sphere could not differentiate along with the osteoblastic lineage. In line with the mineralization of the osteogenic PDLSC spheres, the expression of key markers associated with osteoblast differentiation determined in the present study were significantly up-regulated throughout the course of differentiation. It is known that Runx2 and Dlx5 control osteoblast differentiation of stem cells to progress to osteoprogenitor cells and then to fully functional osteoblasts, producing key bone matrix proteins, such as ALP, BSP and OC, which involve in cell adhesion and mineralization of the bone matrix.<sup>27</sup> Differential expression of osteoblast-related genes occurs as the osteoprogenitor cells differentiate and the bone matrix matures and mineralizes.<sup>28</sup> The ALP gene is first up-regulated but then down-regulated as mineralization progresses.<sup>29</sup> BSP is transiently expressed at the very early stage and then increases again in differentiated osteoblasts, while OC is detected mainly during the mineralization stage.<sup>29</sup> Similar pattern of the ALP activity and of the expression of these osteoblast-related genes was observed in osteogenic PDLSC spheres cultured in the present study, suggesting that the cultured osteogenic sphere system used in the present study allows physiologic differentiation of PDLSC into functionally active osteoblasts, and thus forming bone-like 3D spheres *in vitro*.

In the present study, cells in the cultured PDLSC spheres maintained their ability to grow, suggesting that both non-osteogenic and osteogenic spheres remained vital after 21 days in the 3D *in vitro* culture. It is possible that the presence of cell-to-cell and cell-to-ECM interactions in the spheres may help retain the viability and suppress apoptosis of PDLSCs cultured in 3D sphere, possibly via the adhesion molecule signaling pathway, as previously reported.<sup>30-32</sup> Moreover, the mitogens and survival factors, acting paracrine or autocrine, secreted within the PDLSC spheres may act much more effectively at a high cell density where cells are close in contact to each other. Furthermore, dilution of these factors may occur in cultures in which the cells are surrounded by medium while, in organoid culture, diffusion into the medium may be prevented by the dense cell mass.<sup>26</sup> However, further detailed studies are required to investigate these possibilities.

In conclusion, the present study has shown that PDLSCs may undergo osteoblast differentiation in an osteogenic scaffold-free 3D spheroid culture, producing bone-like mineralized matrix *in vitro*. This suggests the osteogenic potency of the osteogenic PDLSC spheres. Moreover, the osteogenic 3D sphere culture of PDLSCs developed in the present study could be beneficial for the study of cellular architecture and molecular biology of bone formation under 3D culture systems.

## References

1. Bianco P, Robey PG: Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001;414:118-121.
2. Risbud MV, Shapiro IM: Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofac Res* 2005;8:54-59.
3. Vaccaro AR: The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002;25:s571-s578.
4. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G: Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 1998;240:58-65.
5. Bucholz RW: Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 2002;44-52.
6. Handschel JG, Depprich RA, Kubler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U: Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med* 2007;3:4.
7. Zimmermann B: Lung organoid culture. *Differentiation* 1987;36:86-109.
8. Wong GL, Roberts R, Miller E: Production of and response to growth-stimulating activity in isolated bone cells. *J Bone Miner Res* 1987;2:23-28.
9. Ernst M, Froesch ER: Osteoblastlike cells in a serum-free methylcellulose medium form colonies: effects of insulin and insulinlike growth factor I. *Calcif Tissue Int* 1987;40:27-34.
10. Hildebrandt C, Buth H, Thielecke H: A scaffold-free in vitro model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2011;43:91-100.
11. Gerber I, ap G, I: Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures. *Eur Cell Mater* 2002;3:19-30.

12. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-13630.
13. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807-5812.
14. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
15. Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I: Isolation and characterisation of stem cell clones from adult human ligament. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2625-2636.
16. Kelm JM, Fussenegger M: Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol* 2004;22:195-202.
17. Sanchez AA: Regeneration and the need for simpler model organisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359:759-763.
18. DeLise AM, Stringa E, Woodward WA, Mello MA, Tuan RS: Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro model for chondrogenesis and cartilage maturation. *Methods Mol Biol* 2000;137:359-375.
19. Mello MA, Tuan RS: High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35:262-269.



20. Olsen I, Abraham D, Shelton I, Bou-Gharios G, Muir H, Winchester B: Cell contact induces the synthesis of a lysosomal enzyme precursor in lymphocytes and its direct transfer to fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1988;968:312-322.
21. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG: Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995;95:881-887.
22. Tanaka Y, Morimoto I, Nakano Y, Okada Y, Hirota S, Nomura S, Nakamura T, Eto S: Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Bone Miner Res* 1995;10:1462-1469.
23. Saho T, Kishida T, Hirano H, Hashikawa T, Shimabukuro Y, Murakami S: Induction of CD13 on T-lymphocytes by adhesive interaction with gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003;82:893-898.
24. Gortz B, Hayer S, Redlich K, Zwerina J, Tohidast-Akrad M, Tuerk B, Hartmann C, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Schett G: Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 2004;19:990-998.
25. Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT: Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2002;17:101-110.
26. Zimmermann B, Wachtel HC, Somogyi H, Merker HJ, Bernimoulin JP: Bone formation by rat calvarial cells grown at high density in organoid culture. *Cell Differ Dev* 1988;25:145-154.

27. Manolagas SC: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-137.
28. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B, Montecino M: Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation; in Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, (eds): *Principles of Bone Bioogy*. San Diego, Academic Press, 1996, pp 68-86.
29. Aubin JE: Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:73-82.
30. Kurenova E, Xu LH, Yang X, Baldwin AS, Jr., Craven RJ, Hanks SK, Liu ZG, Cance WG: Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein. *Mol Cell Biol* 2004;24:4361-4371.
31. Liu W, Bloom DA, Cance WG, Kurenova EV, Golubovskaya VM, Hochwald SN: FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2008;29:1096-1107.
32. McGill G, Shimamura A, Bates RC, Savage RE, Fisher DE: Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997;138:901-911.

## ภาคผนวก

ผลลัพธ์จากโครงการวิจัยนี้

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

**Singhatanadgit W\***, Varodomrujiranon M. Osteogenic potency of a three-dimensional scaffold-free bonelike sphere of periodontal ligament stem cells *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* (In press)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ พัฒนาการเรียนการสอน และสร้างนักวิจัยใหม่