



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ความผิดปกติของเซลล์และชีวเคมี ในผู้ป่วยเหงือกโตแต่กำเนิด

ทพญ. ดร. สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล และคณะ

มิถุนายน 2545

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ความผิดปกติของเซลล์และชีวเคมี ในผู้ป่วยเหงือกโตแต่กำเนิด

วันที่.....	๔ ส.ค. ๒๕๔๖
เลขทะเบียน.....	๐๐๐๒๑
เลขเรียกหนังสือ.....	๔๔

๐๐๐๖

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. ทพญ. คร.ศุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล | ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ |
| 2. รศ.ทพญ. คร.สมพร ศวัศศิธรรัท | ภาควิชาพยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ ๑79/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10๓๓๐
โทร. 298-๐455 โทรสาร 298-๐476
home page : <http://www.trf.or.th>
E-mail : trf-tn@trf.or.th



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทสรุปโครงการ	5
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ	10
รายละเอียดการดำเนินโครงการ	11
ผลการวิจัย	13
รูปที่ 1 รูปร่างของไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยเหงือกปกติ	14
รูปที่ 2 รูปร่างของไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยเหงือกโตที่มี อาการขนมากผิดปกติ	15
รูปที่ 3 รูปร่างของไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยเหงือกโตที่มี ปัญญาอ่อน	16
รูปที่ 4 การแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส	17
รูปที่ 5 การสร้างไฟโบรเนคติน	18
รูปที่ 6 การสร้างคอลลาเจน	19
การอภิปรายและสรุปผล	20
ผลงานที่ได้จากโครงการ	26
ภาคผนวก	
บทความสำหรับการตีพิมพ์เผยแพร่	28
ภาพก่อนและหลังการผ่าตัดเหงือกของผู้ป่วยรายแรก	46
ภาพก่อนการผ่าตัดเหงือกของผู้ป่วยรายที่สอง	47

บทคัดย่อ

อาการเหงือกโตในผู้ป่วยเหงือกโตจากกรรมพันธุ์อาจเป็นผลสืบเนื่องจากปัจจัยหลายประการ รวมถึงถึงการแบ่งตัวของไฟโบรบลาส (fibroblast), การสร้างไฟโบรเนคติน (fibronectin) และคอลลาเจน (collagen) การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ได้ผลที่ขัดแย้งกัน บ้างก็พบว่าไฟโบรบลาสแบ่งตัวตามปกติ บ้างก็พบว่าไฟโบรบลาสแบ่งตัวช้ากว่าปกติ สำหรับการสร้างคอลลาเจน บางการศึกษารายงานว่ามีการสร้างเพิ่มขึ้นในขณะที่บางการศึกษากลับรายงานว่ามีการสร้างลดลง ในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ในผู้ป่วยเหงือกโตจากกรรมพันธุ์ ที่มีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วยโดยได้แยกไฟโบรบลาส จากเหงือกของผู้ป่วยที่มีอาการชัก 2 ราย (HGFH, HGFM) และผู้ป่วยปกติ 1 ราย (NG) ผู้ป่วยที่มีอาการชักรายแรก (HGFH) มีอาการร่วมคือขนมากผิดปกติ (Hypertrichosis) ผู้ป่วยที่มีอาการชักรายที่สอง (HGFM) มีอาการร่วมคือปัญญาอ่อน (Mental Retardation) อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษารูปร่างของไฟโบรบลาสคือกล้องจุลทรรศน์ การแบ่งตัวของไฟโบรบลาส วิเคราะห์โดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) การสร้างไฟโบรเนคตินและคอลลาเจน วิเคราะห์โดยวิธีอีไลซ่า (ELISA) ผลการศึกษาพบว่า ไฟโบรบลาส จากผู้ป่วยรายแรก (HGFH) มีขนาดเล็ก แบ่งตัวช้า (ลดลง 51% , $p \leq 0.05$) และหลังไฟโบรเนคตินน้อย (ลดลง 33% , $p \leq 0.05$) แต่ผลิตคอลลาเจนมาก (เพิ่มขึ้น 200% , $p \leq 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญว่าผู้ป่วยปกติเพศเดียวกันที่มีอายุเท่ากัน ในทางตรงกันข้ามไฟโบรบลาส จากผู้ป่วยรายที่สอง (HGFM) มีขนาดใหญ่และแบ่งตัวเร็ว (เพิ่มขึ้น 55% , $p \leq 0.05$) แต่ผลิตคอลลาเจนน้อย (ลดลง 50% , $p \leq 0.05$) สำหรับการหลังไฟโบรเนคตินของไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยรายที่สองไม่แตกต่างจากผู้ป่วยปกติ โดยสรุปแล้วอาการเหงือกโตจากกรรมพันธุ์ อาจเป็นผลจากกลไกพื้นฐานที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับภาวะความแตกต่างของพันธุกรรมนั้น ๆ

จากอัตราการเกิดโรคที่ต่ำของโรคเหงือกโตจากกรรมพันธุ์ทำให้เป็นไปได้ยากที่จะมีจำนวนผู้ป่วยให้ศึกษามากพอที่จะอนุมานถึงกลไกพื้นฐานที่แท้จริงของการเกิดโรค อย่างไรก็ตามการรวบรวมและแลกเปลี่ยนข้อมูลซึ่งกันและกันให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้

ก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะเอื้อให้เกิดการค้นคว้าวิธีป้องกัน ที่จะช่วยไม่ให้ผู้ป่วยเหล่านี้ต้องได้รับการผ่าตัดเหงือกซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง ดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ยิ่งมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเท่าใด ความเข้าใจถึงกลไกพื้นฐานของโรคก็จะยิ่งมากขึ้นเท่านั้น และยังเพิ่มศักยภาพของการค้นหาการรักษาที่เฉพาะเจาะจง สำหรับผู้ป่วยเหงือกโตแต่ละชนิดต่อไป

ABSTRACT

Gingival enlargement in hereditary gingival fibromatosis (HGF) may be a result of many factors including fibroblast proliferation, fibronectin (FN) production and collagen synthesis. Previous studies of these factors in relation to HGF have shown conflicting results, with some studies reporting normal growth and others reporting slower proliferation than normal fibroblasts. In term of collagen synthesis, some studies reported increased synthesis whereas others showed decreased synthesis. In this *in vitro* study we further investigated the connection of these factors with particular syndromes of HGF. Fibroblast strains were derived from gingiva of two convulsive disorder patients with HGF (HGFH strain and HGFM strain) and one normal patient (NG strain). The patient with HGFH had hypertrichosis and that with HGFM had mental retardation. Fibroblast morphology was examined using an inverted microscope, fibroblast proliferation was determined by MTT assay, and FN and collagen synthesis were measured by ELISA. The results showed that fibroblasts from HGFH strain were smaller, proliferated significantly slower (51% decrease, $p \leq 0.05$) and secreted lower amount of FN (33% decrease, $p \leq 0.05$) but produced greater amount collagen (200% increase, $p \leq 0.05$) than the age- and sex- matched normal human gingival fibroblast strain (NG strain). In contrast, fibroblasts from HGFM strain were larger

and showed a higher rate of proliferation (55% increase, $p \leq 0.05$), but lower rate of collagen synthesis (50% decrease, $p \leq 0.05$). No statistical difference was detected in the amount of FN secretion from the fibroblasts of HGFM and NG strains. In conclusion, similar clinical fibrotic enlargement in HGF may result from different underlying mechanisms due to their distinct genetic heterogeneity.

The low incidence of HGF (1:750,000) means it is difficult to get a large enough sample size to infer the results to the population. Nevertheless, it is important to gather and share as much information as possible in order to find a preventive protocol to help these patients avoid the many gingivectomies they currently require. The more studies that are carried out, the better the understanding of the underlying mechanisms and the greater the potential for finding the specific curative procedure for each type of gingival fibromatosis patient.

บทสรุปโครงการ

(Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อาการเหงือกโต (Gingival fibromatosis) สามารถพบได้ในผู้ป่วยที่รับยาต่าง ๆ ได้แก่ ยากันชัก (Phenyton)(1-5) ยาสำหรับผู้ป่วยโรคหัวใจ (Nifedipine) (6-11) ยากดภูมิคุ้มกัน (Cyclosporin) (12-18) และพบเป็นอาการร่วมในผู้ป่วยที่มีกลุ่มอาการ (syndromes) ต่าง ๆ เช่น hypotrichosis, epilepsy, mental retardation (19) หรืออาจจะพบผู้ป่วยเหงือกโตที่หาสาเหตุไม่ได้ (20) นอกจากนี้ อาจจะพบเหงือกโตจากกรรมพันธุ์ ซึ่งมีอัตราเกิดโรค คือ 1:750,000 (21) พบได้ทั้งในผู้หญิงและผู้ชายในอัตราส่วนที่เท่า ๆ กัน (22) และถ่ายทอดแบบ autosomal dominant (21,23-25) แต่ก็มีรายงานการพบการถ่ายทอดแบบ recessive mode of inheritance (26-27)

ในผู้ป่วยเหงือกโตจากกรรมพันธุ์ เด็กที่เป็นโรคเหงือกโต จะมีเหงือกลักษณะปกติในตอนเกิด แต่เหงือกจะแสดงอาการเริ่มโตผิดปกติ เมื่อฟันน้ำนมเริ่มงอก แล้วค่อย ๆ โตขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งฟันแท้ขึ้น ก็จะมีโตคลุมฟัน ทั้งขากรรไกรบนและล่าง (28) ทำให้เคี้ยวอาหารลำบาก พูดไม่ชัด และใบหน้าผิดปกติ เนื่องจากปิดปากได้ไม่สนิท (24) อันอาจก่อให้เกิดปมด้อยแก่เด็กได้ การตรวจทางพยาธิของเหงือกที่ผิดปกติเหล่านี้พบว่าเหงือกจะประกอบด้วย เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (CNT) ที่หนาแน่นด้วย collagen fiber, ปกคลุมด้วย hyperplastic epithelium ซึ่งมี long rete pegs การรักษาเท่าที่ผ่านมา เป็นการรักษาเพื่อบรรเทาอาการโดยการตัดแต่งเหงือกที่โตออก อาการไม่หายขาดเพราะเหงือกจะกลับโตขึ้นมาได้อีก ดังนั้นการที่จะรักษาให้หายขาดจึงต้องอาศัยความรู้ที่ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรค โดยการศึกษาทางด้านเซลล์ และชีวเคมีของเหงือกเด็กที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับเหงือกของเด็กปกติต่อไป

นอกจากนี้การทราบกลไกการเกิดโรคยังเป็นหนทางนำไปสู่การป้องกันอาการเหงือกโตที่เป็นผลข้างเคียงจากยาต่าง ๆ ที่ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับดังได้กล่าวแล้วข้างต้นโดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เนื่องจากในขณะนี้วิวัฒนาการทางด้านทางการแพทย์เจริญรุดหน้าทำให้การเปลี่ยนอวัยวะให้ผู้ป่วยมีผลสำเร็จสูงขึ้น ส่งผลให้มีผู้ป่วยที่ต้องอาศัยยา Cyclosporin มากขึ้น ผู้ป่วยเหงือกโตซึ่งเป็นผลข้างเคียงจากยา

ก็จะมีมากขึ้นการทราบกลไกการเกิดโรคจะเป็นหนทางนำไปสู่การหาทางป้องกันเหงือกโตที่เป็นผลข้างเคียงจากยาในผู้ป่วยเหล่านี้ได้ในที่สุด

2. วัตถุประสงค์

ศึกษาเซลล์และลักษณะทางชีวเคมีของเหงือกเด็กที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับเหงือกเด็กปกติ

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

1. เป็นการวิจัยในห้องทดลอง (*in vitro*) โดยเซลล์เหงือกที่นำมาศึกษาได้มาจากผู้ป่วยเหงือกโต ที่มารับการรักษาโดยการผ่าตัดเหงือกและถอนฟันซี่ที่ปวดออก ส่วนเหงือกปกติได้จากผู้ป่วยที่จำเป็นต้องผ่าตัดเพื่อการรักษาทางด้านทันตกรรมจัดฟัน โดยได้รับคำยินยอมจากผู้ปกครอง ในการเข้าร่วมศึกษาวิจัย
2. ทำการเลี้ยงเซลล์เหงือกทั้ง 2 กลุ่ม ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM จนได้จำนวนหลาย ๆ รุ่น แล้วใช้รุ่นที่ 4 ถึง 7 ในการศึกษาลักษณะของเซลล์ และลักษณะทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับโดยการดูรูปร่างของเซลล์ ดูการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์โดยวิธีเอ็มทีที ดูการเปลี่ยนแปลงการสร้างไฟโบรเนกตินและคอลลาเจนโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เหงือกจากการผ่าตัดผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคเหงือกโตและเด็กเหงือกปกติถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (~2 มม.) แล้วเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี ยาปฏิชีวนะ (100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 2.5 µg/ml fungizone) เพาะในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %. เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 2 ครั้ง/สัปดาห์ จนกระทั่งมีเซลล์เจริญออกมาอยู่นอกชิ้นเนื้อจนหนาแน่นก็ทำซัปคัลเจอร์(subculture) หลายๆรุ่น เซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ใช้เซลล์จากซัปคัลเจอร์รุ่นที่4-7

2.2 การดูรูปร่างของเซลล์

ใส่เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม ด้วยความหนาแน่น 30,000 เซลล์/มล. เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 5 วัน แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับเป็นระยะ ๆ (6,12,24,48,72,96,120 ชม.)

2.3 วิธีวิเคราะห์การเจริญเติบโตด้วยเอ็มทีที

เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (29) โดยใส่เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม ด้วยความหนาแน่น 30,000 เซลล์/มล. เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 3 วัน จึงใส่สารละลายเอ็มทีที [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)] 100 ไมโครลิตร/หลุม สารละลายเอ็มทีทีเตรียมได้จากการละลายผงเอ็มทีที 5 มก. ต่อ 1 มล. ของฟอสเฟต (phosphate buffer saline) เก็บในตู้เย็นเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นก็ดูค่าน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมน้ำยาไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) 1 มล./หลุม เพื่อละลายผลึกสีม่วงของเอ็มทีทีฟอร์มาซาน (MTT formazan) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optic density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.4 วิธีวิเคราะห์ไฟโบรเนกติน (fibronectin)

ไฟโบรเนกตินที่ได้จากการสร้างของเซลล์และละลายอยู่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ถูกวัดด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่า (ELISA) โดยใส่เซลล์จำนวน 30,000 ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เกาะติดดีแล้วจึงล้างด้วยฟอสเฟต แล้วเติมน้ำยา DMEM ดังกล่าวข้างต้น เพาะในตู้เย็นเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน จึงนำน้ำยาที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA) โดยใช้ไฟโบรเนกตินอีไลซ่าคิท แล้ววัดค่าที่ ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.5 วิธีวิเคราะห์คอลลาเจน

ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากการสร้างของเซลล์ถูกวัดด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่า (ELISA) โดยใช้เซลล์จำนวน 30,000 ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีแอสคอร์บิกแอซิด (ascorbic acid) 50 ไมโครกรัม/มล. เก็บไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นจึงรวบรวมน้ำยาที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณคอลลาเจนโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA) โดยใช้คอลลาเจนอีไลซ่าคิท แล้ววัดค่าที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

- สถิติที่ใช้ในการทดสอบ ความแตกต่างระหว่างเห็อกจากผู้ป่วยเหงือกโตกับผู้ป่วยเหงือกปกติ คือ one-way analysis of variance (ANOVA)

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

กิจกรรม	ปี 2544						ปี 2545					
	กค.	สค.	กย.	ตค.	พย.	ธค.	มค.	กพ.	มีค.	เมย.	พค.	มิย.
จัดหา & เตรียมวัสดุ อุปกรณ์	←					→						
เลี้ยงเซลล์กลุ่มตัวอย่าง		←		→								
เลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม			←		→							
วิเคราะห์การเจริญเติบโต						↔						
วิเคราะห์เอ็มทีที							↔					
วิเคราะห์โปรตีน								↔				
วิเคราะห์คอลลาเจน									↔			
วิเคราะห์ข้อมูล										←		→
เขียนรายงาน										←		→

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Proliferation and synthesis of fibronectin and collagen in fibroblasts derived from hereditary gingival fibromatosis

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

แม้จะมีการรายงานมากกว่า 100 ฉบับ เกี่ยวกับ โรคเหงือกโต ในเวลาที่ผ่านมา 125 ปีแล้ว แต่กระบวนการเกิดโรค (mechanisms) ก็ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่ชัด (30) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากสาเหตุหลายประการ ประการแรก รายงานส่วนใหญ่เป็นรายงานผู้ป่วยถึงลักษณะอาการที่พบไม่ได้ศึกษาลึกซึ้งถึงกระบวนการทางด้านชีวเคมีที่เกิดขึ้น ประการที่สอง อัตราการเกิดโรคน้อยคือมีเพียง 1: 750,000 (21) ดังนั้น โอกาสที่จะได้ขึ้นเนื้อมาศึกษาทางด้านชีวเคมีจึงมีน้อยด้วย ประการสุดท้าย ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะเซลล์และลักษณะทางชีวเคมีของโรคเหงือกโตได้ผลที่ขัดแย้งกัน จากการศึกษาของ Johnson และคณะ (31) ในปี 1986 พบว่าเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกโตแบ่งตัวได้ช้ากว่าปกติ และสร้าง collagen น้อยกว่าปกติ ในขณะที่ Shirasuna และคณะ (32) รายงานผลการศึกษาในปี 1989 ว่า แม้เซลล์ของผู้ป่วยเหงือกโตจะแบ่งตัวน้อยกว่า ปกติแต่อัตราการสร้าง collagen มากกว่า เซลล์ของคนปกติ ต่อมาในปี 1997 Tipton และคณะ (30) รายงานผลการศึกษาว่าเซลล์จากเหงือกของผู้ป่วยเหงือกโตมีอัตราการแบ่งเซลล์ การสร้างคอลลาเจนและไฟโบรเนกตินสูงกว่าเซลล์จากเหงือกของคนปกติ ล่าสุดในปี 1998 จากการศึกษาของ Coletta และคณะ (33) ได้ รายงานผลที่ค้นพบว่าอัตราการแบ่งเซลล์ของเหงือกจากผู้ป่วยที่เป็นโรคสูงกว่าเหงือกจากคนปกติ

จะเห็นได้ว่าการวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานไม่มากนักที่ศึกษาเพื่อค้นหากระบวนการเกิดโรคเหงือกโต ยิ่งกว่านั้นผลการศึกษาที่ได้ก็ขัดแย้งกัน หนึ่งในจำนวนนี้ที่ศึกษาได้รายละเอียดกว้างขวางคือการศึกษาของ Tipton และคณะ (30) แต่ก็มีข้อบกพร่องที่แม้แต่ผู้วิจัยเองได้วิจารณ์ผลการศึกษาของตนว่าการแปรผลค่อนข้างลำบากเนื่องจากไม่สามารถหาตัวอย่างที่มีอายุเท่ากันได้จึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบเหงือกจากผู้ป่วยที่มีอายุต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างกับกลุ่มควบคุม นั่นคือกลุ่มตัวอย่าง(ผู้ป่วยเหงือกโต) อายุ 6-11 ปี ขณะที่กลุ่มควบคุม(ผู้ป่วยเหงือกปกติ) อายุ 30-58 ปี

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ กิจกรรม

1. เลี้ยงเซลล์กลุ่มตัวอย่าง ที่ได้จากการผ่าตัดผู้ป่วย 2 ราย โดยผู้ปกครองยินดีและ
เห็นดียินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย ผู้ป่วย 2 รายนี้ ได้แก่
 - Hereditary gingival fibromatosis with hypertrichosis and epilepsy
เป็นผู้ป่วยชายอายุ 9 ปี
 - Hereditary gingival fibromatosis with mental retardation and
epilepsy เป็นผู้ป่วยเด็กหญิง อายุ 14 ปี
2. เลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งได้จากการผ่าตัดผู้ป่วย 1 ราย เป็นผู้ป่วยเพศชาย
อายุ 9 ปี ที่มารับการรักษาทางด้านทันตกรรมจัดฟัน ที่ไม่มีโรคประจำตัวใด ๆ
และไม่พบประวัติโรคเหงือกโตในครอบครัว ผู้ปกครองยินดีและเห็นดียินยอมเข้า
ร่วมการศึกษาวิจัย
3. เหงือกจากการผ่าตัดผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคเหงือกโตและเด็กเหงือกปกติถูกตัดเป็น
ชิ้นเล็กๆ (~2 มม.) แล้วเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. ด้วยน้ำยา
เลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี ยาปฏิชีวนะ (100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml
streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 2.5 µg/ml fungizone) เพาะในตู้อบ
เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับ
คาร์บอนไดออกไซด์ 5 %. เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 2 ครั้ง/สัปดาห์ จนกระทั่งมี
เซลล์เจริญออกมาอยู่นอกชิ้นเนื้อจนหนาแน่นก็ทำซัปลัลเจอร์(subculture)ถึง
รุ่นที่ 9 เซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ใช้เซลล์จากซัปลัลเจอร์รุ่นที่4-7
4. วิเคราะห์รูปร่างของเซลล์
 - เลี้ยงเซลล์ กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมในภาด 24 หลุม/ภาด รายละเอียด 7
ภาดเป็นเวลา 5 วัน ด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้นแล้ววิเคราะห์รูปร่าง

ของเซลล์เป็นระยะ ๆ (6,12,24,48,72,96,120 ชม.) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

5. วิเคราะห์การเจริญเติบโตด้วยเอ็มทีที

หลังจากวิเคราะห์รูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับแล้ว ได้ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตด้วยเอ็มทีทีต่อโดยใส่เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม ด้วยความหนาแน่น 30,000 เซลล์/มล. เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 3 วัน จึงใส่สารละลายเอ็มทีที [(3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] 100 ไมโครลิตร/หลุม สารละลายเอ็มทีทีเตรียมได้จากการละลายผงเอ็มทีที 5 มก. ต่อ 1 มล. ของฟอสเฟต (phosphate buffer saline) เก็บในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นก็ดูน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมน้ำยาไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) 1 มล./หลุม เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ของเอ็มทีทีฟอร์มาซาน (MTT formazan) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optic density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

6. วิเคราะห์ไฟโบรเนกติน

ใส่เซลล์จำนวน 30,000 ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม/ภาทรายละ 1 ภาด ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เกาะติดดีแล้วจึงล้างด้วยฟอสเฟต แล้วเติมน้ำยา DMEM ดังกล่าวข้างต้นเพาะในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน นำไฟโบรเนกตินที่ได้จากการสร้างของเซลล์และละลายอยู่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA) โดยใช้ไฟโบรเนกตินอีไลซ่าคิท (FN-ELISA kit, Chemicon, Temecula, CA.) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (optic density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

7. วิเคราะห์คอลลาเจน

ใส่เซลล์จำนวน 30,000 ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม/ถาด รายละ 1 ถาด ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีแอสคอร์บิกแอซิด (ascorbic acid) 50 ไมโครกรัม/มล. เก็บไว้ในในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นจึงรวบรวมน้ำยาที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณคอลลาเจนโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA) โดยใช้คอลลาเจนอีไลซ่าคิท (Collagen ELISA kit, Chondrex Inc. Redmond, WA) แล้ววัดค่าการดูดกลืนของแสง (optic density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

8. วิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติที่ใช้ในการทดสอบ ความแตกต่างระหว่างปริมาณเอ็มทีที ไฟโบรเนกติน และคอลลาเจนคือ one-way analysis of variance (ANOVA)

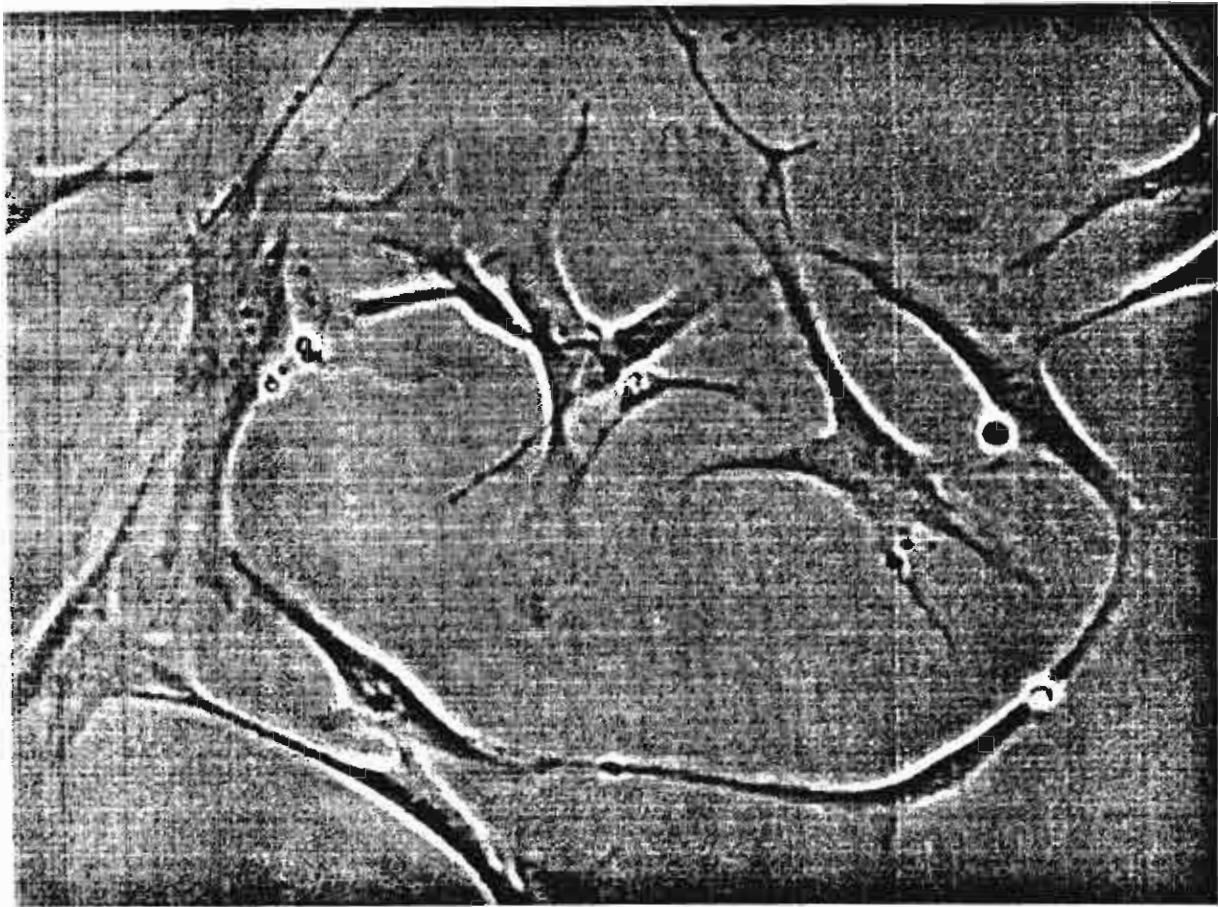
ผลการวิจัย

รูปร่างของไฟโบรบลาส

เซลล์ไฟโบรบลาสที่ได้จากเหงือกของผู้ป่วยเหงือกโต และผู้ป่วยเหงือกปกติมีลักษณะรูปร่างเหมือนเซลล์ไฟโบรบลาสทั่ว ๆ ไป คือเป็นรูปกระสวยที่มีนิวเคลียสรูปร่างกลม ๆ อยู่ตรงกลางและมีไซโตพลาสซึมยื่นยาวออกไป โดยที่เซลล์ไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยเหงือกโตรายแรกซึ่งมีชนมากกว่าปกติ(HGFH) (รูปที่ 2) มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสที่ได้จากผู้ป่วยเหงือกปกติเพศเดียวกันที่มีอายุเท่ากัน(NG) (รูปที่ 1) ในทางตรงข้ามเซลล์ไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยเหงือกโตที่ปัญญาอ่อน(HGFH) (รูปที่ 3) มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยเหงือกปกติ

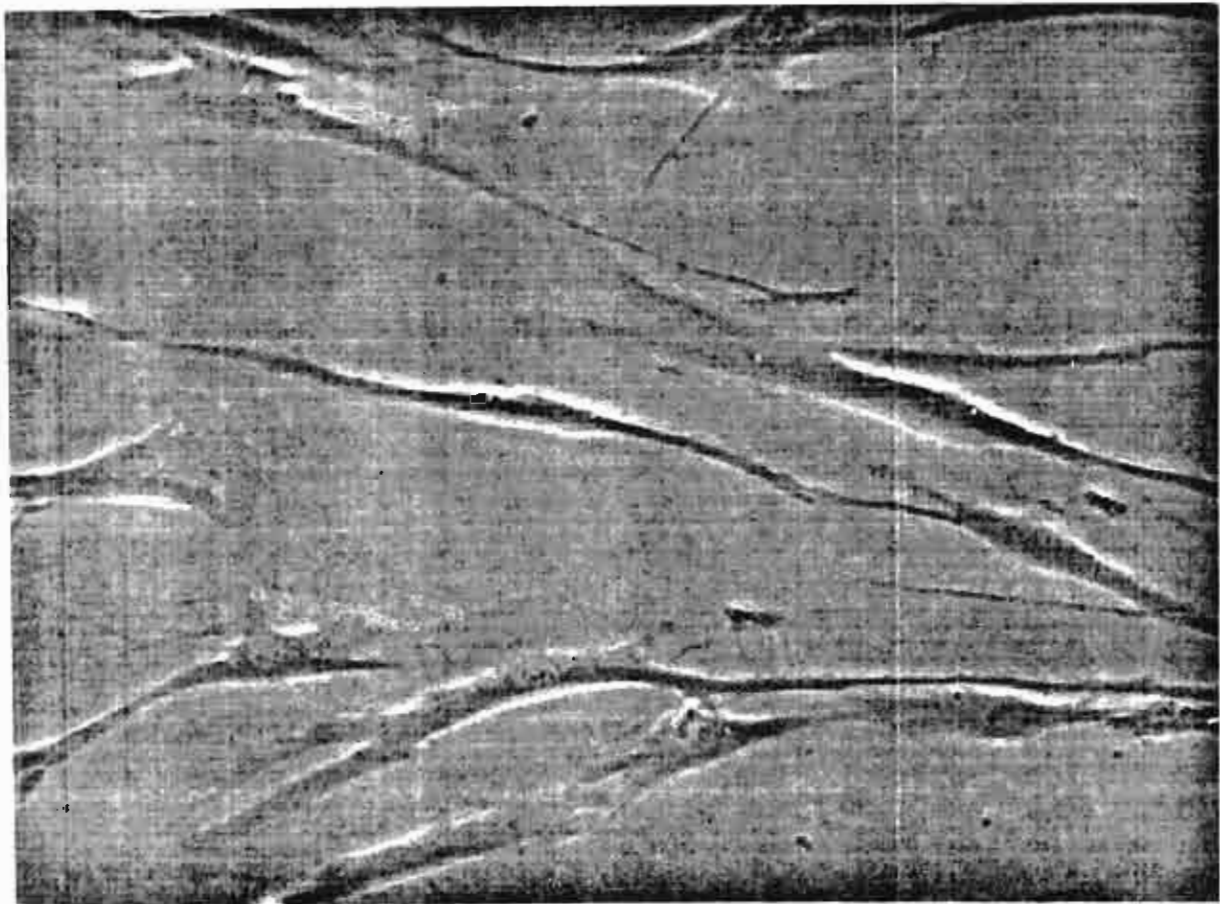
การแบ่งตัวของเซลล์

การแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสวิเคราะห์โดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) และผลการทดลองในรูปที่ 4 สรุปได้จากการทดลองซ้ำๆ กัน 3 ครั้ง ปรากฏว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากผู้ป่วยเหงือกโตที่มีชนมากกว่าปกติ (HGFH) แบ่งตัวช้ากว่าเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วย



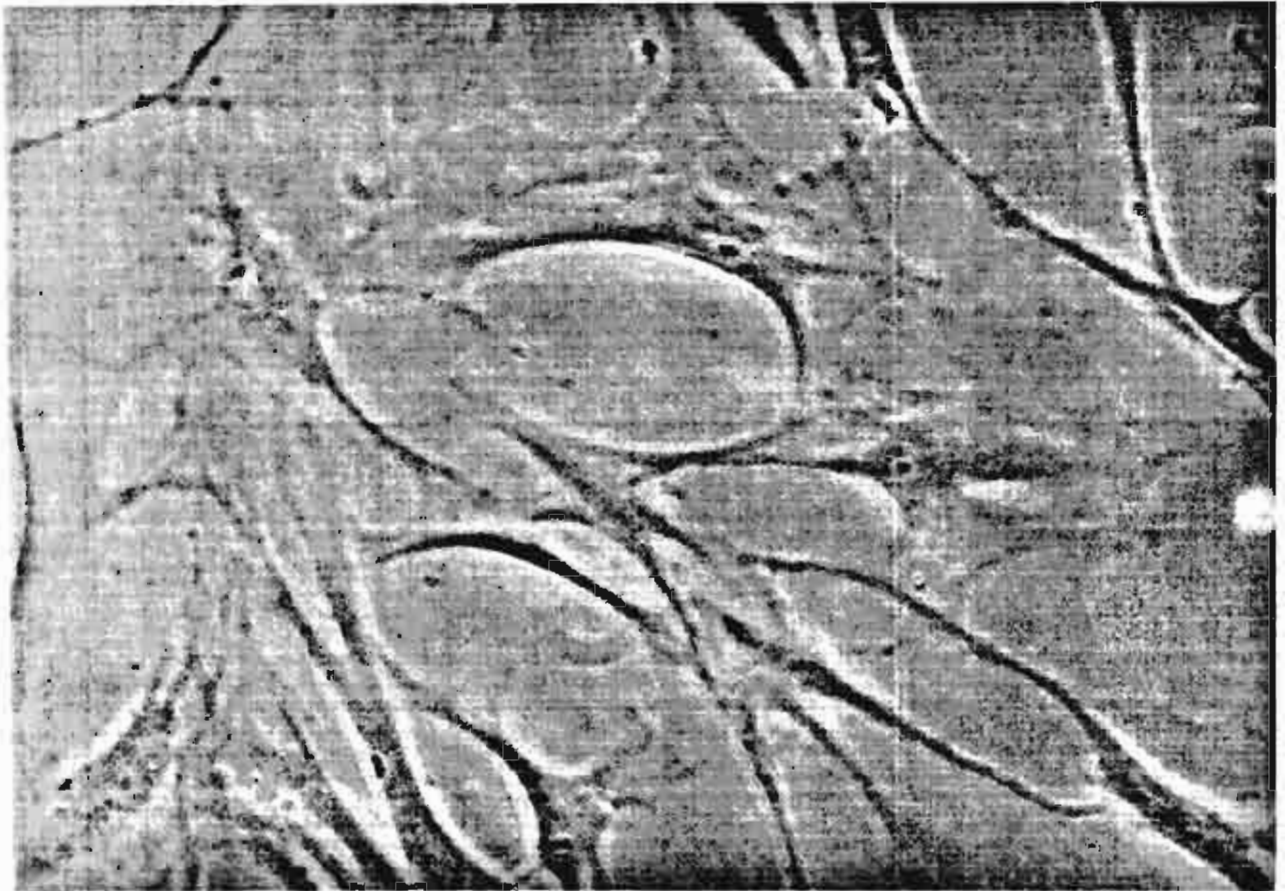
NG

Figure 1. Phase-contrast microscopic features of human gingival fibroblasts cultured from a normal gingiva patient (NG). Note the typical spindle characteristics of fibroblasts (x 200).



HGFH

Figure 2. Phase-contrast microscopic features of human gingival fibroblasts cultured from a HGFH patient. Note the typical spindle characteristics of fibroblasts (x 200).



HGFM

Figure 3. Phase-contrast microscopic features of human gingival fibroblasts cultured from a HGFH patient. Note the typical spindle characteristics of fibroblasts (x 200).

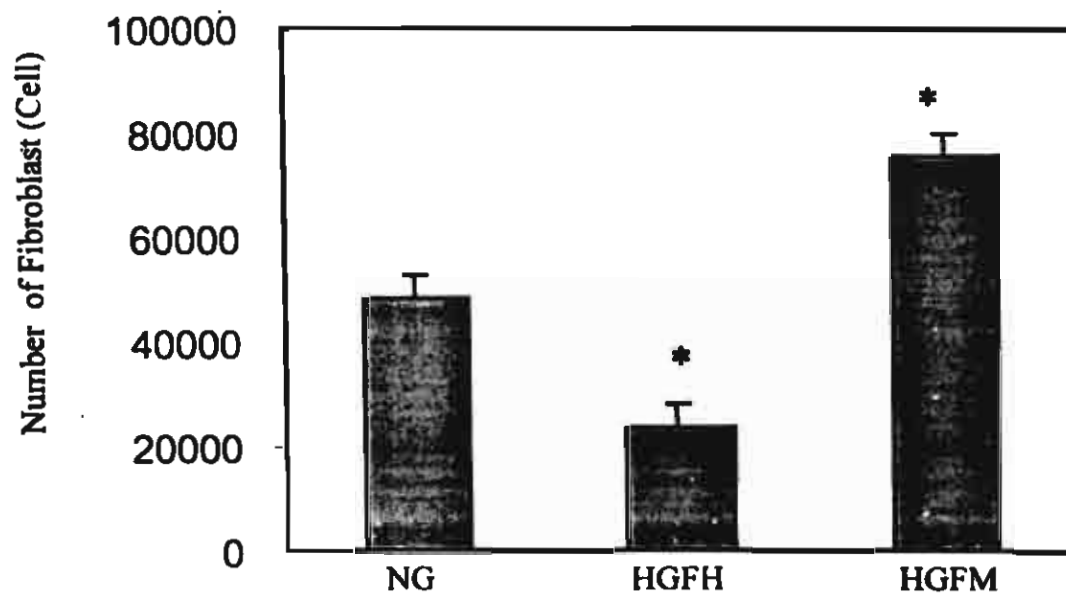
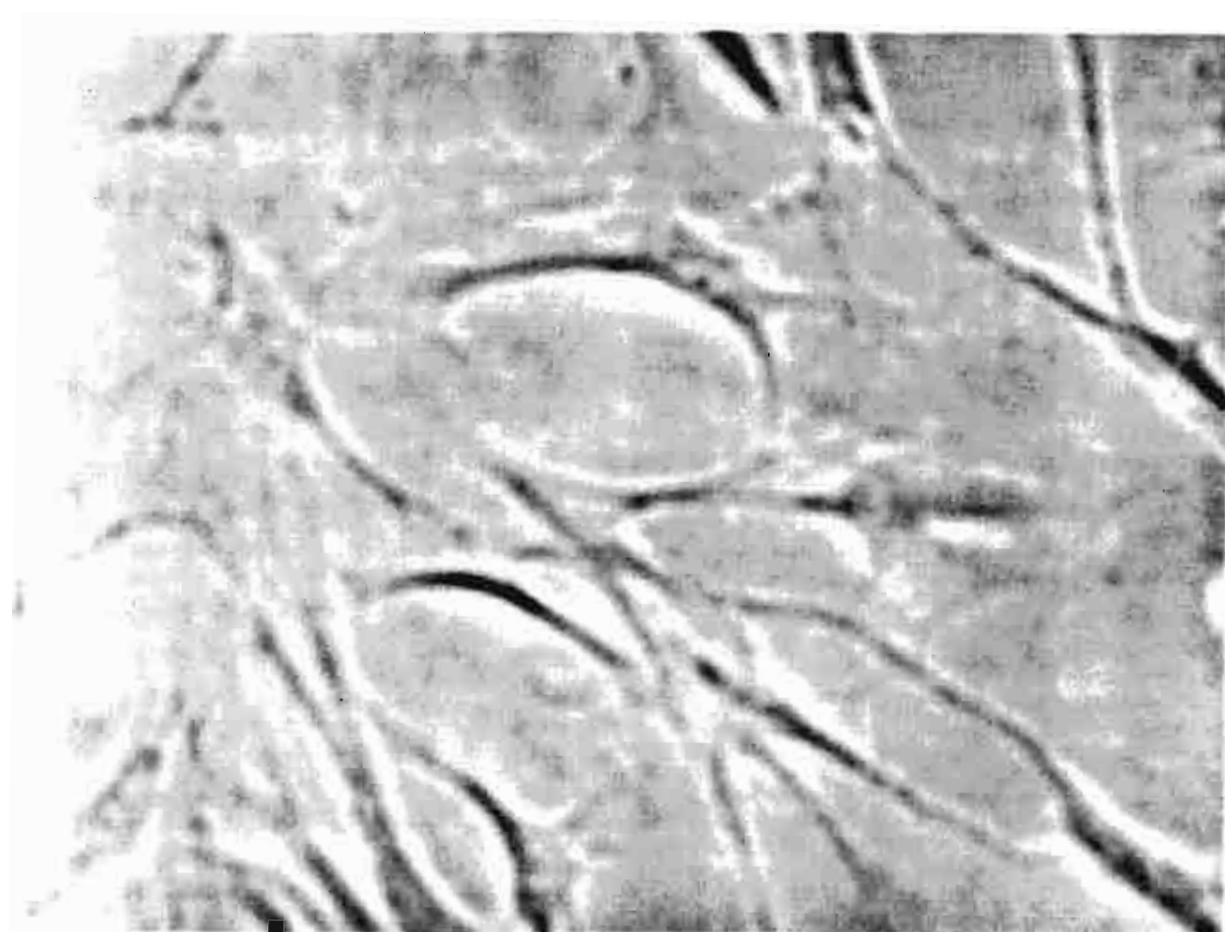


Figure 4. Proliferation of human gingival fibroblasts. MTT colorimetric assay was performed and absorbance was read using spectrophotometer at 570 nm. The mean values of triplicate measurements in representative experiments are indicated (* $p \leq 0.05$).



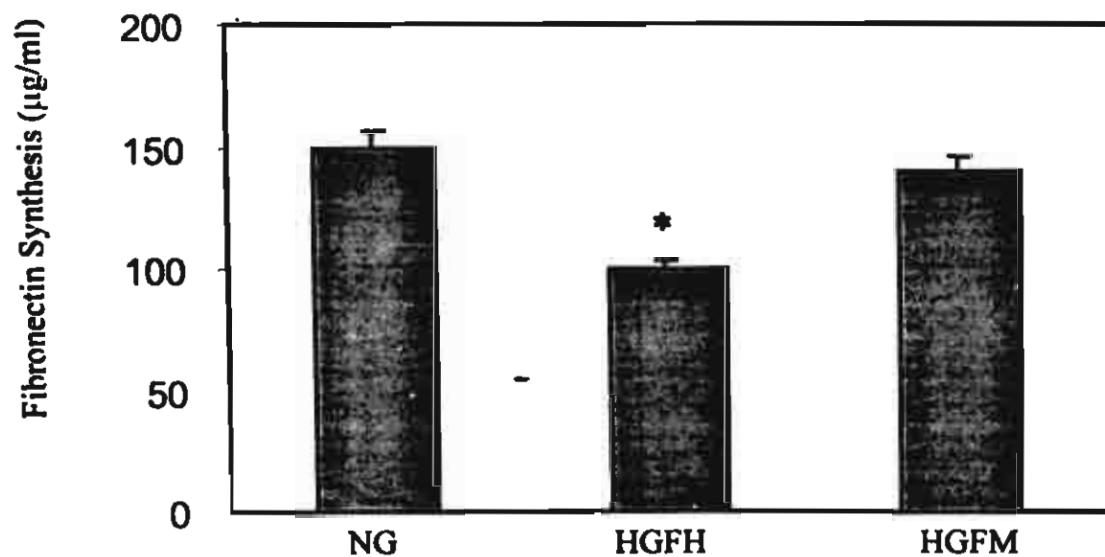


Figure 5. Fibronectin production by human gingival fibroblasts.

Fibronectin released by the cells into culture supernatants was measured by ELISA. The mean values of triplicate measurements in representative experiments are indicated (* $p \leq 0.05$).

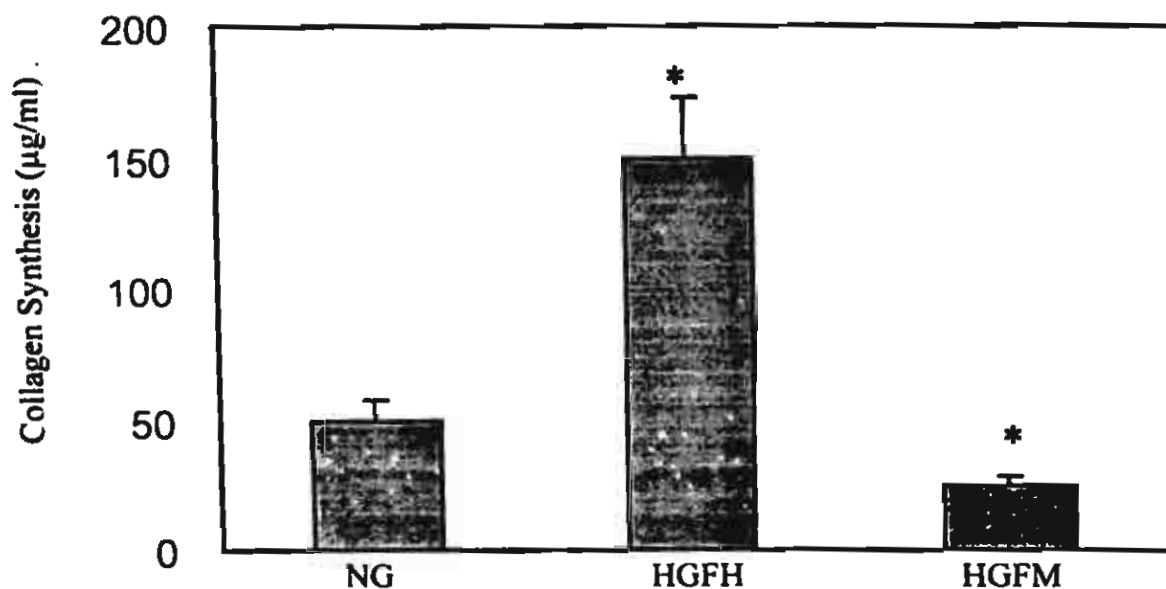


Figure 6. Type I collagen production by human gingival fibroblasts. Type I collagen digested from human gingival fibroblasts was measured by ELISA. The mean values of triplicate measurements in representative experiments are indicated (* $p \leq 0.05$).

เหงือกปกติ (NG) 51% ($p \leq 0.05$) ในขณะที่เซลล์จากผู้ป่วยเหงือกโตที่ปัญญาอ่อน (HGFM) แบ่งตัวเร็วกว่าเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกปกติ 55% ($p \leq 0.05$)

การสร้างไฟโบรเนคติน

ปริมาณของไฟโบรเนคตินที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้างขึ้นและหลั่งออกมาในสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ถูกเก็บมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอีไลซ่า (ELISA) รูปที่ 5 แสดงผลจากการทดลองซ้ำ ๆ กัน 3 ครั้ง ปรากฏว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผู้ป่วยเหงือกโตรายแรก (HGFH) สร้างไฟโบรเนคตินน้อยกว่าผู้ป่วยเหงือกปกติ (NG) 33% ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการสร้างไฟโบรเนคตินระหว่างเซลล์ของผู้ป่วยเหงือกโตรายที่สอง (HGFM) กับเซลล์ของผู้ป่วยเหงือกปกติ (NG)

การสร้างคอลลาเจน

รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์การสร้างคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ทำการทดลองซ้ำ ๆ กัน 3 ครั้ง ผลปรากฏว่าเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกโตรายแรก (HGFH) ผลิตคอลลาเจนมากกว่าเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกปกติ (NG) 50% ($p \leq 0.05$) ในทางตรงกันข้ามเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกโตรายที่สอง (HGFM) ผลิตคอลลาเจนน้อยกว่าเซลล์จากผู้ป่วยปกติ (NG) 200% ($p \leq 0.05$)

การอภิปรายและสรุปผล

การเพิ่มปริมาณการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีส่วนในการทำให้เหงือกโตขึ้น นอกจากนี้การทำงานของเซลล์ในการสร้างไฟโบรเนคตินและคอลลาเจนก็มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับอาการเหงือกโตผิดปกติ ผลจากการศึกษานี้พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผู้ป่วยเหงือกโตที่มีขนมากกว่าปกติ (Hypertrichosis) มีรูปร่างเล็กกว่า แบ่งตัวได้ช้ากว่า และสร้างไฟโบรเนคตินน้อยกว่าแต่สร้างคอลลาเจนได้มากกว่าเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกปกติ ในทางตรงข้ามเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกโตที่ปัญญาอ่อน (Mental Retardation) มีรูปร่างใหญ่กว่าแบ่งตัวได้เร็วกว่า แต่สร้างคอลลาเจนได้น้อยกว่าเซลล์

จากผู้ป่วยเหงือกปกติ การสร้างไฟโบรเนคตินของเซลล์จากผู้ป่วยเหงือกโตที่ปัญญาอ่อน ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ได้จากเหงือกผู้ป่วยปกติ

ผลการศึกษานี้มีทั้งความสอดคล้องและความแตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา ยกตัวอย่างเช่นในผู้ป่วยเหงือกโตรายแรกที่มีลักษณะอาการขนมากผิดปกติ (Hypertrichions) การแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีปริมาณน้อยลงเช่นเดียวกับการศึกษาของเชอราซุনা (Shirasuna et al) (32) และจอห์นสัน (Johnson et al) (31) ส่วนในด้านการสร้างคอลลาเจนมีมากขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาของคอลเลตตา (Coletta et al) (33) และทิปตัน (Tipton et al) (30) แต่การแบ่งตัวและการสร้างไฟโบรเนคตินกลับมีปริมาณลดลงซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของทิปตัน (30) ที่พบการแบ่งตัวและการสร้างไฟโบรเนคตินมากขึ้นในผู้ป่วยเหงือกโตที่ไม่มีอาการความผิดปกติทางพันธุกรรมใดๆ สำหรับผู้ป่วยเหงือกโตรายที่สองที่มีอาการปัญญาอ่อน (Mental Retardation) มีการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของคอลเลตตา (33) และทิปตัน (30) แต่มีการสร้างคอลลาเจนลดลงเช่นเดียวกับการศึกษาของจอห์นสัน (Johnson et al) (31)

เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยเหงือกโตรายแรกมีอาการความผิดปกติทางพันธุกรรมบางประการที่เหมือนกับผู้ป่วยเหงือกโตจากการศึกษาจอห์นสันและคณะ (31) คืออาการขนมากผิดปกติแต่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ทำงานตรงข้ามกันคือเซลล์จากผู้ป่วยในการศึกษานี้แบ่งตัวช้าลงแต่สร้างคอลลาเจนมากขึ้นในขณะที่เซลล์จากการศึกษาของจอห์นสันและคณะ (31) แบ่งตัวช้าลงและสร้างคอลลาเจนน้อยลง ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอาการความผิดปกติทางพันธุกรรมอื่น ๆ ที่ไม่เหมือนกัน ผู้ป่วยเหงือกโตในการศึกษาครั้งนั้นนอกจากจะมีอาการขนมากผิดปกติแล้วยังมีประวัติของการชัก ส่วนผู้ป่วยเหงือกโตในการศึกษาเอง จอห์นสัน และคณะ (31) นอกจากจะมีอาการขนมากผิดปกติแล้วยังมีอาการลิ้นโตผิดปกติและใบหน้าผิดปกติซึ่งจอห์นสันและคณะกล่าวว่ามีอาการคล้ายซิมเมอแมน-ลาแบงซินโดรม (Zimmerman-Laband Syndrome)

การแปรผลจากการศึกษาครั้งนี้ควรจะใช้ความพิถีพิถันเป็นพิเศษ เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคเหงือกโตจากกรรมพันธุ์มีต่ำมาก (1: 750,000) (21) ทำให้เป็นไปได้ยากที่

จะมีจำนวนผู้ป่วยให้ศึกษามากพอที่จะอนุมานถึงกลไกที่แท้จริงของการดำเนินโรค
อย่างไรก็ตามการรวบรวมและแลกเปลี่ยนข้อมูลซึ่งกันและกันให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้
ก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะเชื่อให้เกิดการค้นหาวิธีป้องกัน ที่จะช่วยให้ผู้ป่วยเหล่านี้ไม่ต้องได้รับ
การผ่าตัดเหงือกหลาย ๆ ครั้ง ดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ยังมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเท่าใด
ความเข้าใจถึงกลไกพื้นฐานของโรคก็จะยิ่งมากขึ้นเท่านั้น และยังเพิ่มศักยภาพของการ
ค้นหาการรักษาที่เฉพาะเจาะจง สำหรับผู้ป่วยเหงือกโตแต่ละชนิดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Panuska HJ, Gorlin RJ, Bearman JE, Mitchell DF. The effect of anticonvulsant drug upon the gingiva a series of analysis of 1,048 patients, part I. J. Periodontol 1960;31: 336-344.
2. Panuska HJ, Gorlin RJ, Bearman JE, Mitchell DF. The effect of anticonvulsant drug upon the gingiva a series of analysis of 1,048 patients, part II. J. Periodontol 1961;32:15-28.
3. Angelopouloos AP, Goag PW. Incidence of diphenylhydantion gingival hyperplasia. Oral surgery 1972;34, 898-96.
4. Kapur RN, Girgis S, Little TM, Mosotti RE. Diphenylhydantion-induced gingival hyperplasia; its relationship to dose and serum level. Developmental Medicine and child Neurology 1973;15: 483-487.
5. Hassell TM, O'Donnell J, Pearlman J, Tesini D, Murphy. T, Best H. Phenyton induced gingival overgrowth in institution epileptics. J.Clin Periodontol. 1984;11:242-253.
6. Ledaman D, Lumerman H. Reuben s, Freedman PD. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. Report of a case. Oral Surgery 1984;57:620-622.
7. Ramon Y, Bchar S, Kishon Y, Engdbag JS. Gingival hyperplasia caused by nifedipine – a preliminary report. International J.of Cardiology 1984;5:195-204.
8. Van Der Wall EE, Tuinging DB, Hes J. Gingival hyperplasia induced by nifedipine, an arterial vasodilating drug. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology. 1985;60:38-40.
9. Lucas RM, Howell LP, Wall BA. Nefedipine – induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study. J. of Periodontol 1985;56:211-215.
10. Bencini PL, Crosti C, Sala F, Montagnino, G, Tarantino A, Menni S, Piccinno. Gingival hyperplasia by nifedipine; report of a case. Acta Dermatological Venereol 1985;64:362-365.
11. Jones CM. Gingival hyperplasia associated with nifedipine (letter). British Dental J. 1986;160: 416-447.
12. Starzl TE, Klintmalim. GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GPJ. Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone. New England Journal of Medicine 1981;395: 266-269
13. Calne RY, Rollers K, White DJG, Thiru S, Evans D.B., Henderson R, Hamil DL., Boom. U, McMaster P, Gibby O, Williams R. Cyciosporin A in

Clinical organ grafting. Transplantation Proceedings 1981;13:349-358.

14. Ratsitschank-Pluss EM, Hefti A, Lortscher R, Theil G. Initial observations that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J. of Clin Periodontol* 1983;10:237-246.
15. Wysocki GP, Gretzinger HA, Laupaus A, Ulan RA, Stiller CR. Fibrous hyperplasia of the gingival : a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 1983;55: 274-278.
16. Adams D, Davies G. Gingival hyperplasia associated cyclosporin A. A report of two cases. *British Dental J*. 1984;157:89-90.
17. Bennett JA, Christian JM. Cyclosporine – induced gingival hyperplasia; a case report and literature review. *JADA* 1985;111: 272-273.
18. Rostock MH, Fry HA, Turner JE. Severe gingival overgrowth associated cyclosporin therapy. *J. of Periodontol* 1986;57:294-299.
19. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Syndromes of the Head and Neck*, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 1990:852.
20. Seymour RA, Heasman PA, Macgregor IDM. *Drugs, Diseases and the Periodontium*. Oxford: Oxford University Press, 1992.
21. Fletcher JP. Gingival abnormalities of genetic origin : preliminary communication with special reference to hereditary gingival fibromatosis. *J Dent Res*. 1966; 45:497-612.
22. Rushton MA. Hereditary or idiopathic hyperplasia of the gums. *Dent Pract* 1957; 136-46.
23. Savara AM, Suher T, Everett FG, Burns AG. Hereditary gingival fibromatosis: Study of a family. *J Periodontol* 1954; 25:12-21.
24. Zackin SJ, Weisberger D. Hereditary gingival fibromatosis. Report of a family. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 1961; 14: 828-36.
25. Raeste AM, Collan T, Kilpinen E. Hereditary fibrous hyperplasia of the gingival With varying penetrance and expressivity. *Scand. J Dent Res* 1978; 86:357-65.
26. Jorgenson RJ, Coker ME. Variation in the inheritance and expression of gingival fibromatosis. *J Periodontol* 1974; 45:427-7.
27. Anderson J, Cunliffe WJ, Roberts DF, Close H. Hereditary gingival fibromatosis. *Br Med J* 1969; 3: 218-9.
28. Jorgenson R, Cocker M. Variation in inheritance and expression of gingival fibromatosis. *J Periodontol* 1974;45:472-477.

29. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth* 1983;65:55-63.
30. Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblast. *J Periodontol* 1997;68:524-530.
31. Johnson BD, EL-Guindy M, Ammons WF, Narayanan S, Page RC. A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J Periodontal Res* 1986; 21:403.
32. Shirasuna K, Okura M, Watatani K, Hayashido Y, Saka M, Matsuya T. Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* 1989; 7:381-385.
33. Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Page RC, Bozzo L. Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res* 1998; 33:469-475.

ผลงานที่ได้จากโครงการ

ต้นฉบับสำหรับส่งตีพิมพ์ในวารสาร: Journal of Periodontology

ชื่อ: Proliferation and synthesis of fibronectin and collagen in fibroblasts derived from
hereditary gingival fibromatosis

ภาคผนวก

Proliferation and synthesis of fibronectin and collagen in fibroblasts derived from hereditary gingival fibromatosis

Suttatip Kamolmatyakul

Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hadyai, Songkla, Thailand 90112

Somporn Sawadison

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

***To whom correspondence and reprint requests should be addressed**

Correspondence to: Suttatip Kamolmatyakul, Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hadyai, Songkla, Thailand 90112, Tel: 66-74-429875, Fax: 66-74-429875, E-mail: ksuttati@ratree.psu.ac.th

Key Word: Fibroblasts, fibronectin, collagen, hereditary gingival fibromatosis.

Abstract

Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is a fibrotic enlargement of the gingiva, usually seen as an isolated finding or occasionally in association with other features as part of a syndrome. The combination of gingival enlargement, hypertrichosis, epilepsy, and mental retardation is also a commonly reported syndrome that features gingival fibromatosis. Many factors could contribute to the clinical overgrowth of the gingiva including fibroblast proliferation, fibronectin (FN) production and collagen synthesis. In this *in vitro* study we further investigated the connection of these factors with particular syndromes of HGF. Fibroblast strains were derived from gingiva of two convulsive disorder patients with HGF (HGFH strain and HGFM strain) and one normal patient (NG strain). The patient with HGFH had hypertrichosis and that with HGFM had mental retardation. Fibroblast morphology was examined using an inverted microscope, fibroblast proliferation was determined by MTT assay, and FN and collagen synthesis were measured by ELISA. The results showed that fibroblasts from HGFH strain were smaller, proliferated significantly slower (51% decrease, $p \leq 0.05$) and secreted lower amount of FN (33% decrease, $p \leq 0.05$) but produced greater amount collagen (200% increase, $p \leq 0.05$) than the age- and sex- matched normal human gingival fibroblast strain (NG strain). In contrast, fibroblasts from HGFM strain were larger and showed a higher rate of proliferation (55% increase, $p \leq 0.05$), but lower rate of collagen synthesis (50% decrease, $p \leq 0.05$). No statistical difference was detected in the amount of FN secretion from the fibroblasts of HGFM and NG strains. In conclusion, similar clinical fibrotic enlargement in HGF may result from different underlying mechanism due to their distinct genetic heterogeneity.

Introduction

Gingival fibromatosis (GF) usually develops as an isolated disorder, but rarely as part of a syndrome (1, 2, 3, 4), affecting only one in 750,000 people (5). Those clinical features commonly associated with syndromic form of GF are hypertrichosis, epilepsy, and mental retardation (1-3, 6). Hereditary GF (HGF), also known as idiopathic GF, is usually identified as an autosomal dominant condition; although, recessive forms are described in literature. (5, 7-10). Recently Hart and co-workers (11) demonstrated that at least two loci are responsible for autosomal dominant hereditary GF, one of which already known is 2p 21 – p22 (12).

There are conflicting reports of the proliferation of HGF fibroblasts in vitro, with one study reporting normal growth (13) and another reporting slower proliferation than normal fibroblasts (14). Histologically, fibromatosis is described as a moderate hyperplasia of the epithelium with hyperkeratosis and elongation of the rete peg. The increase in tissue mass is primarily the result of an increase and thickening of the collagenous bundles in the connective tissue stroma. The lesions are relatively acellular and feature an increased amount of randomly arranged bundles of collagen. (15). Shirasuna et al. (14) found that HGF fibroblasts synthesis much higher amount of collagens and glycosaminoglycans than normal fibroblasts in vitro. On the other hand, Johnson et al. (13) reported that the fibroblasts from their gingival hyperplasia patient with unidentified syndrome produced less amount of collagen.

While the underlying pathogenic mechanism of gingival fibromatosis is not known and alteration in the collagen metabolism has been demonstrated (13, 14), little attention has been paid to another vital matrix protein, fibronectin.

Fibronectin is a multifunctional extracellular matrix glycoprotein that participates in cell adhesion (16), migration (17), phagocytosis (18), and extracellular

matrix formation (19), and is a product of fibroblasts (20). As a result, fibronectin is thought to play a major role both in fibroblast matrix production and in the ability of cells to interact with extracellular matrix. The significance of this matrix protein in the pathogenesis of HGF has not yet been fully explored. This *in vitro* study of gingival fibroblast strains derived from two patients with HGF and one normal fibroblast strain was undertaken to investigate phenotypic characteristics of those cells which could contribute to the clinical gingival overgrowth: proliferation and the production of collagen and fibronectin.

Material and methods -

Fibroblasts

Human gingival fibroblast strains were derived from the gingiva of 2 patients with HGF, using standard techniques (21). One strain was derived from a 14-year-old girl with HGF and mental retard patient. The other strain was derived from a 9-year-old boy with HGF and hypertrichosis patient. Control fibroblasts were derived from a healthy 9-year-old boy. The cells were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplement with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin and 2.5 µg/ml fungizone). The culture were maintained at 37°C in humidified with atmosphere of 5% CO₂ in air. Fibroblasts used in this study were between passage 4 and 7.

Proliferation

The cell proliferation assay was performed using a method modified from the original MTT colorimetric assay described by Mosmann (22). Fibroblasts were seeded on 24-well culture plates (NUNC) at 3×10^4 cells/well in 2 ml DMEM medium as described

above. After 3 days, the pictures of all strains of fibroblasts were taken from an inverted microscope and MTT assay was performed. Briefly, the medium was removed and replaced with 300 μ l/well DMEM (without phenol red) medium. Fifty μ l of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) at a concentration of 5mg/ml in PBS was added to each well. The plates were then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4 h. After incubation, the medium was removed and 1 ml of dimethyl sulfoxide (Sigma) was added to each well in order to solubilize the blue formazan. After solubilization, absorbance was read immediately using spectrophotometer at 570 nm.

Fibronectin production

Fibronectin secreted by the fibroblasts into culture supernatants was measured with an enzyme immunoassay (ELISA). To obtain culture supernatant fluids for this assay, 3×10^4 cells/well in 2 ml DMEM medium as described above were seeded in 24-well culture plates. After culturing at 37°C in 5% CO₂ for 6 days, the supernatants were collected for assay. The amount of fibronectin production was determined with an ELISA kit (Chemicon, Temecula, CA.) and read with spectrophotometer at 450 nm.

Type I collagen synthesis

The production of type I collagen was determined with an ELISA. To obtain culture supernatant fluid for this assay, 3×10^4 cells/well in 2 ml DMEM medium were seeded in 24-well culture plates as described above. After culturing at 37°C in 5% CO₂ for 6 days, the cell layers were collected for assay. The cells were removed by scraping with a rubber policeman in 0.05 M acetic acid. Collagen was digested overnight with

pepsin (Sigma). The remaining polymeric collagen (intra- and inter-crosslinkages within the polymeric collagen molecule) was digested overnight with pancreatic elastase (Sigma). The amount of type I collagen production was determined with an ELISA kit (Chondrex Inc, Redmond, WA) and read at 490 nm.

Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation and were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA).

Results

Fibroblasts Morphology

Fibroblast cells retrieved from HGF and control had a characteristic fibroblastic shape, spindle with a central spherical nucleus and typical cytoplasmic prolongations. However, Fibroblasts from HGF with hypertrichosis strain (figure 1A) were smaller than those from age- and sex- matched normal human gingival fibroblast strain (figure 1B). In contrast, fibroblasts from HGF with mental retardation were larger than those from control (figure 1C).

Proliferation

Fibroblast proliferation was measured with MTT assay, and the results of these triplicate experiments are shown in figure 2. Fibroblasts from HGF with hypertrichosis strain proliferated 51% slower ($p \leq 0.05$) than those from age- and sex-matched normal human gingival fibroblast strain whereas those from HGF with mental retardation proliferated 55% faster ($p \leq 0.05$) than control.

Fibronectin production

The amount of fibronectin was measured in culture supernatants by ELISA. Figure 3 depicts the results of triplicate measurements in representative experiments. Fibroblasts from HGF with hypertrichosis strain secreted smaller amount of FN (33% decrease, $p \leq 0.05$) than those from age- and sex- matched normal human gingival fibroblast strain. No statistical difference was detected in the amount of FN secretion from the fibroblasts of HGFM and NG strains.

Type I collagen synthesis

The results of triplicate measurements of collagen type I synthesis are shown in figure 4. Fibroblasts from HGF with hypertrichosis strain produced 50% less collagen ($p \leq 0.05$) than those from age- and sex- matched normal human gingival fibroblast strain whereas those from HGF with mental retardation produced 200% more collagen ($p \leq 0.05$) than control.

Discussion

Increase proliferation rates of fibroblasts could contribute to the bulk of HGF gingiva due simply to the synthesis of activity of an increased number of cells in the tissue. Elevated collagen deposition and excessive fibronectin production by HGF fibroblasts could also directly contribute to the clinical gingival enlargement. This study has shown that, *in vitro*, fibroblasts from HGF with hypertrichosis (HGFH) were smaller, proliferated significant slower and produced smaller amount of FN but greater amount of collagen type I than age- and sex- matched normal human gingival fibroblast strain. In contrast, fibroblasts from HGF with mental retardation (HGFM) were larger and showed higher rate of proliferation, but lower level of collagen

synthesis. No statistical difference was detected in the amount of FN secretion from the fibroblasts of HGFM and NG strains.

The results from this study are consistent with previous studies. Fibroblasts from HGFH proliferated slower but produced much more collagen than those from controls. Shirasuna et al. (14) also found the lower proliferation rate, but higher collagen synthesis of fibroblasts from their hereditary gingival fibromatosis patients. On the other hand, fibroblasts from HGFM proliferated faster but synthesized less collagen than those from control. The higher proliferation rate is similar to the studies of Coletta et al. (23) and Tipton et al. (24). However, the collagen production from HGFM are different from the studies of Coletta et al. (23) and Tipton et al. (24). They reported higher collagen synthesis in fibroblasts from their hereditary gingival fibromatosis patients.

The finding of this study should be interpreted with some care. A small incidence and prevalence of HGF resulted in the difficulty of getting enough sample size to infer the results to the population. Nevertheless, it is important to gather and share as much information as possible in order to find a preventive protocol to help these patients avoid the many gingivectomies they currently require. The more studies from additional patients are carried out, the better understanding of the underlying mechanism we gain. Consequently the curative procedure to prevent the overgrowth of gingiva in gingival fibromatosis patients from any etiologic factor can hopefully be achieved. For example if we know that the underlying mechanism of gingival overgrowth is due to high proliferation, the intervention to interrupt this proliferation can be implemented. On the other hand, procedures that cause reduction of fibroblast function: fibronectin and collagen synthesis can be introduced to gingival

fibromatosis patients whose underlining mechanism is due to the high activity of these fibroblast functions.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund (TRF), grant no. PDF/06/2544. The authors thank Mrs. Jude Cowden for her critical reading of the manuscript.

Figure Legends

Figure 1. Phase-contrast microscopic features of human gingival fibroblasts cultured from normal (A), from HGFH (B) and from HGFM (C). Note the typical spindle characteristics of fibroblasts (x 200).

Figure 2. Proliferation of human gingival fibroblasts. MTT colorimetric assay was performed and absorbance was read using spectrophotometer at 570 nm. The mean values of triplicate measurements in representative experiments are indicated (* $p \leq 0.05$).

Figure 3. Fibronectin production by human gingival fibroblasts. Fibronectin released by the cells into culture supernatants was measured by ELISA. The mean values of triplicate measurements in representative experiments are indicated (* $p \leq 0.05$).

Figure 4. Type I collagen production by human gingival fibroblasts. Type I collagen digested from human gingival fibroblasts was measured by ELISA. The mean values of triplicate measurements in representative experiments are indicated (* $p \leq 0.05$).

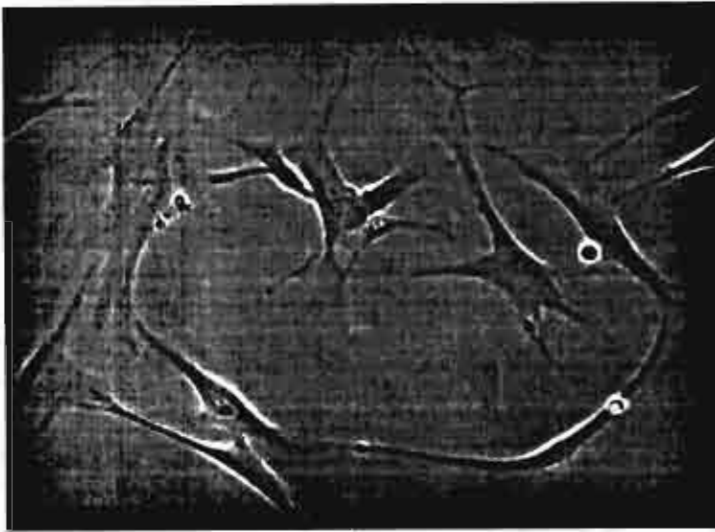


Figure 1A

NG

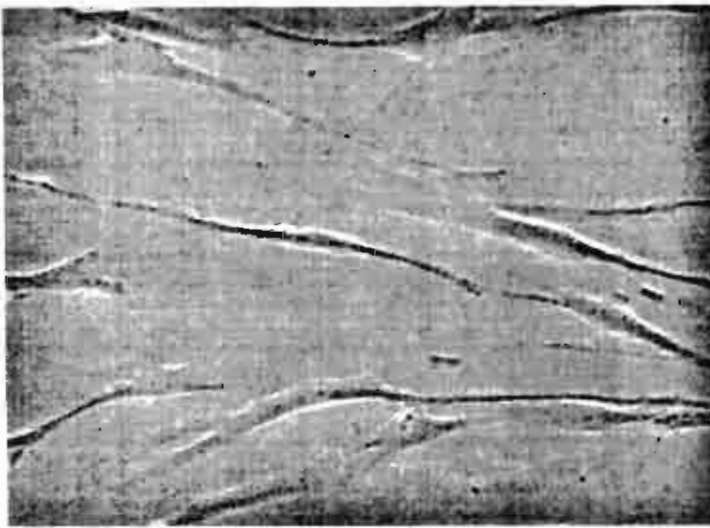


Figure 1B

HGFH

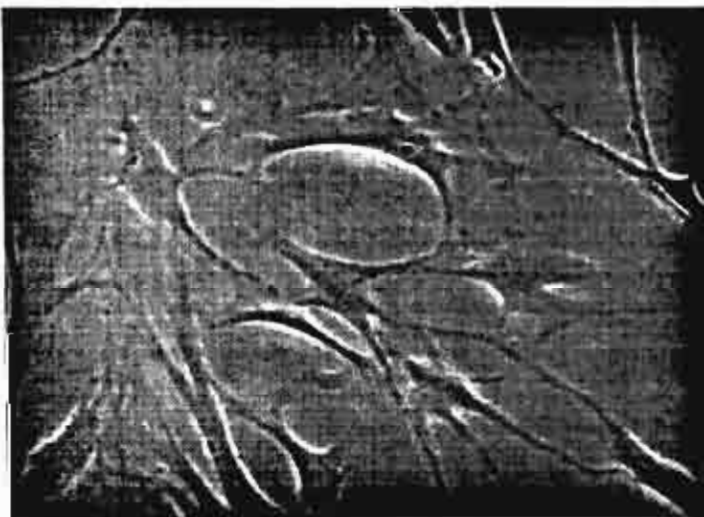


Figure 1C

HGFM

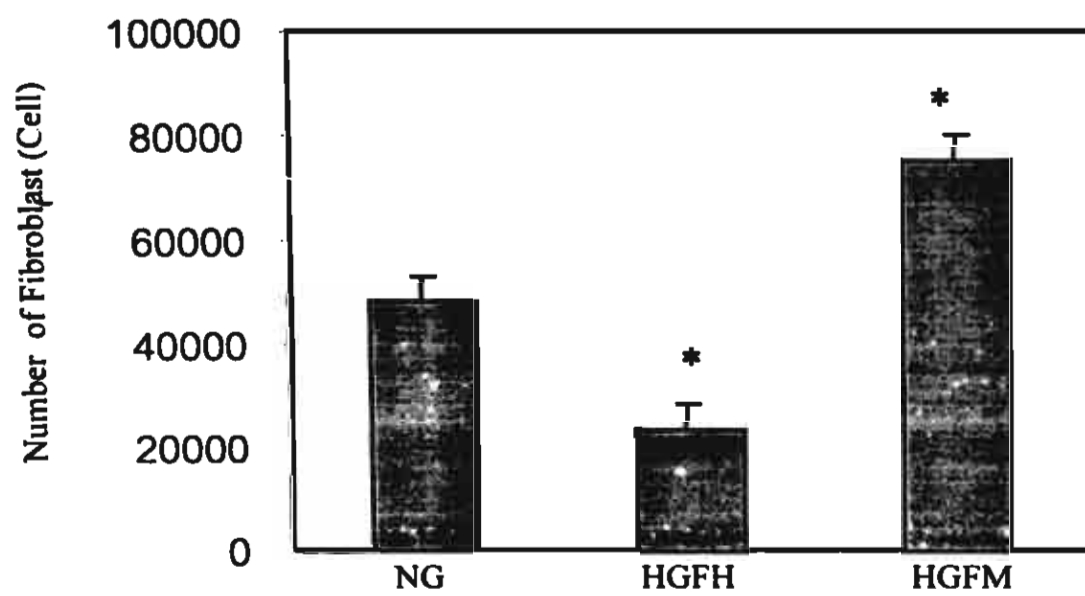


Figure 2.

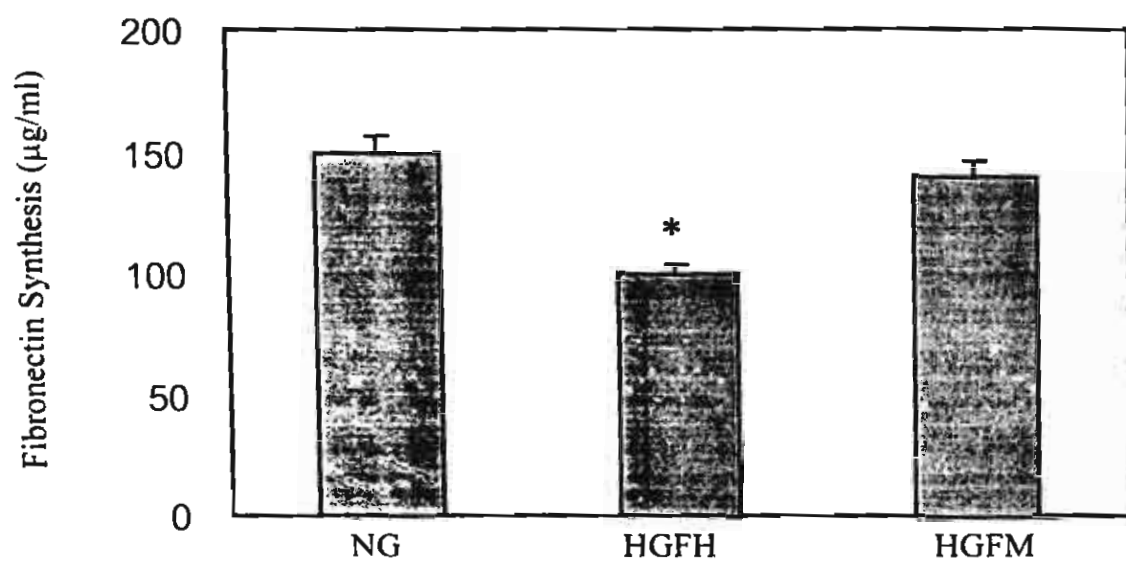


Figure 3.

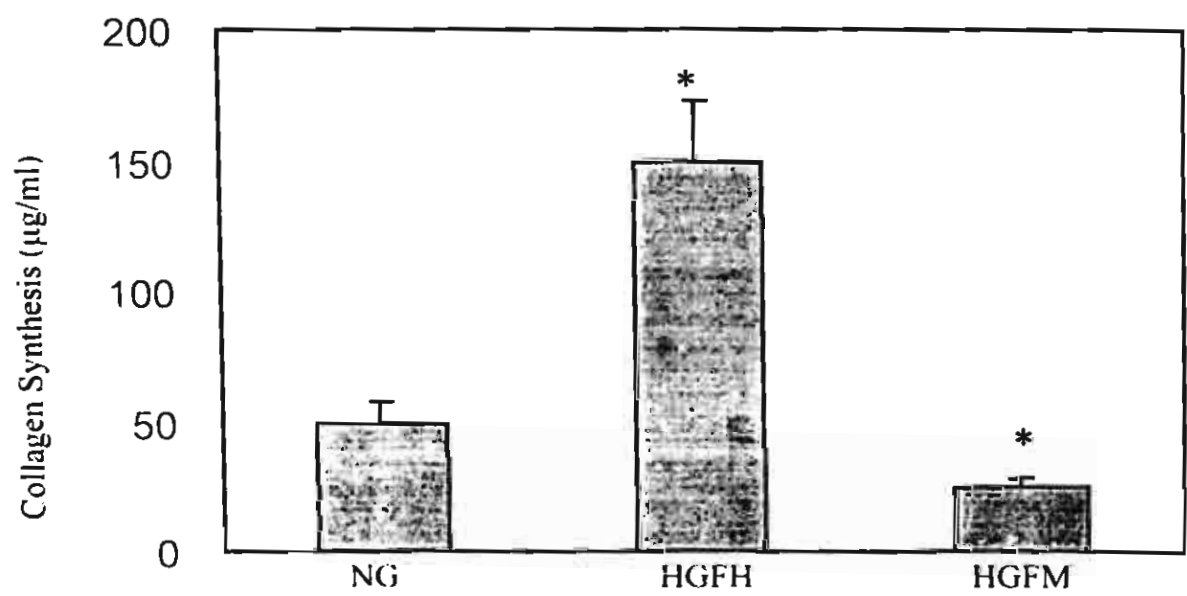


Figure 4.

References

1. Horning GM, Fisher JG, Barker BF, Kilroy WJ, Lowe JW: Gingival fibromatosis with hypertrichosis: a case report. *J Periodontol* 56:344-347, 1985.
2. Synder CH: Syndrome of gingival hyperplasia, hirsutism and convulsions. *J Pediatr* 67:499-502, 1965.
3. Anderson J, Cunliffe WJ, Roberts DF, Close H: Hereditary gingival fibromatosis. *Br Med J* 3:218-219, 1969.
4. Gorlin RJ, Pinborg JJ, Cohen Jr MM: Syndromes of the head and neck, 2nd Ed. New York: McGraw Hill, 1976, pp 329-336.
5. Fletcher JP: Gingival abnormalities of genetic origin; preliminary communication with special reference to hereditary gingival fibromatosis. *J Dent Res* 45:597-612, 1966.
6. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS: Syndromes of the head and neck. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1990, pp 852.
7. Savara AM, Suher T, Everett FG, Burns AG: Hereditary gingival fibromatosis: Study of a family. *J Periodontol* 25:12-21, 1954.
8. Zackin SJ, Weisberger D: Hereditary gingival fibromatosis: Report of a family. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 14:828-836, 1961.
9. Raeste AM, Collan T, Kilpinen E: Hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva with varying penetrance and expressivity. *Scand J Dent Res* 86:357-365, 1978.
10. Fritz ME: Idiopathic gingival fibromatosis with extensive osseous involvement in a 12-year-old boy. *Oral Surg* 30:755-758, 1970.
11. Hart TC, Pallos D, Bozzo L, Almeida OP, Marazita ML, O'Connell JR, Cortelli JR: Evidence of Genetic Heterogeneity for Hereditary Gingiva Fibromatosis. *J Dent Res* 79:1758-1764, 2000.

12. Hart TC, Pallos D, Bowden DW, Bolyard J, Pettenati MJ, Cortelli JR: Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. *Am J Hum Genet* 62:876-883, 1998.
13. Johnson B, el-Guindy M, Ammons W, Narayanan A, Page R. A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the prominent feature. *J Periodont Res* 1986;21:403-413.
14. Shirasuna K, Okura M, Watatami I, Hayashido Y, Saka M, Matsuya T. Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* 1989;7:381-385.
15. Becker W, Collings CK, Zimmerman ER, De la Rosa M, Singdahlsen D: Hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 24:313-318, 1967.
16. Adams JC, Watt FM. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes $\alpha 5 \beta 1$ integrin loss from the cell surface. *Cell* 1990;63:425-435.
17. Shoji S, Rickard KA, Ertl RF, et al. Bronchial epithelial cells produce lung fibroblast chemotactic factor: fibronectin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1989;1:13-20.
18. Czop JK, Dasish J, Austen KF. Augmentation of human monocyte opsonin-independent phagocytosis by fragment of human plasma fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:3649-3653.
19. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectin: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 1982;95:369-377.
20. Baum BJ, McDonald JA. Metabolic fate of the major cell surface protein of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;8-15.

21. Tipton DA, Pabst MJ, Dabbous MKh. IL-1 β and tumor necrosis factor α -independent monocyte stimulation of fibroblast collagenase activity. *J Cell Biochem* 1990;44:253-264.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
23. Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Page RC, Bozzo L. Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res* 1998; 33:469-475.
24. Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblast. *J Periodontol* 1997;68:524-530.



ภาพก่อนการผ่าตัดเหงือก

ภาพหลังการผ่าตัดเหงือก

ผู้ป่วยรายแรก



ภาพก่อนการผ่าตัดเหงือก

ผู้ป่วยรายที่สอง (HGFM)