

ribosomal RNA (rRNA) at the same position but not 18S rRNA sequence of eukaryotic cells, served as a positive control to indicate relatively equal amount of bacterial DNA used for PCR in each sample. The conditions of PCR were denaturing temperature at 95°C 45 sec; annealing temperature at 60°C 45 sec; and polymerizing temperature at 72°C 1 min for 30 cycles. PCR was conducted in a Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Germany). The PCR products were resolved on 1.2 % agarose gel (GIBCO BRL) in 1X Tris-Boric EDTA buffer (Amresco, Solon, OH, USA) at 80 volts for 100 min, stained with ethidium bromide (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and visualized under ultraviolet illumination. Gel photographs were taken by a Gel Documentation System (Gel Doc 1000) (Bio-Rad) and a thermal printer (Mitsubishi, Tokyo, Japan), and the pictures were combined and modified by Photoshop software version 5.0. The intensities of PCR products were analyzed by Molecular Analyst software version 1.4 (Bio-Rad), and the median intensities as well as 25th and 75th percentiles for either twelve shallow pockets or twelve deep pockets in each disease group, i.e. AP or CP, were calculated and shown in the box plot for each periodontal bacterium.

Statistical Analysis

To determine whether the median intensities of PCR products, as a representative of the quantities of periodontal bacteria, were associated with deep pockets in either an AP patient group or a CP patient group, data were analyzed by the Mann-Whitney U test using the statistical package for social sciences (SPSS) version 10.0 for Windows.

Results

Microbial Identification by PCR from Subgingival Plaque Samples

To verify the methods of DNA isolation and PCR, twenty-nine paper points were inserted into different sites of periodontal pockets of an aggressive periodontitis patient (subject #0), and were then pooled in the same tube. The result showed that all periodontal pathogens tested in this study, including *A.a.*, *P.g.*, *B.f.*, *P.i.*, and *T.d.*, could be detected by PCR (Fig. 1). The sizes of PCR products in Fig.1 were as predicted and listed in Table 1. Interestingly, only could the low toxicity but not the high toxicity clone of *A.a.* be detected

in this patient with the predicted size of 1,025 bp (an *ltx* lane in Fig. 1).

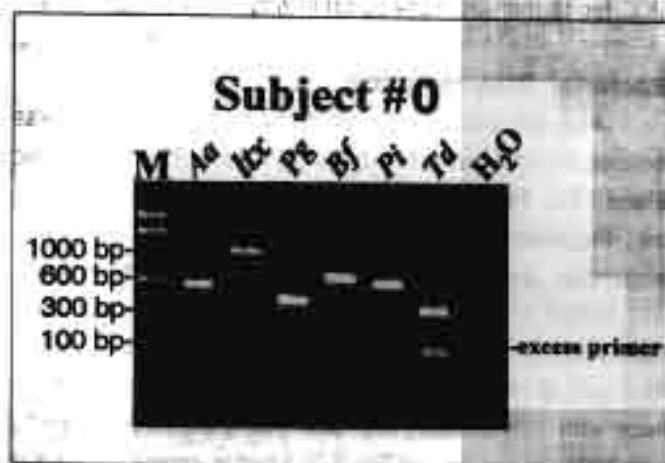


Fig. 1 Microbial identification by PCR in an AP patient (Subject #0). PCR was conducted for 30 cycles using a specific primer pair for each microorganism, including *A.a.* (*Aa*), *P.g.* (*Pg*), *B.f.* (*Bf*), *P.i.* (*Pi*), and *T.d.* (*Td*). The low toxicity clone of *A.a.* (an *ltx* lane) was detected in this patient with the predicted size of 1,025 base pairs (bp). Water (no DNA template) served as a negative control for PCR (in *H₂O* lane). *M* = 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL), which ran along with samples. Note excess amount of primers ran below 100 bp.

Association of Periodontal Pathogens with Periodontal Pocket Depth

To determine whether the prevalence and quantity of each periodontal pathogen were associated with deep pockets, two shallow pockets and two deep pockets were selected from six AP and six CP patients. Two sterile paper points were inserted into each pocket, and the DNA isolation, PCR, and densitometric analyses were performed as described in Materials and Methods. Regardless of the pocket depth, *P.g.*, *B.f.*, *T.d.*, and *P.i.* could be detected in all six AP patients (Fig. 2), whereas only could *P.g.* and *B.f.* be detected in all six CP patients (Fig. 3). On the other hand, *A.a.* could not be detected in every AP and CP patient (Fig. 2 and 3, respectively). Interestingly, identical to the result in Fig. 1, the low toxicity clone (*ltx*) of *A.a.*, as a subset of *A.a.*, was only detected with the predicted size of 1,025 bp (Fig. 2 and 3, respectively). The result from using a primer pair to amplify bacterial 16S ribosomal RNA (*Ubi*) showed a predicted 602-bp PCR product in every sample (the lowest band in Fig. 2 and 3), indicating that approximately equal amount of DNA template from every sample was used in PCR. Note that upper bands in Fig. 2 and 3 were non-specific PCR products,

whose sequences were not determined in this study. There was no PCR product in a negative control (a -ve lane, the

most right lane in Fig. 2 and 3), where two sterile paper points were used instead.

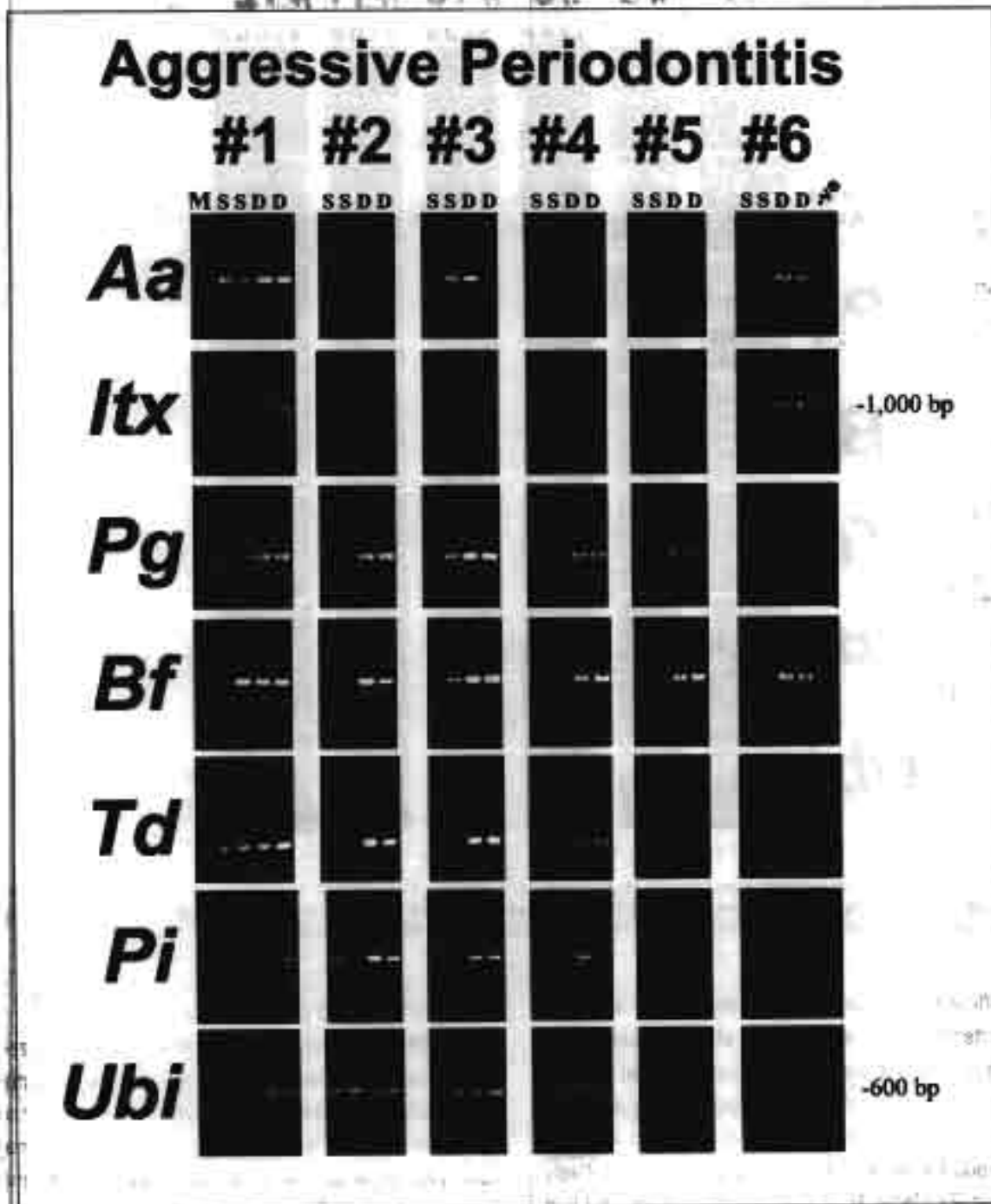


Fig. 2 Association of periodontal pathogens with the levels of probing depth in six aggressive periodontitis (AP) patients (#1-6). Subgingival plaque samples were collected from two shallow (S) and two deep (D) pockets within each patient. -ve was a negative control where two sterile paper points (without being inserted into the pocket) were simultaneously processed along with experimental samples. Note while *P.g.*, *B.f.*, *T.d.* and *P.i.* could be detected from the pockets of all patients, *A.a.* could not. Interestingly, the low toxicity clone of *A.a.* was detected in 5 out of 6 AP patients with the predicted size of 1,025 bp in an *Itx* panel. Bacterial 16S ribosomal RNA (Ubiquitous) served as a positive control (the lowest band around 600 bp in each lane in a *Ubi* panel), showing that approximately equal amount of DNA template was used in PCR for every sample. Upper bands in each lane were non-specific PCR products.

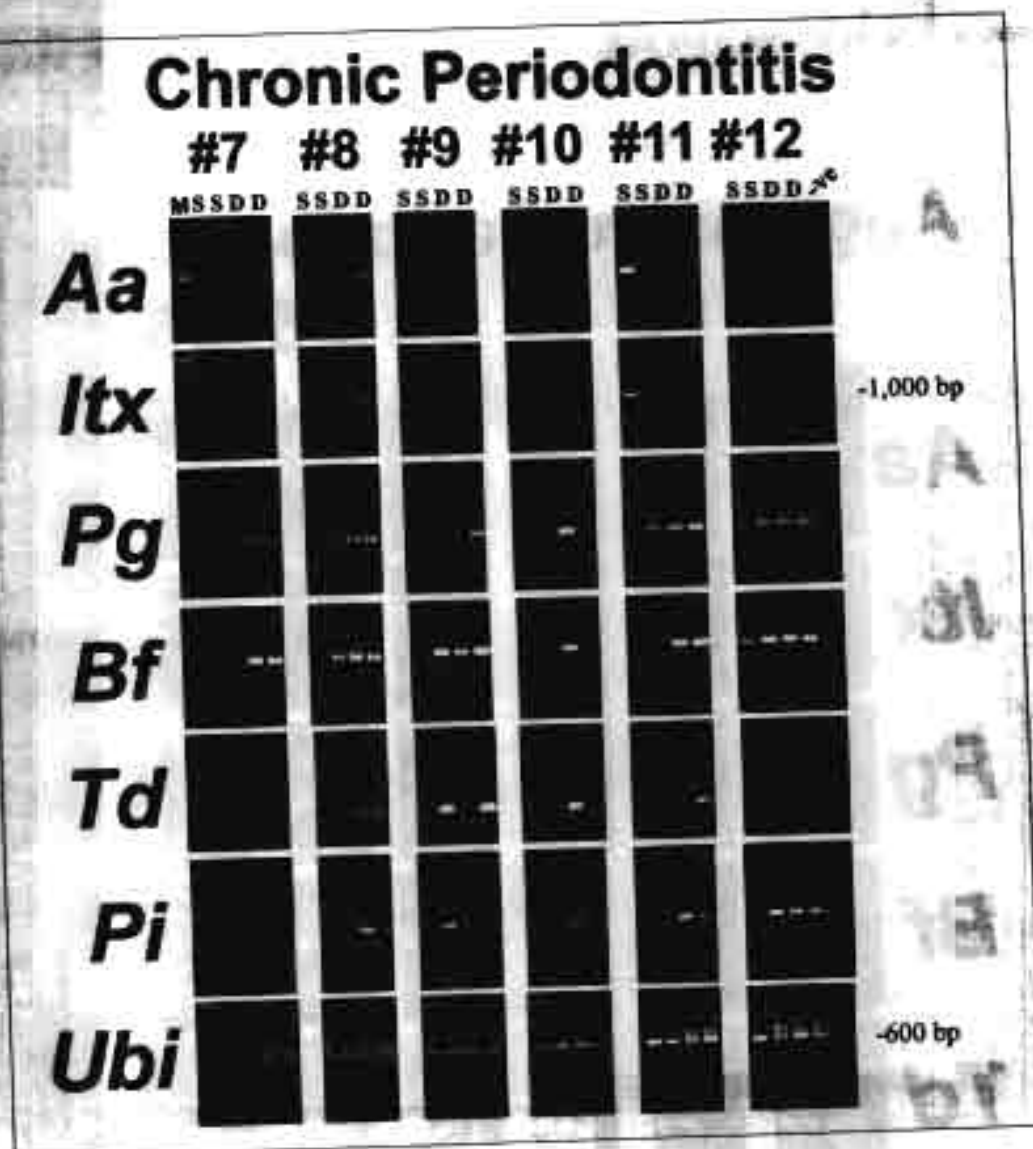


Fig. 3 Association of periodontal pathogens with the levels of probing depth in six chronic periodontitis (CP) patients (#7-#12). Subgingival plaque samples were collected from two shallow (S) pockets and two deep (D) pockets within each patient. Note while *P.g.* and *B.f.* could be detected from the pockets of all patients, *T.d.*, *P.i.*, and *A.a.* could not. The low titer clone of *A.a.* was only detected in 3 out of 6 CP patients with the predicted size of 1,025 bp in an *itx* panel.

The difference between the percentage of microbial detection in deep pocket and that in shallow pocket was evident in an AP patient group for all five microbial species tested (Table 2). However, this difference was only apparent in some specific microorganisms, i.e. *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, in a CP patient group (Table 3), and the difference was relatively less in *A.a.* and *P.i.* (Table 3). These results may suggest that specific bacteria, particularly *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, a triad of periodontopathic microorganisms, are involved with the pathogenesis of any types of periodontal disease, while the role of *P.i.* and *A.a.* in the pathogenesis of periodontal disease may

be more restricted to an aggressive type.

The intensities of PCR products were analyzed by densitometry, and all data from six AP and six CP patients were summarized in Table 4 and 5, respectively, and shown in the box plot format (Fig. 4) for each periodontal pathogen. The box plot showed that, in an AP patient group, the median intensities of PCR products from deep pockets were evidently greater than those from shallow pockets in all microorganisms, including *P.g.*, *B.f.*, *T.d.*, *P.i.*, and *A.a.* (Fig. 4A, B, C, D, and E, respectively). In a CP patient group, the median intensities of PCR products from deep pockets were clearly

greater than those from shallow pockets in *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* (Fig. 4 F, G, and H, respectively), but not in *P.i.* and *A.a.* (Fig. 4 I and J, respectively). The statistical analyses using the Mann-Whitney U test showed that the quantities, represented by the median intensities of PCR products, of *P.g.*, *B.f.*, *T.d.*, *P.i.*, and *A.a.*, were significantly associated with deep pockets

in AP patients ($p = 0.001$, 0.001 , 0.001 , 0.001 , and 0.017 , respectively). However, only were the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* significantly associated with deep pockets in CP patients ($p = 0.001$, 0.007 , and 0.017 , respectively), while the quantities of *P.i.* and *A.a.* were not significantly associated with deep pockets ($p = 0.114$ and 0.887 , respectively).

Table 2 The prevalence of periodontal bacteria in either shallow or deep pockets from AP patients in Fig. 2, as expressed by the percentage of microbial detection (presence of PCR products) in the total of 12 sites.

Microbial species	Presence of PCR products	Presence of PCR products	Difference between
	in shallow pockets (n = 12)	in deep pockets (n = 12)	deep and shallow
	(Percentage)	(Percentage)	pockets
<i>A.a.</i>	3/12 (25.0%)	9/12 (75.0%)	50.0%
<i>P.i.</i>	7/12 (58.3%)	11/12 (91.7%)	33.4%
<i>P.g.</i>	6/12 (50.0%)	12/12 (100.0%)	50.0%
<i>B.f.</i>	6/12 (50.0%)	12/12 (100.0%)	50.0%
<i>T.d.</i>	4/12 (33.3%)	12/12 (100.0%)	66.7%

Table 3 The prevalence of periodontal bacteria in either shallow or deep pockets from CP patients in Fig. 3, as expressed by the percentage of microbial detection (presence of PCR products) in the total of 12 sites.

Microbial species	Presence of PCR products	Presence of PCR products	Difference between
	in shallow pockets (n = 12)	in deep pockets (n = 12)	deep and shallow
	(Percentage)	(Percentage)	pockets
<i>A.a.</i>	4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)	0.0%
<i>P.i.</i>	7/12 (58.3%)	9/12 (75.0%)	16.7%
<i>P.g.</i>	5/12 (41.7%)	12/12 (100.0%)	58.3%
<i>B.f.</i>	7/12 (58.3%)	11/12 (91.7%)	33.4%
<i>T.d.</i>	3/12 (25.0%)	9/12 (75.0%)	50.0%

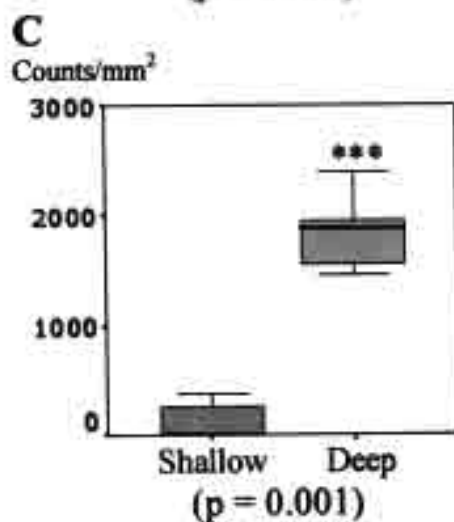
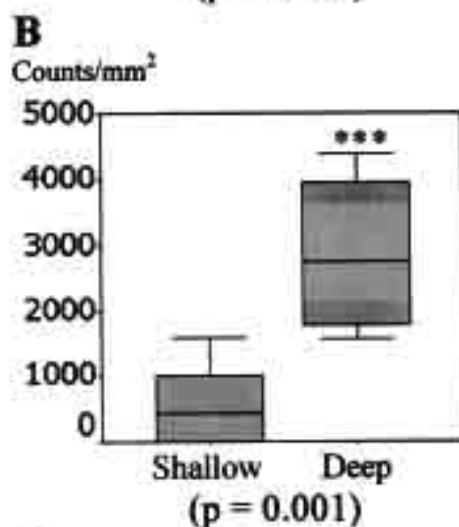
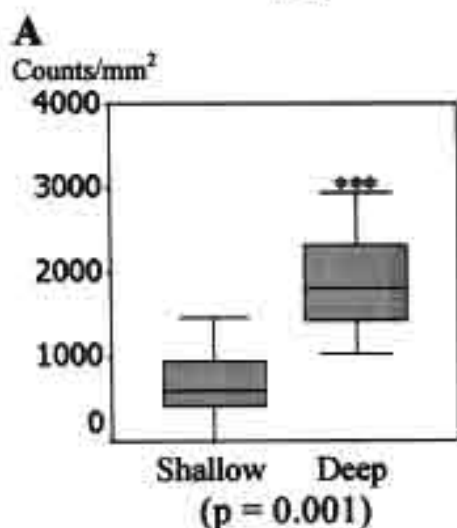
Table 4 Summary of intensities of PCR products from different microbial species from AP patients. F = female; M = male; S = shallow pockets; D = deep pockets

Subject Number	Sex Age (years)	S or D	A.a. Intensities counts/mm ²	P.i. Intensities counts/mm ²	P.g. Intensities counts/mm ²	B.f. Intensities counts/mm ²	T.d. Intensities counts/mm ²
1	F 34	S	1,198	585	841	1,000	1,324
		S	1,097	605	932	1,597	1,567
		D	1,510	76	1,018	1,515	1,831
		D	1,497	738	1,256	1,673	1,824
2	F 42	S	0	779	942	0	371
		S	0	710	565	314	0
		D	0	1,192	1,447	1,884	1,942
		D	105	1,172	1,407	1,951	1,930
3	F 30	S	0	0	0	0	0
		S	1,036	240	1,463	1,504	143
		D	1,353	1,116	2,059	1,763	1,943
		D	51	1,113	1,765	1,563	1,953
4	F 35	S	0	0	537	0	0
		S	0	0	494	0	0
		D	0	2,907	2,929	4,079	2,220
		D	0	994	2,725	4,392	2,400
5	M 32	S	0	1,105	623	801	0
		S	0	431	1,100	1,028	0
		D	445	1,484	2,453	3,943	1,508
		D	1,278	0	2,193	3,958	1,582
6	M 19	S	0	0	327	529	0
		S	0	0	0	0	0
		D	2,311	2,339	1,842	3,809	1,523
		D	1,851	1,479	1,494	3,514	1,464

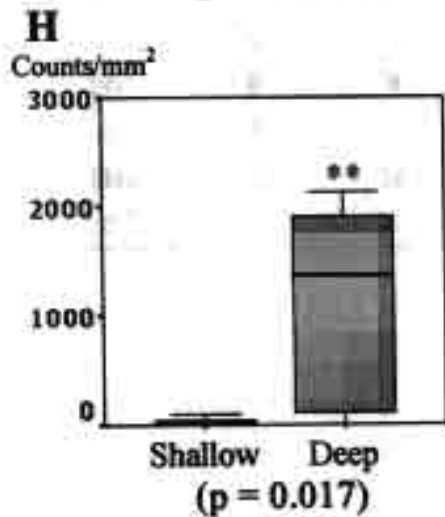
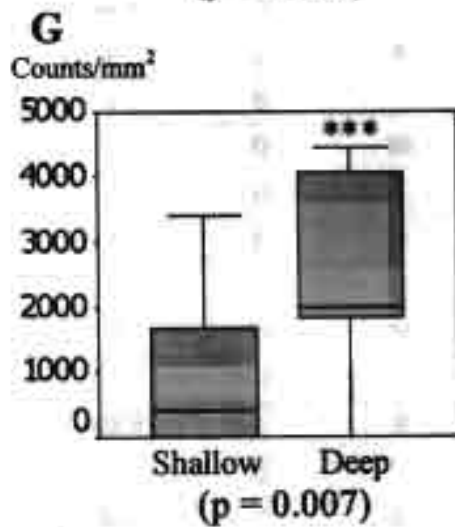
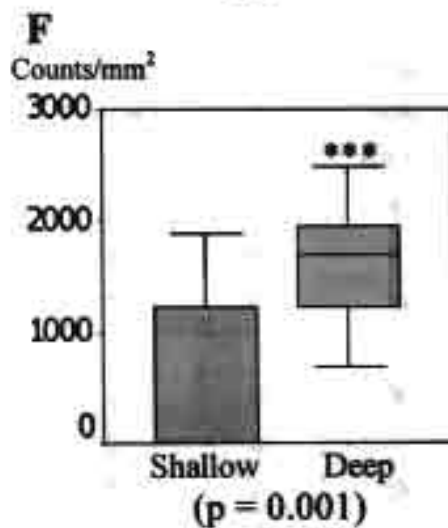
Table 5 Summary of intensities of PCR products from different microbial species from CP patients. F = female; M = male; S = shallow pockets; D = deep pockets

Subject Number	Sex	Age (years)	S or D	A.a. Intensities counts/mm ²	P.i. Intensities counts/mm ²	P.g. Intensities counts/mm ²	B.f. Intensities counts/mm ²	T.d. Intensities counts/mm ²
7	F	65	S	0	0	0	0	0
			S	0	0	0	0	0
			D	0	0	1,880	4,428	1,540
			D	0	0	1,717	4,243	1,171
8	F	45	S	0	0	0	0	0
			S	82	249	1,877	3,390	1,525
			D	0	3,048	2,211	4,237	2,000
			D	1,644	1,578	2,469	3,885	2,084
9	F	66	S	0	0	0	687	0
			S	0	1,035	0	1,971	1,935
			D	0	112	1,071	1,757	229
			D	0	612	1,668	1,558	1,811
10	M	45	S	0	665	0	156	0
			S	0	112	30	0	0
			D	0	729	2,004	2,155	2,021
			D	0	0	686	0	0
11	F	46	S	1,639	0	0	0	0
			S	47	270	1,456	653	86
			D	456	1,504	1,604	1,996	207
			D	61	825	1,885	1,913	1,766
12	F	52	S	127	502	1,150	1,398	0
			S	0	1,319	1,308	2,031	0
			D	142	1,105	1,237	2,014	0
			D	0	1,092	1,200	1,885	0

AP



CP



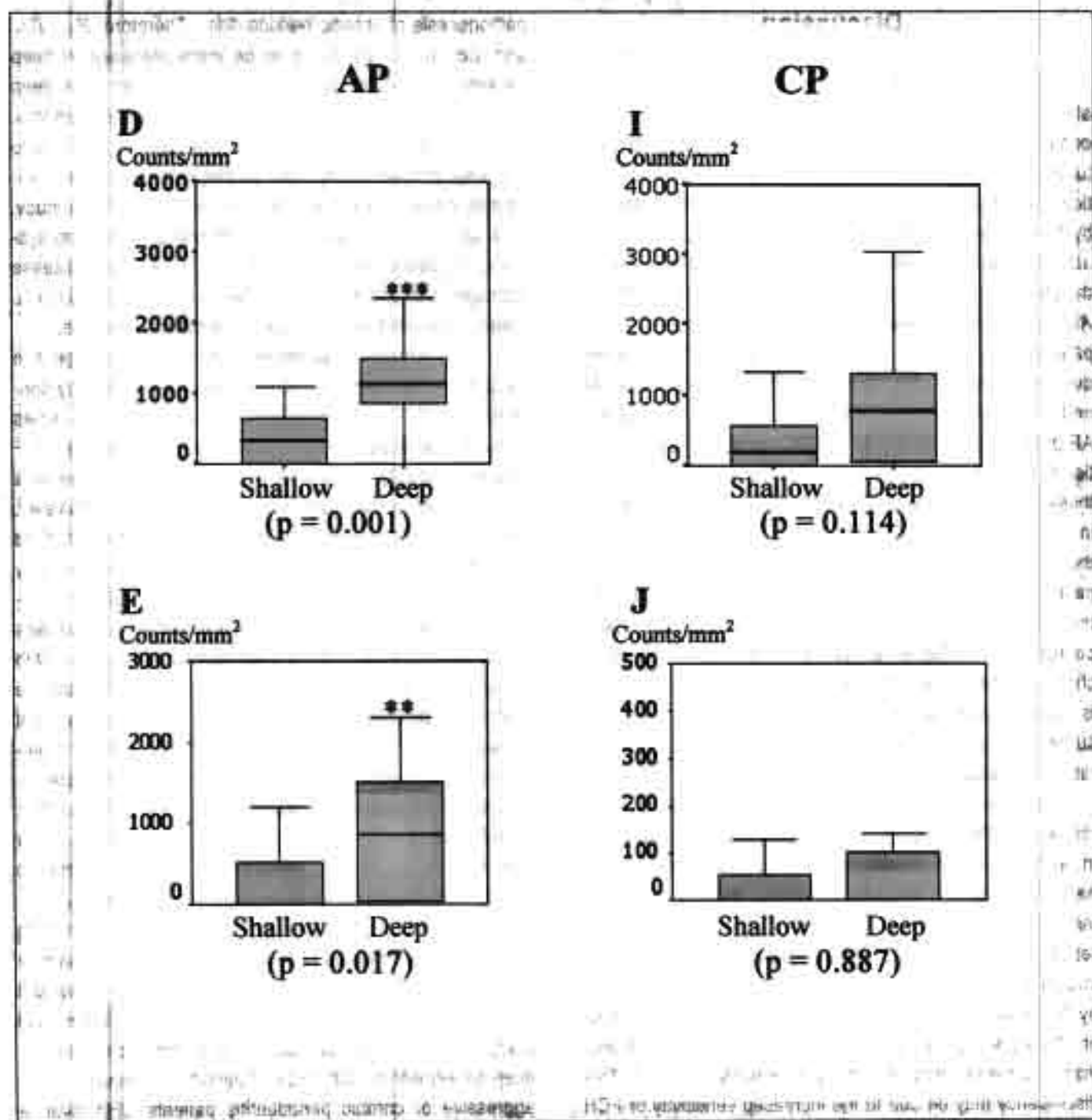


Fig. 4 The box plots show the median intensities as well as 25th and 75th percentiles of PCR products from aggressive periodontitis (AP) for *P.g.* (A), *B.I.* (B), *T.d.* (C), *P.l.* (D), and *A.a.* (E) and chronic periodontitis (CP) for *P.g.* (F), *B.I.* (G), *T.d.* (H), *P.l.* (I), and *A.a.* (J). The median intensities (counts/mm²) of DNA bands on y axis were calculated from twelve shallow pockets or twelve deep pockets in either AP or CP patients for each periodontal microorganism, summarized in Table 4 and 5, respectively. The box plots demonstrated that the median intensities of PCR products in *P.g.*, *B.I.*, and *T.d.* were greater in deep than shallow pockets in both AP and CP, while those in *P.l.* and *A.a.* were greater in deep than shallow pockets only in AP. * = significantly associated at 0.01 < p < 0.05; ** = significantly associated at 0.001 < p < 0.01.

Discussion

In this pilot study, we have shown several findings about the association of periodontal pathogens with periodontal destruction by using conventional PCR, a non-cultural technique, as a screening tool to examine the association. First, the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, as represented by the intensities of PCR products, are significantly associated with deep pockets whose levels are equal to or greater than 6 mm in both AP and CP patients, while those of *P.i.* and *A.a.* are significantly associated with deep pockets only in AP patients. Second, *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* are found more frequently in deep pockets than in shallow pockets in both AP and CP patients, whereas *A.a.* and *P.i.* are found more only in AP patients. These suggest that, in addition to the association of the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* with deep pockets, these three microorganisms are more prevalent in deep than in shallow pockets in both AP and CP patients. Third, only is the low toxicity clone of *A.a.* detected in all AP and CP patients. This finding is consistent with others obtained from the study in Caucasians in northern Europe and Asian population^{19,21}. This is because the highly leukotoxic clone, characterized by a 530-bp deletion of the operon of *ltx* gene, is primarily found among adolescents of African origin who suffer from juvenile periodontitis, suggesting the age and racial predilection of the highly leukotoxic clone^{8,22}.

In comparison with the findings from other studies, the results from this study are comparable to theirs. For example, in rapidly progressive periodontitis, *P.g.* is found to predominate in periodontal lesions with clinical probing depth > 6 mm, followed by *B.f.*, *P.i.*, and *A.a.*²³. In this study, similar results are found, i.e. *P.g.* and *B.f.* are found to predominate in deep pockets with clinical probing depth ≥ 6 mm, followed by *P.i.* and *A.a.* However, in this study, *A.a.* is found in 9 out of 12 deep pockets in aggressive periodontitis (75.0%), higher than the results from the study of Kamma *et al.*²³. This discrepancy may be due to the increased sensitivity of PCR method used in this study to detect bacteria. Moreover, in juvenile periodontitis, *P.g.* is found in 31 of 36 diseased sites (86.1%), followed by *P.i.* (77.8%) and *A.a.* (25%)²⁴, and these results are consistent with our findings in Table 2. The findings from Table 3, which show that the detectable low toxicity clone of *A.a.* and *P.i.* are almost equally found in both shallow and deep pockets in chronic periodontitis, suggest that *A.a.* and *P.i.* may not play a pivotal role in the disease

pathogenesis of chronic periodontitis. Therefore, *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, which are found to be more prevalent in deep pockets and whose quantities are associated with deep pockets in both AP and CP patients, should be selected for a future thorough investigation. Nevertheless, in addition to the polymicrobial factor, other predisposing factors to periodontal disease, which are beyond the scope of this study, such as host responses, genetic influences, underlying systemic conditions etc., are equally important in the disease pathogenesis, and should also be completely examined to better understand the etiologies of periodontal disease.

To represent the quantities of periodontal pathogens in the pocket, the intensities of DNA bands generated by conventional PCR (endpoint PCR) are determined. The values of band intensities as expressed in the unit of counts/mm² may not precisely represent the accurate number of bacteria in the pocket as expressed in the unit of cells/ml. However, the conventional PCR is the most sensitive and rapid method to screen some candidate microbial species that possibly involve with the severity or progression of any types of periodontal disease, before more accurate quantitative analyses will be used to determine the exact number of bacteria. With the advent of advanced technology, real-time PCR using the LightCycler system that allows monitoring of the exponential phase has been used to rapidly detect and accurately quantify periodontal pathogens in subgingival plaque samples²⁵. Real-time PCR has some advantages over conventional PCR, including analysis of more samples at a time and a shorter analytical period. Consequently, it now becomes feasible to conduct a large population study regarding periodontal pathogens in several aspects with real-time PCR. In addition to substituting conventional PCR with real-time PCR, the sample size should be increased by recruiting more aggressive and chronic periodontitis patients in a future study. In this pilot study, we analyze the correlation of periodontal bacteria with deep pocket within each group of periodontal disease, i.e. in aggressive or chronic periodontitis patients. However, a larger study is required before the threshold numbers of various microbial species, associated with different levels of probing depth, can be determined within a specific group of periodontitis.

In this study, we have established the protocols for microbial DNA isolation from subgingival plaque samples and for PCR to amplify the specific microbial DNA using a specific primer pair. These techniques may be applied for a large

วิทยานิพนธ์

การศึกษานำร่องหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของจุลชีพก่อโรคปริทันต์ห้าชนิดและระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ*, ศาสตราจารย์ ดร. กฤษณะกฤษณะ**, อรุณ รัตนพานิช***, วัฒนา อัมไพรวรรณ**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของจุลชีพก่อโรคปริทันต์และระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ ซึ่งประกอบถึงระดับการทำลายอวัยวะปริทันต์ โดยใช้แท่งกระต่ายขนาดเล็กเก็บตัวอย่างความจุลินทรีย์ได้หลังจากทั้งร่องลึกปริทันต์ที่ตื้น (≤ 4 มม.) และลึก (≥ 6 มม.) ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง 6 คนและชนิดเรื้อรัง 6 คน สารพันธุกรรมของจุลชีพถูกสกัดตามวิธีมาตรฐาน และถูกขยายเพิ่มจำนวนด้วยวิธีโพลีเมอร์เชนรีแอคชัน (พีซีอาร์) ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับจุลชีพก่อโรคปริทันต์แต่ละชนิด ทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของแถบสารพันธุกรรมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์และเป็นตัวแทนของปริมาณจุลชีพจากร่องลึกปริทันต์ที่ลึกและตื้น พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของจุลชีพที่ทำการทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ แอคทีโนบาซิลลัส แอคทีโนไมซีเทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เคนดิลไลดา ด้วยวิธีพีซีอาร์ ค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เคนดิลไลดา ด้วยวิธีพีซีอาร์ ค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เคนดิลไลดา มีความสัมพันธ์กับร่องลึกปริทันต์ที่ลึกอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรงที่ $p = 0.001$, 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ และในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังที่ $p = 0.001$, 0.007 และ 0.017 ตามลำดับ ในขณะที่ค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และ แอคทีโนบาซิลลัส แอคทีโนไมซีเทมโคมิแทนส์ มีความสัมพันธ์กับร่องลึกปริทันต์ที่ลึกอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรงที่ $p = 0.001$ และ 0.017 ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และ แอคทีโนบาซิลลัส แอคทีโนไมซีเทมโคมิแทนส์ ไม่มีความสัมพันธ์กับร่องลึกปริทันต์ที่ลึกอย่างมีนัยสำคัญ ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังที่ $p = 0.114$ และ 0.887 ตามลำดับ ข้อมูลนี้เสนอแนะว่าปริมาณของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เคนดิลไลดา มีความสัมพันธ์กับการทำลายอวัยวะปริทันต์ในโรคปริทันต์อักเสบทั้งชนิดรุนแรงและเรื้อรังและสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์ความรุนแรงและการลุกลามของโรคปริทันต์

* ภาควิชาทันตศัลยกรรม-ทันตวิทยาลัยสงฆ์ภาค ๘ คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
 ** ภาควิชาปริทันต์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200
 *** นักศึกษาระดับประกาศนียบัตรบัณฑิต ภาควิชาปริทันต์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200



โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน
Molecules involved with tooth eruption

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

สำเนาการพิมพ์จากวิทยาสารทันตแพทยศาสตร์

ปีที่ ๕๒ ฉบับที่ ๖ พฤศจิกายน-ธันวาคม ๒๕๔๕

หน้า ๔๒๙-๔๓๘

**Reprinted from the Journal of the Dental
Association of Thailand**

Volume 52 Number 6 November-December 2002

pp. 429-438

โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน*

สุทธิชัย กฤษณะประกกรกิจ**

บทคัดย่อ

การขึ้นของฟันเป็นขบวนการธรรมชาติที่อาศัยการละลายตัวกระดูกที่อยู่ล้อมรอบหน่อฟันเพื่อเปิดช่องทางให้ฟันที่กำลังขึ้น ดังนั้นเซลล์สลายกระดูกที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์จากหลอดเลือดภายในถุงหุ้มหน่อฟันจึงมีความสำคัญต่อขบวนการนี้หลาย ๆ การศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโมเลกุลและปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนในการสร้างเซลล์สลายกระดูก การละลายกระดูก และการขึ้นของฟันในที่สุด บทความปริทัศน์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมผลของการศึกษาเหล่านี้และอธิบายถึงบทบาทของโมเลกุลต่อกลไกการขึ้นของฟันในภาพรวม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงบทบาทของ ไคโลไนโตริมูเลตติ้งแฟกเตอร์-1 โมโนไซต์คีโมแอตแทรกแตนต์ทีโปรตีน-1 คอลลาเจน ซี-ฟอส และ นิวเคลียร์แฟกเตอร์-แคปปาบี ในการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการขึ้นของฟัน นอกจากนี้การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของโมเลกุลอื่นๆ เช่น พาราไธรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเตดโปรตีน ออสติโอโปรเทเจรีน เป็นต้น ในการขึ้นของฟัน ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาเหล่านี้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิก และช่วยทำให้เข้าใจถึงชีววิทยาของกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการละลายกระดูกซึ่งเราสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่มีการทำลายกระดูก

บทนำ

วิทยาการความรู้ทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) ได้ส่งผลทำให้การศึกษาค้นคว้าวิจัยที่เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้เจริญรุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว รวมไปถึงการสร้างองค์ความรู้ใหม่ ๆ ทางทันตแพทยศาสตร์ ในบทความนี้จะขอรวบรวมข้อมูลและความรู้ใหม่ ๆ ที่เกี่ยวกับชีววิทยาของ

การขึ้นของฟันในช่วงประมาณ 10 กว่าปีที่ผ่านมา การขึ้นของฟันเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเฉพาะที่และการเหนี่ยวนำให้เกิดการขึ้นของฟันเกี่ยวข้องกับสัญญาณที่มาจากโมเลกุลหลาย ๆ ชนิด ซึ่งถ่ายทอดกันไปมาระหว่างเซลล์ที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน (dental follicle) และที่อยู่ในสเตลเลต เรติคิวลัม (stellate reticulum) ทำให้ถึงต้องเรียนรู้เกี่ยวกับกลไกและโมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน เหตุผลคือเราอาจนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ใน

* ทุนสนับสนุนจาก ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี พ.ศ. ๒๕45

** ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

การกระตุ้นฟันที่ฝังในกระดูกขากรรไกรให้ขึ้นมาในช่องปาก นอกจากนี้เราสามารถเรียนรู้เกี่ยวกับชีววิทยาของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกและการละลายตัวของกระดูกแบบบูรณาการ (integration) ในสิ่งมีชีวิตโดยตรงโดยอาศัยกลไกทางธรรมชาติที่มีอยู่แล้วคือการขึ้นของฟัน การขึ้นของฟันต้องอาศัยการละลายตัวของกระดูกบริเวณที่อยู่ตรงส่วนของตัวฟันเพื่อเปิดเป็นช่องทางให้ฟันโผล่ขึ้นมาสู่ช่องปากได้ในช่วงที่ฟันมีการสร้างเนื้อฟัน (dentin) ที่บริเวณรากฟัน

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในช่วงแรกๆ แสดงถึงความสำคัญของถุงหุ้มหน่อฟันซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลวมๆ ที่อยู่ล้อมรอบฟันต่อการขึ้นของฟัน ถ้าแยกเอาเนื้อเยื่อส่วนนี้ออกไป จะทำให้ฟันไม่ขึ้นมาในช่องปาก⁽¹⁾ ในขณะที่ถ้าเอาหน่อฟันออกแล้วใส่วัตถุอื่นๆ เข้าไปแทนที่หน่อฟัน วัตถุชิ้นนั้นก็ขึ้นมาในช่องปากได้⁽²⁾ สำหรับในระดับเซลล์พบว่ามีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือกราวโมโนไซต์ (monocytes) จำนวนมากเข้ามาที่ถุงหุ้มหน่อฟันในสุนัขอายุ 16 สัปดาห์⁽³⁾ และในหนูอายุ 3 วัน⁽⁴⁾ ซึ่งก็ตรงกับช่วงที่ฟันกรามน้อยซี่ที่ 3 ของสุนัขและฟันกรามของหนูกำลังขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) ในถุงหุ้มหน่อฟันมากที่สุดในช่วงเวลานี้ ดังนั้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์เข้ามาที่ถุงหุ้มหน่อฟันซึ่งตรงกับช่วงเวลาการขึ้นของฟันและช่วงที่มีการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์โมโนไซต์ทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกเกิดเป็นช่องทางให้ฟันขึ้นมาในช่องปาก ความสำคัญของการละลายตัวของกระดูกโดยเซลล์สลายกระดูกต่อการขึ้นของฟันยังพิสูจน์ได้จากหนูทดลองชนิดที่เป็นออสติโอพีโทโรซิส (osteopetrosis) โดยพบว่าเกิดภาวะกระดูกแข็งกระดูก (osteosclerosis) และเซลล์สลายกระดูกไม่ละลายกระดูกเหมือนปกติ จึงทำให้กระดูกที่หนาแน่นกว่าปกติและทำให้ฟันของหนูชนิดนี้ไม่ขึ้นในช่องปาก⁽⁵⁾

โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน

แต่คำถามต่อไปคือว่ามีโมเลกุลอะไรที่มีส่วนช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ มีโมเลกุลหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟันทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม และมีการทดลองต่างๆ ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) แสดงถึงผลของโมเลกุลเหล่านี้ต่อการขึ้นของฟัน

โมเลกุลตัวแรกที่มีบทบาทโดยตรงต่อการขึ้นของฟัน คือ โคลนีสติมูเลตติ้งแฟกเตอร์-1 (colony stimulating factor-1;

CSF-1) (รูปที่ 1) จากการทดลองเมื่อนำ CSF-1 เข้าไปตรงบริเวณหน่อฟันตัดของหนูที่เป็นออสติโอพีโทโรซิส (ไม่มีฟันขึ้นในช่องปาก) อายุ 1 วัน พบว่าฟันตัดของหนูสามารถขึ้นมาในช่องปากได้ และยังพบว่ามีการสร้างเซลล์สลายกระดูกเพิ่มขึ้น⁽⁶⁾ นอกจากนี้เมื่อนำ CSF-1 เข้าไปในหน่อฟันกรามซี่ที่หนึ่งของหนูปกติ ทำให้ฟันกรามซี่ที่หนึ่งของหนูขึ้นเร็วกว่าปกติ และยังพบเซลล์โมโนไซต์เคลื่อนตัวเข้ามาที่ถุงหุ้มหน่อฟันเป็นจำนวนมากและเซลล์สลายกระดูกเพิ่มจำนวนมากขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า CSF-1 จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงเซลล์โมโนไซต์ไปเป็นเซลล์สลายกระดูกซึ่งทำให้เกิดการละลายกระดูกและทำให้ฟันงอกขึ้นมาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ CSF-1 ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอ (mRNA) และระดับโปรตีนในเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) จากถุงหุ้มหน่อฟันที่ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง⁽⁷⁾ เซลล์สร้างเส้นใยเป็นเซลล์หลักและพบจำนวนมากในถุงหุ้มหน่อฟัน นอกจากนี้ CSF-1 มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยสร้าง CSF-1 เพิ่มขึ้นอีก⁽⁷⁾ และอินเตอร์ลิวคิน-1 อัลฟา (interleukin-1 α ; IL-1 α) กระตุ้นการสร้าง CSF-1 โดยเมื่อนำ IL-1 α เข้าไปในหนูทำให้เกิดการแสดงออกของ CSF-1 ที่มากขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน⁽⁸⁾ CSF-1 กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของซินไซฟอส (c-fos) มากขึ้นโดยพบว่าการแสดงออกของ c-fos มีมากขึ้นในหนูที่ถูกฉีดด้วย CSF-1⁽⁹⁾ c-fos เป็นปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีน (transcription factor) ที่จำเป็นต่อการสร้างและการพัฒนาที่สมบูรณ์ของเซลล์สลายกระดูก⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ Grigoriadis และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่าหนูที่ไม่สร้าง c-fos ทำให้หนูเป็นออสติโอพีโทโรซิสและฟันไม่ขึ้นมาในช่องปาก ถึงแม้จะมีการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์มาที่ถุงหุ้มหน่อฟันก็ตามแต่ไม่พบเซลล์สลายกระดูกเลย สรุปได้ว่า c-fos มีหน้าที่ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์โมโนไซต์ให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกที่สมบูรณ์และทำหน้าที่ได้ และการกระตุ้นการทำงานของ c-fos โดย CSF-1 ในถุงหุ้มหน่อฟันมีความสำคัญต่อการขึ้นของฟัน

โมเลกุลตัวที่สองคือโมโนไซต์คีโมแอตแทรคแตนท์โปรตีน-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) (รูปที่ 1) ที่สร้างจากเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) จำนวนมากมายในถุงหุ้มหน่อฟัน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟันสามารถสร้าง MCP-1⁽¹¹⁾ และหลัง MCP-1 ออกมาภายนอกเซลล์⁽¹²⁾ MCP-1 เหนี่ยวนำ

นำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ออกจากหลอดเลือดและเข้าไปอยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน MCP-1 เป็นแฟกเตอร์เส้นเดี่ยวที่มีขนาดความยาวของกรดอะมิโน 148 ตัว ซึ่งประกอบด้วยซิกนัลโดเมน (signal domain) ที่จะต้องถูกตัดออกยาว 23 ตัว และส่วนแฟกเตอร์ที่ทำงานได้ยาว 125 ตัว พบว่าโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟันตัวอื่นๆ อาทิ ทรานส์ฟอร์มีนิงโกรวแฟกเตอร์-เบต้า (Transforming growth factor- β ; TGF- β) และ IL-1 α ต่างกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ MCP-1 เพิ่มขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่พบในถุงหุ้มหน่อฟัน⁽¹³⁾

เมื่อเร็วๆ นี้มีการศึกษาในหนูทดลองที่ไม่สามารถสร้างโปรตีนที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับพาราไธรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone; PTH) ที่มีชื่อว่าพาราไธรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเตดโปรตีน (parathyroid hormone-related protein; PTHrP)⁽¹⁴⁾ โดยพบว่าหนูชนิดนี้ตายตั้งแต่เกิดจากการที่เซลล์ของกระดูกอ่อนเจริญไปเป็นเซลล์ของกระดูกเร็วเกินไป ซึ่งจะ ทำให้มีการสร้างกระดูกอย่างรวดเร็วมากเกินไปในบริเวณที่ควรจะเป็นกระดูกอ่อน ในทางกลับกันหนูที่สร้างโปรตีนตัวนี้มากเกินไปทำให้เกิดความล่าช้าในการสร้างกระดูก ในการศึกษา⁽¹⁴⁾ ยังได้ทดลองตัดแปลงยีนของหนูให้มีการสร้าง PTHrP เฉพาะบริเวณที่เป็นกระดูกอ่อนเท่านั้น ทำให้หนูที่ไม่สร้างโปรตีนชนิดนี้ ดังกล่าวข้างต้นมีชีวิตอยู่รอดได้อีกประมาณ ๑ เดือนหลังจากคลอด แต่ก็ยังพบความผิดปกติของพัฒนาการ อาทิ หนูมีขนาดเล็กกว่าปกติ และที่สำคัญสำหรับบทความนี้คือฟันของหนูชนิดนี้ไม่ขึ้นมาในช่องปาก ในการศึกษาเดียวกัน⁽¹⁴⁾ เมื่อได้มีการตัดแปลงยีนของหนูเพิ่มขึ้นอีกโดยทำให้มีการสร้าง PTHrP ในเนื้อเยื่อผิวหนังโดยการตัดแปลงยีนของหนูและเพิ่มส่วนบริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีนเคราติน 14 (keratin 14) ซึ่งแสดงออกในเนื้อเยื่อผิวหนังเข้าไป ทำให้ฟันของหนูตัวนี้สามารถขึ้นมาในช่องปากได้และยังช่วยแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างกระดูก ผลจากการทดลองนี้พบว่าตัวรับสัญญาณ (receptor) ของ PTHrP แสดงออกทั้งบริเวณเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchyme) ที่อยู่ในบริเวณถุงหุ้มหน่อฟันและบริเวณกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) (รูปที่ 2A) ในขณะที่ PTHrP แสดงออกในเซลล์ที่อยู่ในชั้นสเตรตเวตคิวลัมที่พัฒนามาจากชั้นเยื่อผิวหนังในช่องปากและอยู่ระหว่างอินเนอร์อีนาเมลเอปิเธลิอัม (inner enamel epithelium) และเอาเตอร์อีนาเมลเอปิเธลิอัม (outer enamel epithelium) (รูปที่ 2B) สรุปได้ว่า PTHrP ที่สร้างจากชั้นสเตรตเวตคิวลัมมีความสำคัญ

ต่อการขึ้นของฟันโดยไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณของเซลล์มีเซนไคม์ที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟันให้สร้าง CSF-1 และ MCP-1⁽¹⁵⁾ หรืออาจกระตุ้นให้มีการสร้างปัจจัยที่กระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูกให้มากขึ้นที่เรียกว่าออสติโอคลาสต์ ดิฟเฟอเรนทิเอชันแฟกเตอร์ (osteoclast differentiation factor; ODF) และยับยั้งปัจจัยที่ยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่เรียกว่า ออสติโอคลาสโตเจเนซิส อินฮิบิเตอร์ แฟกเตอร์ (osteoclastogenesis inhibitory factor; OIF) หรือ ออสติโอโปรเทจเร็น (osteoprotegerin; OPG) (รูปที่ 1) โดยพบว่าการทำงานของ PTHrP ที่สร้างจากชั้นสเตรตเวตคิวลัมกระตุ้นการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของ ODF ในขณะที่ยับยั้งการแสดงออกของ OPG ในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากถุงหุ้มหน่อฟัน⁽¹⁶⁾ ผลสรุปจากการสร้างปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์โมโนไซต์ที่มาจากเส้นเลือดให้เป็นเซลล์สลายกระดูก และนำไปสู่การละลายกระดูกที่อยู่เหนือและหุ้มฟันไว้เพื่อเปิดทางให้ฟันขึ้น

ODF หรือเรียกว่า ออสติโอโปรเทจเร็น-ไลแกนด (Osteoprotegerin-ligand; OPG-L) หรือ รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์เคป้าบี-ไลแกนด (receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand; RANK-L) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่สมบูรณ์ และจัดอยู่ในครอบครัวเดียวกันกับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) ในสภาวะปกติ ODF สร้างมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก (bone marrow stromal cell) และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และอยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) (รูปที่ 3) โดยที่ ODF จับกับตัวรับสัญญาณที่มีชื่อว่า รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์เคป้าบี (receptor activator of nuclear factor kappa B; RANK) บนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก (osteoclast precursor cell) ในลักษณะที่เป็นการถ่ายทอดสัญญาณระหว่างเซลล์โดยตรง (direct cell-to-cell signaling) เพื่อกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์สลายกระดูก แต่ในสภาวะที่เกิดการอักเสบนอกจากเซลล์สร้างกระดูกจะสร้าง ODF แล้ว เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) สามารถสร้าง ODF ได้ซึ่งพบ ODF ได้ทั้งบนเยื่อหุ้มเซลล์ที-ลิมโฟไซต์หรือถูกปลดปล่อยออกมา⁽¹⁷⁾ (รูปที่ 3) ดังนั้นในภาวะที่เกิดการอักเสบที-ลิมโฟไซต์สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกโดยผ่านการสร้าง ODF ซึ่งจะจับกับ

RANK บนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สายกระดูกเพื่อกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์สายกระดูก นอกจากนี้ ODF กระตุ้นการสร้างเซลล์สายกระดูกแล้ว ซัยโตไคน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1; IL-1), TNF- α และพรอสตาแกลนดินอี₂ (prostaglandin E₂; PGE₂) สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สายกระดูก (รูปที่ 3)

ออสติโอโปรเทจเรจิน (osteoprotegerin; OPG) เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกและเซลล์สร้างกระดูกในสภาวะปกติ (รูปที่ 3) ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณตัวหลอก (decoy receptor) ที่สามารถจับกับ ODF ทำให้ไม่เกิดสัญญาณกระตุ้นการสร้างเซลล์สายกระดูก ดังนั้น OPG จึงทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับ ODF คือเป็นตัวยับยั้งการเจริญพัฒนาสมบูรณ์ของเซลล์สายกระดูก (รูปที่ 1) เพื่อควบคุมระดับการสร้างเซลล์สายกระดูกและการละลายกระดูกในสภาวะปกติ การทดลองเมื่อเร็วๆ นี้พบว่ามีการแสดงออกของ OPG ในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหมอนข้อ แต่การแสดงออกจะลดลงอย่างมากในช่วงเวลาที่มีการสร้างเซลล์สายกระดูกเพื่อทำหน้าที่ละลายกระดูกและเป็นทางขึ้นของฟัน⁽¹⁴⁾ ดังนั้นการที่การแสดงออกของ OPG ลดลงจะทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเซลล์สายกระดูกมากขึ้นซึ่งก็ตรงกับช่วงเวลาที่พบเซลล์สายกระดูกจำนวนมากในถุงหุ้มหมอนข้อในช่วงเวลาที่มีการทำลายกระดูกหมอนข้อ แต่ถึงอย่างไรก็ตามในช่วงเวลาอื่นๆ นั้นจะมีการแสดงออกของ OPG ตามปกติ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการละลายตัวของกระดูกและการทำลายอวัยวะปริทันต์ (periodontium)⁽¹⁴⁾

จากที่กล่าวข้างต้นถึงบทบาทของ OPG ในการยับยั้งการสร้างเซลล์สายกระดูกและการทำลายกระดูก Teng และคณะ⁽²⁰⁾ ได้ทำการทดลองโดยใช้หนูเป็นโมเดลในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์โดยพบว่าเมื่อฉีดเชื้อราที่-ลิมโฟซัยต์มีการสร้าง ODF (หรือเรียกว่า OPG-L) เพิ่มขึ้นเมื่อหนูติดเชื้อแอกติโนไมซีตัส แอกติโนไมซีตัส (Actinobacillus actinomycetemcomitans) และทำให้เกิดกระบวนการอักเสบที่อวัยวะปริทันต์และกระดูกของหนูถูกทำลายไปอย่างมากจากการกระตุ้นการสร้างเซลล์สายกระดูกโดย ODF แต่เมื่อฉีด OPG ตรงตำแหน่งที่มีการทำลายกระดูกให้หนูทดลองวันเว้นวันเป็นเวลา 8 อาทิตย์ ปรากฏว่าการสร้างเซลล์สายกระดูกและการทำลายกระดูกลดลงไป

อย่างมาก (ประมาณ 75% เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้ถูกฉีด OPG) ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ OPG ในการลดการทำลายกระดูกที่เกิดจากโรคปริทันต์ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่จะนำ OPG มาใช้รักษาโรคปริทันต์ในอนาคต

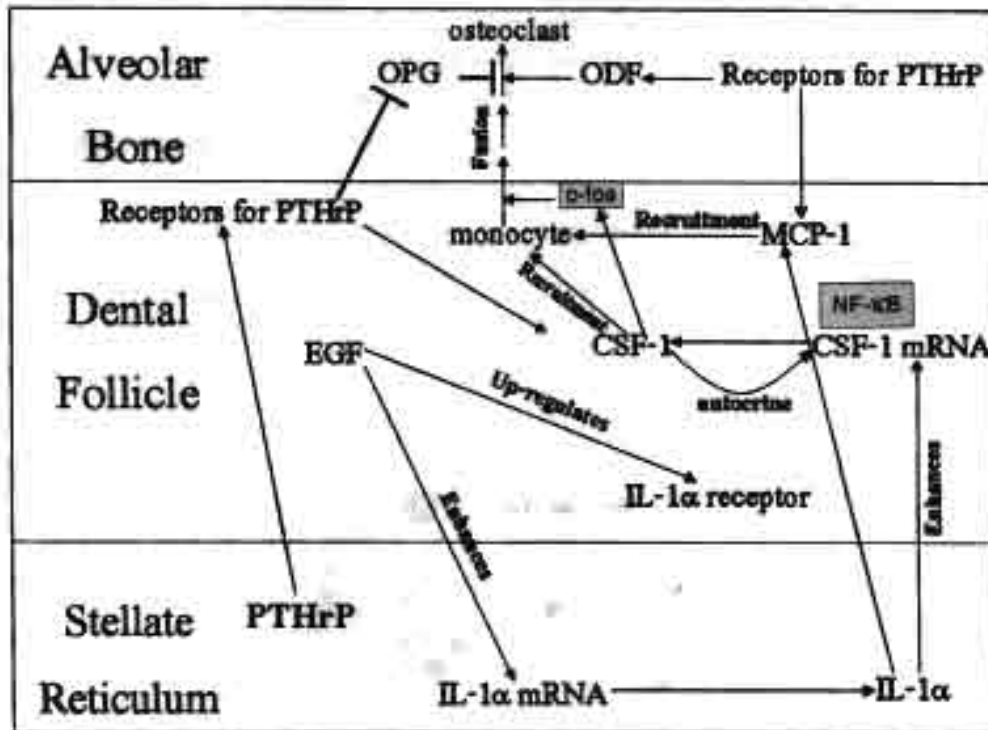
โมเลกุลตัวที่สามคือ IL-1 α (รูปที่ 1) พบว่า IL-1 α เหนือกว่า CSF-1 แสดงออกมากขึ้น⁽²¹⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า IL-1 α แสดงออกในชั้นสเตรตเวตคิวลัม⁽²²⁾ ดังนั้น IL-1 α ที่ถูกหลั่งออกมา อาจจะเคลื่อนเข้าไปกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยในถุงหุ้มหมอนข้อสร้าง CSF-1⁽²³⁾ จากการทดลองเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าหนูที่ไม่สร้างตัวรับสัญญาณต่อ IL-1 α ฟันกรามบนของหนูตัวนั้นขึ้นเข้าไป 2 วัน และฟันคุดขึ้นเข้าไป 1 วันเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ⁽²³⁾ แต่ถึงอย่างไรก็ตามฟันของหนูก็ยังขึ้นตามปกติซึ่งต่างจากหนูที่เป็นออสติโอไฟโทรซิสที่ฟันไม่ขึ้นเลยสรุปได้ว่าโดยปกติแล้ว IL-1 α มีส่วนช่วยในการขึ้นของฟันแต่อย่างไรก็ตามฟันก็ยังขึ้นมาในช่องปากถึงแม้ไม่มีการสร้าง IL-1 α หรือตัวรับสัญญาณ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่ามีโมเลกุลอื่นๆ ที่ทำหน้าที่คล้ายๆ กันทำหน้าที่ซ้ำซ้อนกันอยู่ (redundancy) ถึงแม้ว่าจะขาดโมเลกุลตัวหนึ่งไปแต่อีกตัวสามารถทำงานทดแทนได้จากการทดลองของ Que และคณะ⁽²⁴⁾ พบว่า IL-1 α ที่สร้างมาจากเซลล์ในชั้นสเตรตเวตคิวลัมมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างนิวเคลียร์แฟกเตอร์-แคปปาบี (nuclear factor-kappa B; NF-KB) ในเซลล์สร้างเส้นใยจากถุงหุ้มหมอนข้อ NF-KB เป็นปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนที่มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของหลายๆ ยีน และยีนตัวที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟันและน่าจะถูกรับควบคุมโดย NF-KB คือ MCP-1 เป็นที่ทราบกันดีว่าการแสดงออกของ MCP-1 ถูกควบคุมโดย NF-KB ในเซลล์ชนิดอื่น⁽²⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามผลของ NF-KB ต่อ MCP-1 ควรจะได้รับการศึกษาต่อไป ยังมีรายงานการศึกษาอีก 2 ฉบับที่ยืนยันถึงความสำคัญของ NF-KB ต่อการขึ้นของฟัน โดยพบว่าหนูที่ไม่มีการสร้าง NF-KB ตัวที่ 1 หรือ 2 จะทำให้เกิดความบกพร่องในการเจริญพัฒนาของเซลล์สายกระดูกจนทำให้ฟันของหนูไม่ขึ้นในช่องปาก^(25,26)

โมเลกุลตัวที่สี่คือ เอพิเดอร์มัลโกรวแฟกเตอร์ (Epidermal growth factor; EGF) (รูปที่ 1) EGF สามารถกระตุ้นการขึ้นของฟันหน้าคุดก่อนกำหนด นอกจากนั้นหลังจากฉีด EGF เข้าไปในหนูพบว่า EGF สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-1 α ในเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตรตเวตคิวลัมและมีการกระตุ้นการสร้างตัวรับ

สัญญาณต่อ IL-1 α มากขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน⁽²¹⁾ แต่ EGF ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CSF-1 ได้โดยตรง ดังนั้น EGF กระตุ้นการขึ้นของฟันโดยมีผลทางอ้อมในการกระตุ้นการสร้าง IL-1 α ที่เซลล์ในชั้นสเคลอเทเรคัลลิคัมหรือกระตุ้นการสร้างตัวรับสัญญาณของ IL-1 α ให้เพิ่มขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน

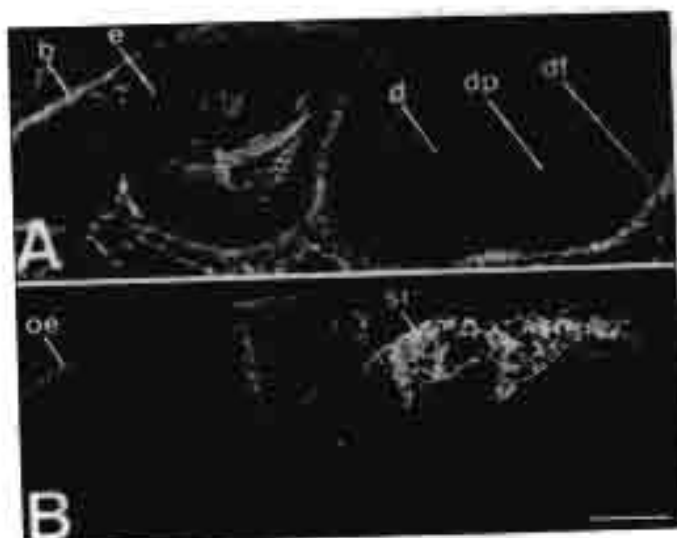
นอกจากโมเลกุลที่ได้กล่าวมาข้างต้น ยังมีสารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อการขึ้นของฟัน ได้แก่ ยาในกลุ่มบิสฟอสเฟต (bisphosphonate) สามารถยับยั้งการทำลายกระดูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไปยับยั้งไม่ให้เซลล์สลายกระดูกพัฒนาอย่าง

สมบูรณ์⁽²⁷⁾ หรือมีรายงานว่ายาในกลุ่มนี้ช่วยส่งเสริมให้มีการตาย (apoptosis) ของเซลล์สลายกระดูก⁽²⁸⁾ มีการนำยาในกลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาโรคที่มีการทำลายกระดูกเช่นโรคมวลดีเฟ็คต์ มัลติไมโยมา (multiple myeloma) ชนิดที่มีการทำลายกระดูก⁽²⁹⁾ ไฟบรอส ดิสเพลเซีย (fibrous dysplasia)⁽³⁰⁾ และนอกจากนี้ มีแนวคิดที่จะนำยาในกลุ่มนี้มาใช้รักษาโรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) สำหรับผลของยาในกลุ่มนี้ต่อการขึ้นของฟันพบว่ายาชื่อพามิโดรเนต (Pamidronate) ทำให้การขึ้นของฟันติดและฟันกรามของหนูทดลองล่าช้าไป ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ในการละลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูกลดลง⁽³¹⁾



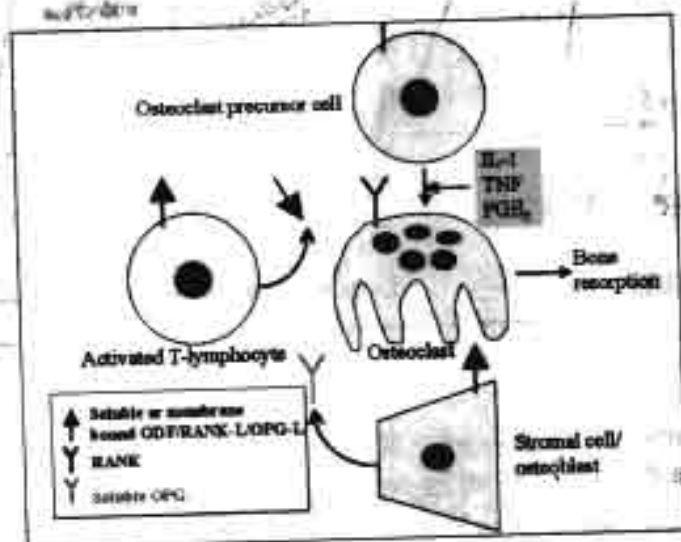
รูปที่ 1 แผนภาพแสดงสมมติฐานของการถ่ายทอดสัญญาณระหว่างโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน → หมายถึง การกระตุ้น — หมายถึงการยับยั้ง ■■■ เน้นถึงปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนได้แก่ c-Fos และ NF- κ B (ดัดแปลงจาก Wise and Lin⁽²⁶⁾)

Fig. 1 A hypothetical diagram shows signaling between different molecules involved with tooth eruption. → means induction; — means inhibition; ■■■ emphasizes c-Fos and NF- κ B transcription factors. This diagram is modified from Wise and Lin⁽²⁶⁾. CSF-1 = colony stimulating factor-1, EGF = epidermal growth factor, IL-1 α = interleukin-1 α , MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1, NF- κ B = nuclear factor-kappa B, ODF = osteoclast differentiation factor, OPG = osteoprotegerin, PTHrP = parathyroid hormone-related protein.



รูปที่ 2 การแสดงออกของอาร์เอ็นเอสำหรับตัวรับสัญญาณสำหรับพาราไธรอยด์ฮอร์โมน-รีเลย์เต็คไวดีน (A) และพาราไธรอยด์ฮอร์โมน-รีเลย์เต็คไวดีน (B) ในกระดูกขากรรไกรล่างบริเวณฟันกรามของหนูโดยใช้เทคนิค อินไซท์ ฮัยบริดไลเซชัน พบการแสดงออกของตัวรับสัญญาณที่กระดูก (b) และที่ถุงฟันเนื้อฟัน (df) ในขณะที่พบการแสดงออกของพาราไธรอยด์ฮอร์โมน-รีเลย์เต็คไวดีนที่เรลด์เยื่อฟันอันแนตติงเยน (oe) และที่สเตลเลท เรลด์คัม (sr). (e) หมายถึงเคลือบฟัน (d) หมายถึงเนื้อฟัน และ (dp) หมายถึงเนื้อฟันที่งอกขึ้น เส้นแสดงขนาดไม (B) แสดงความยาว 0.12 มม. ภาพนี้มาจาก Philbrick และคณะ¹⁴ โดยได้รับการอนุญาตตีพิมพ์จากสถาบันวิทยาศาสตร์แห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา

Fig. 2 mRNA expression of receptors for PTHrP (A) and PTHrP (B) in the molar area of mouse mandible by using in situ hybridization. Expression of receptors is found at bone (b) and dental follicle (df), while expression of PTHrP is found at the outer enamel epithelium (oe) and the stellate reticulum (sr). (e) represents enamel; (d) represents dentin; and (dp) represents dental papilla. The scale bar in (B) represents 0.12 mm. This figure is reproduced with permission from Philbrick et al., 1996¹⁴ (Copyright 1996 National Academy of Sciences, U.S.A.).



รูปที่ 3 การควบคุมการสร้างเซลล์สลายกระดูก (ดัดแปลงจาก Lorenzo¹⁷)

Fig. 3 Regulation of osteoclast formation. This figure is modified from Lorenzo¹⁷. IL-1 = interleukin-1, ODF/RANK-L/OPG-L = osteoclast differentiation factor/receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand/osteoprotegerin-ligand, OPG = osteoprotegerin, PGE₂ = prostaglandinE₂, RANK = receptor activator of nuclear factor kappa B, TNF = tumor necrosis factor.

บทสรุป

บทความปริทัศน์นี้ได้กล่าวถึงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้มาจากการทดลองในสัตว์ทดลองเช่น หนู สุนัข ซึ่งมีชุดฟัน (dentition) ที่แตกต่างจากมนุษย์ ถึงแม้ว่าจะมีการเลี้ยงเซลล์มนุษย์เพื่อทำการทดลอง แต่ผลที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลองนั้นมีความแตกต่างอย่างมากจากผลที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อจริงซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่า ดังนั้นการที่จะสรุปผลของโมเลกุลที่ถูกกล่าวถึงในบทความนี้ต่อการขึ้นของฟันน้ำนมและฟันแท้ในมนุษย์จำเป็นต้องพิสูจน์และทำการทดลองวิจัยเพิ่มเติม นอกจากนี้อาจจะมีโมเลกุลอื่นๆ อีกที่ไม่ได้ถูกกล่าวไว้ในบทความนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการขึ้นของฟัน เนื่องจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยเฉพาะที่ทำการตัดต่อคัดแปลงยีน (transgene) หรือทำให้ยีนนั้นไม่มีการแสดงออก (gene knockout) ทำให้เราสามารถที่จะเลือกศึกษาโมเลกุลเฉพาะบางตัวเท่านั้นที่จะมีผลต่อการละลายกระดูกและการขึ้นของฟันในมนุษย์ บทความนี้ไม่ได้กล่าวถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลร่วมต่อการขึ้นของฟัน เช่น การละลายตัวของกระดูกฟันน้ำนม แรงดันที่ทำให้ฟันขึ้นในช่องปาก หรือการสร้างกระดูกฟันในช่วงที่ฟันกำลังขึ้น แต่บทความนี้ได้รวบรวมเนื้อหาเกี่ยวกับการละลายกระดูกที่อยู่เหนือตัวฟันซึ่งเป็นกลไกอันหนึ่งที่จำเป็นต่อการขึ้นของฟันอย่างละเอียด ดังนั้นจึงขอสรุปเนื้อหาทั้งหมดไว้ดังนี้

การละลายกระดูกจำเป็นต้องอาศัยเซลล์สลายกระดูกที่มาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ในหลอดเลือดที่พบเป็นจำนวนมากในถุงหุ้มหน่อฟัน CSF-1 และ MCP-1 ที่สร้างจากเซลล์สร้างเส้นใยในถุงหุ้มหน่อฟันเป็นตัวชักนำให้เซลล์โมโนไซต์เคลื่อนที่ออกมาจากหลอดเลือดและเข้ามาในถุงหุ้มหน่อฟัน หลังจากนั้น CSF-1 จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์โมโนไซต์ให้เป็นเซลล์สลายกระดูกโดยมีการกระตุ้นผ่านปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนได้แก่ c-Fos และ NF- κ B นอกจากนี้ CSF-1 จะมีบทบาทในการสร้างเซลล์สลายกระดูกนั้น ยังมีโมเลกุลอื่นๆ ที่มีส่วนร่วมในการควบคุมการสร้างเซลล์สลายกระดูก อาทิ PTHrP ที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตเลต เรติคิวลัม สามารถกระตุ้นการสร้าง ODF และยับยั้ง OPG ในเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์มีเซนไคม์ในถุงหุ้มหน่อฟัน ODF มีผลในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกใน

ขณะที่ OPG มีผลในการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก ดังนั้นบทความนี้จึงกล่าวถึงความสำคัญของปฏิกริยาระหว่างเซลล์สองชนิดต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการขึ้นของฟันในที่สุด ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตเลต เรติคิวลัม ซึ่งจะสร้าง PTHrP ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง ODF และยับยั้งการสร้าง OPG ที่สร้างมาจากเซลล์มีเซนไคม์ในถุงหุ้มหน่อฟัน นอกจากนี้ IL-1 α ที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตเลต เรติคิวลัม สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CSF-1 (รูปที่ 1)

สำหรับทันตแพทย์ทั่วไป ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการละลายกระดูกอาจถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางทันตกรรมไม่เฉพาะแต่เรื่องการขึ้นของฟัน แต่ยังเกี่ยวข้องกับการรักษาโรคปริทันต์ที่เกี่ยวข้องกับการละลายกระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคปริทันต์จากที่กล่าวถึงการทดลองของ Teng และคณะ¹⁹⁰¹ พบว่า OPG ช่วยทำให้การละลายกระดูกอันเนื่องมาจากขบวนการอักเสบในโรคปริทันต์ในหนูลดลง แต่ถึงอย่างไรก็ตามในการทดลองนี้จำเป็นต้องฉีด OPG ให้หนูบ่อยครั้ง เนื่องจาก OPG เป็นสิ่งแปลกปลอมและถูกกำจัดออกจากร่างกาย ดังนั้นผู้เขียนมีความคิดที่จะใช้วิทยาการทางด้านอณูชีววิทยาในการปลูกถ่ายยีน OPG เข้าไปในเซลล์ต้นกำเนิดในกระดูกโดยวิธีที่เรียกว่าทรานส์เฟกชัน (transfection) โดยใช้ไวรัสเป็นพาหะ (vector) นำยีนเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์อย่างถาวร เซลล์ต้นกำเนิดนี้ นำมาจากสัตว์ตัวเดียวกันกับที่จะถูกปลูกถ่ายยีน หลังจากนั้นจึงนำเซลล์นี้ใส่เข้าไปในอวัยวะปริทันต์โดยอาจใช้วัสดุต่างๆ ที่ใช้ในการบูรณะอวัยวะปริทันต์ในการนำเซลล์เข้าไปใส่ในเนื้อเยื่อ ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือ OPG จะถูกสร้างตลอดเวลาจากเซลล์ที่ใส่เพิ่มเข้าไปโดยไม่จำเป็นต้องฉีด OPG ให้บ่อยๆ ถ้าหากผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจโดยประเมินจากระดับการทำลายของกระดูกในระยะยาวและผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้น อาจจะขยายการทดลองนี้ออกไปสู่มนุษย์ จากที่กล่าวมาสรุปว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำ OPG มาใช้รักษาโรคปริทันต์เพื่อลดการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการละลายกระดูกซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการสูญเสียฟัน โดยร่วมไปกับการรักษาโรคปริทันต์ตามปกติ

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อานันท์ เอี่ยมอรุณ ในการให้ข้อเสนอแนะในการเขียนบทความ

เอกสารอ้างอิง

1. Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol* 1980;9:189-200.
2. Marks SC Jr, Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol* 1984;29:311-22.
3. Wise GE, Marks SC Jr, Cahill DR. Ultrastructural features of the dental follicle associated with formation of the tooth eruption pathway in the dog. *J Oral Pathol* 1985;14:15-26.
4. Wise GE, Fan W. Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res* 1989;68:150-6.
5. Marks SC Jr. Tooth eruption and bone resorption: experimental investigation of the *la* (osteopetrotic) rat as a model for studying their relationships. *J Oral Pathol* 1976;5:149-63.
6. Iizuka T, Cielinski M, Aukerman SL, Marks SC Jr. The effects of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat illustrate the critical periods for bone resorption during tooth eruption. *Arch Oral Biol* 1992;37:629-36.
7. Wise GE, Lin F. Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. *Arch Oral Biol* 1994;39:621-7.
8. Wise GE. *In vivo* effect of interleukin-1 α on colony-stimulating factor-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. *Arch Oral Biol* 1998;43:163-5.
9. Wise GE, Marks SC Jr, Zhao L. Effect of CSF-1 on *in vivo* expression of c-fos in the dental follicle during tooth eruption. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 (suppl 1): 397-400.
10. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. C-fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994;266:443-8.
11. Que BG, Wise GE. Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol* 1997;42:855-60.
12. Wise GE, Que BG, Huang H. Synthesis and secretion of MCP-1 by dental follicle cells- Implications for tooth eruption. *J Dent Res* 1999;78:1677-81.
13. Que BG, Wise GE. Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. *Dev Dynam* 1998;212:346-51.
14. Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11846-51.
15. Wise GE, Que BG, Huang H, Lumpkin SJ. Enhancement of gene expression in rat dental follicle cells by parathyroid hormone-related protein. *Arch Oral Biol* 2000;45:903-9.
16. Nakchbandi IA, Weir EE, Insogna KL, Philbrick WM, Broadus AE. Parathyroid hormone-related protein induces spontaneous osteoclast formation via a paracrine cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7296-300.
17. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *J Clin Invest* 2000;106:749-52.
18. Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H, Zhang Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. *J Dent Res* 2000;79:1937-42.
19. Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin *in vitro* by rat dental follicle cells and its implication for tooth eruption. *Arch Oral Biol* 2002;47:247-54.
20. Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X, Kong Y-Y, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:R59-R67.
21. Wise GE, Lin F, Zhao L. Immunolocalization of interleukin-

- 1 α in rat mandibular molars and its enhancement after *in vivo* injection of epidermal growth factor. *Cell Tissue Res* 1995;280:21-6.
22. Huang H, Wise GE. Delay of tooth eruption in null mice devoid of the type I IL-1R gene. *Eur J Oral Sci* 2000;108:297-302.
23. Que BG, Lumpkin SJ, Wise GE. Implications for tooth eruption of the effect of interleukin-1 α on nuclear factor- κ B gene expression in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol* 1999;44:961-7.
24. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor- κ B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 1995;48:1263-71.
25. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nature Med* 1997;3:1285-89.
26. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, et al. Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997;11:3482-96.
27. van beek E, Lowik C, van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants *in vitro*: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1999;14:722-9.
28. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000; 24: 99-126.
29. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordon R, George S. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *N Eng J Med* 1996;334:488-93.
30. Weinstein RS. Long-term aminobisphosphonate treatment of fibrous dysplasia: spectacular increase in bone density. *J Bone Miner Res* 1997;12:1314-15.
31. Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a Bisphosphonate. *J Dent Res* 1998;77:8-15.
32. Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. *J Dent Res* 1995;74:303-6.

Review Article

Molecules Involved with Tooth Eruption*

Suttichai Krisanaprakornkit**

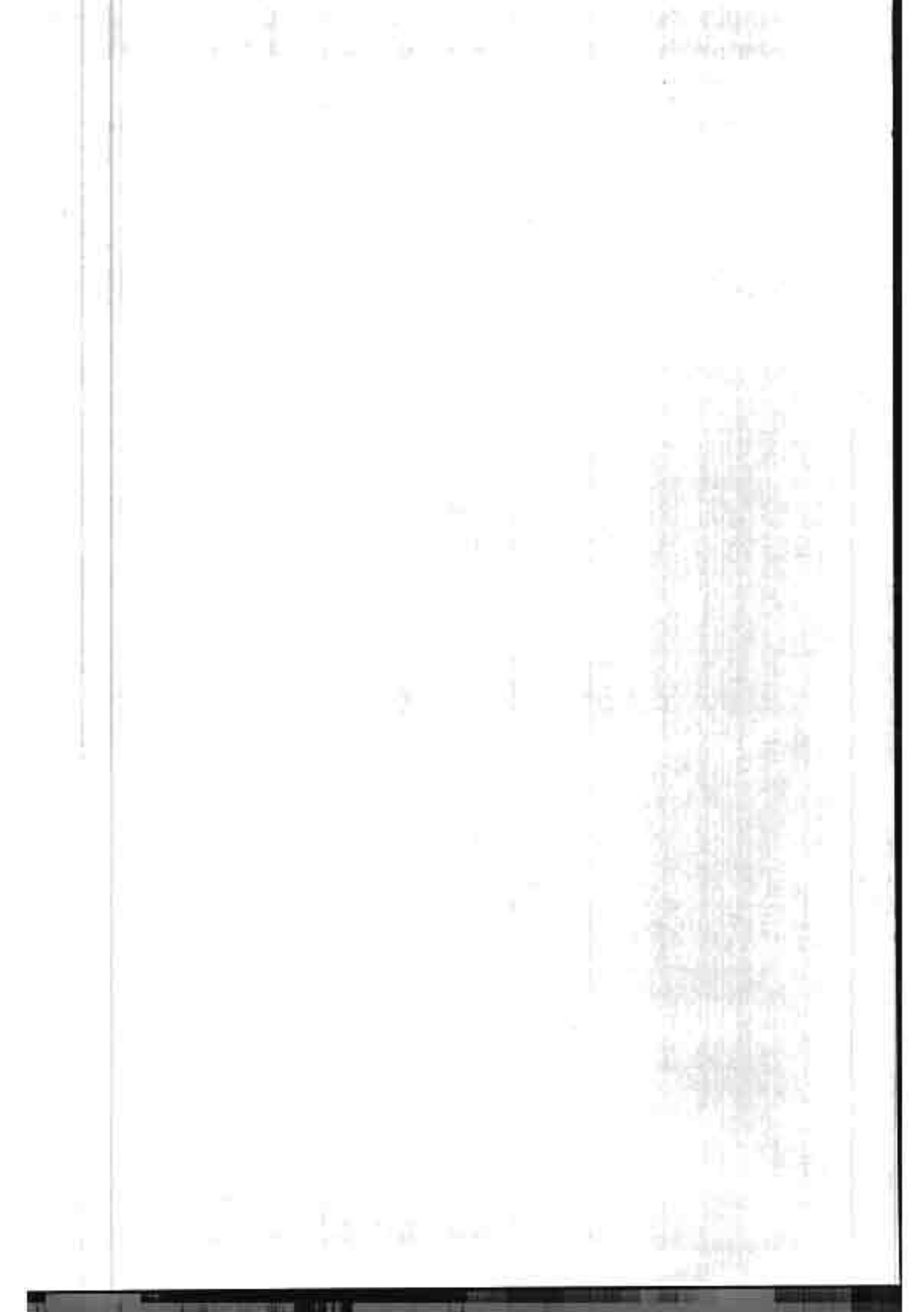
Abstract

Tooth eruption is a natural process that depends on bone resorption surrounding a tooth bud to create a pathway for an erupting tooth. Consequently, osteoclasts, derived from blood monocytes in blood vessels within dental follicle, are essential for this process. Numerous studies have shown the importance of molecules and transcription factors in osteoclast formation, bone resorption, and eventually tooth eruption. The goals of this review article are to gather the results from these studies and to explain the roles of these molecules in the mechanism of tooth eruption as a whole. The results have indicated the role of colony stimulating factor-1, monocyte chemoattractant protein-1, as well as c-Fos and nuclear factor-kappa B, in osteoclast formation and tooth eruption. Moreover, recent studies have demonstrated the role of other molecules, such as parathyroid hormone-related protein, osteoprotegerin, etc., in tooth eruption. The knowledge gained from these studies may be applied for clinical uses and help us understand bone biology, particularly osteoclast formation and bone resorption, in which we can apply for the treatment of bone-resorbing diseases.

Key words : bone resorption; c-Fos; CSF-1; MCP-1; NF- κ B; ODF; OPG; osteoclast; PTHrP

* Financial support by Post-Doctoral Grant, The Thailand Research Fund, 2002

** Department of Odontology-Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200





**เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทาง
ทันตแพทยศาสตร์**

Techniques in Molecular Biology for Dental Research

สุทธิชัย ฤกษ์ประกรกิจ

สำเนาการพิมพ์จากวิทยาสารทันตแพทยศาสตร์

ปีที่ ๕๓ ฉบับที่ ๒ มีนาคม-เมษายน ๒๕๔๖

หน้า ๑๓๑-๑๔๐

**Reprinted from the Journal of the Dental
Association of Thailand**

Volume 53 Number 2 March-April 2003

pp. 131-140

เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์

สุทธิชัย กฤษณะประกวี*

บทคัดย่อ

หลักการที่สำคัญของวิชาอณูชีววิทยาคือขบวนการทราเนสคริปชันและทราเนสเลชัน ทราเนสคริปชันเป็นขบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอจากดีเอ็นเอ ในขณะที่ทราเนสเลชันเป็นขบวนการสังเคราะห์โปรตีน ในปัจจุบันความรู้และเทคนิคต่างๆ ของอณูชีววิทยาได้กลายเป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์สำหรับการทดลองวิทยาศาสตร์เพื่อก่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในระดับโมเลกุลของการพัฒนาสร้างเซลล์และอวัยวะต่างๆ ตลอดจนพยาธิกำเนิดของโรคมากขึ้นเรื่อยๆ การทำวิจัยวิทยาศาสตร์ในสาขาทันตแพทยศาสตร์ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพต้องอาศัยเทคนิคพื้นฐานและขั้นสูงของอณูชีววิทยาเหล่านี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้เพื่อทำให้วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วง ในบทความปริทัศน์ฉบับนี้ ได้แบ่งเทคนิคเหล่านี้ไปตามวัตถุประสงค์ของการใช้เทคนิค เช่น การศึกษาอาร์เอ็นเอเข้ารหัสหรือโปรตีน หรือการศึกษาในหลอดทดลองหรือในเนื้อเยื่อ มีความจำเป็นสำหรับบุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์และทันตแพทย์ทั่วไปที่จะต้องเข้าใจหลักการพื้นฐานของเทคนิคเหล่านี้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยของตนเอง

บทนำ

รากฐานของวิชาอณูชีววิทยา (molecular biology) มาจากพื้นฐานความรู้ที่ว่าอินทรีย์ของมนุษย์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสังเคราะห์อาร์เอ็นเอเพื่อสร้างเป็นโปรตีน ขบวนการถอดรหัสดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอเรียกว่า ทราเนสคริปชัน (transcription) และจากอาร์เอ็นเอถอดรหัสเป็นโปรตีนเรียกว่า ทราเนสเลชัน (translation) เทคนิคต่างๆ ถูกสร้างและพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ขบวนการทั้งสองนี้ ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคต่างๆ ของอณูชีววิทยามาใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์การแสดงออกและหน้าที่ของโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ของร่างกาย ตลอดจนปัจจัยที่ควบคุมการสร้างโมเลกุลเหล่านี้ ซึ่งทำให้ทราบ

ถึงบทบาทของโมเลกุลต่างๆ ต่อการสร้างและพัฒนาอวัยวะหรือต่อการเกิดโรคในช่องปาก ดังนั้นผู้เชี่ยวชาญจึงขอนำความรู้และประสบการณ์ที่ได้รับจากการทดลองในห้องปฏิบัติการมาเขียนบทความเรื่องนี้ เพื่อให้ผู้อ่านได้รับความรู้ที่เป็นประโยชน์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัย เนื่องจากผู้เขียนมีความจำกัดในด้านเนื้อที่ จึงไม่สามารถนำเสนอเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ทั้งหมด แต่จะขอเสนอเทคนิคพื้นฐานบางเทคนิคเท่านั้น ตลอดจนอธิบายหลักการของแต่ละเทคนิคพอสังเขป ถ้าผู้อ่านสนใจสามารถหาความรู้เพิ่มเติมได้จากหนังสือ* ที่ถูกอ้างอิงไว้ท้ายบทความหรือหนังสืออื่นๆ ที่เกี่ยวกับอณูชีววิทยา

การวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสในหลอด

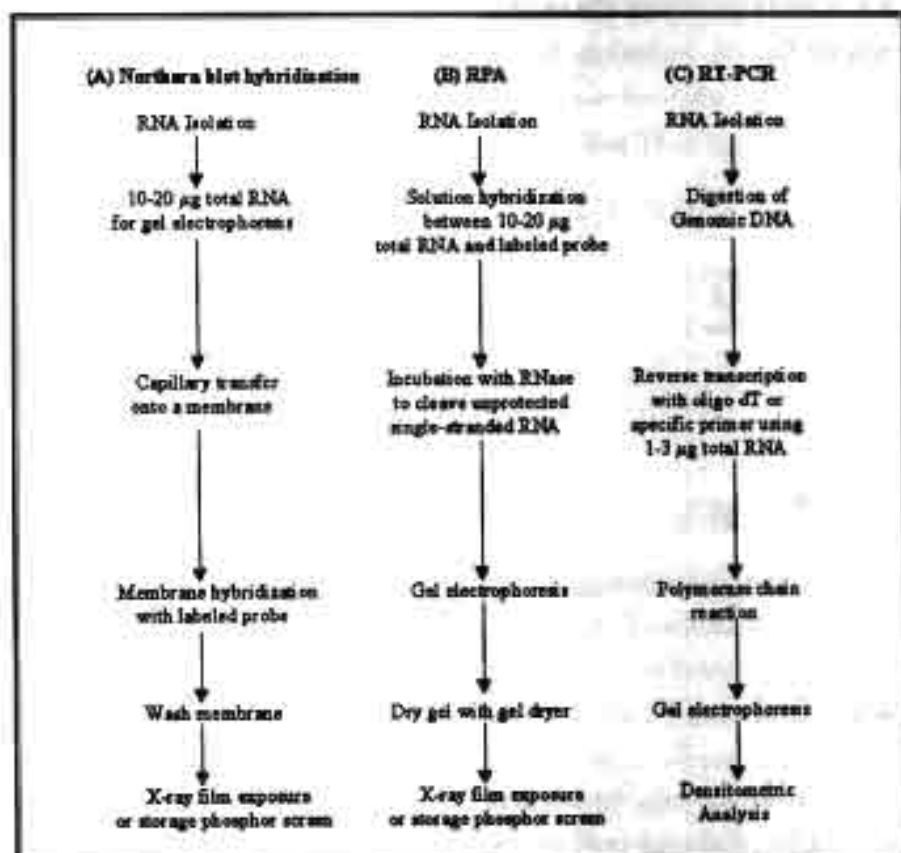
* ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยปี พ.ศ. 2545

ทดลอง (In vitro analysis of mRNA expression)

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย Northern blot hybridization ซึ่งถูกพัฒนามาจาก Southern blot hybridization (ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอ) หลักการย่อๆ (รูปที่ 1) คือการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ที่สกัดได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ อาร์เอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะวิ่งเข้าหาขั้วบวกและถูกแยกตามขนาดที่ต่างกันของอาร์เอ็นเอบนวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ที่มีส่วนผสมของฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำให้อาร์เอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ทำให้ไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และเป็นเส้นเดี่ยวเหมาะสำหรับการจับของโพรบ (probe) โดยที่อาร์เอ็นเอขนาดเล็กจะวิ่งได้เร็วและไกลกว่าอาร์เอ็นเอขนาดใหญ่ หลังจากนั้นจะมีการส่งถ่าย (transfer) อาร์เอ็นเอไปบนเมมเบรน (membrane) ซึ่งมักจะทำได้ด้วยไนลอน (nylon) โดยใช้แรงนำพาจากสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) หลังจากนั้นจะใช้โพรบ

ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและสามารถจับเป็นคู่สม (complementary) กับอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งโพรบจะถูกติดฉลาก (label) ด้วยสารรังสี (radioisotopes) หรือ สารเคมีอื่นๆ เช่น ไบโอติน (biotin) ก่อนที่จะนำมาใช้จับ (hybridization) กับอาร์เอ็นเอบนเมมเบรน โดยส่วนใหญ่มักนิยมใช้อาร์เอ็นเอโพรบเพราะจะจับกับอาร์เอ็นเอได้ดีกว่า ซีดีเอ็นเอโพรบ [cDNA (complementary DNA) probe] หลังจากนั้นใช้วิธีตรวจสอบที่เหมาะสม เช่น ใช้แผ่น storage phosphor screen หรือแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ ในการรับพลังงานรังสีจากสารรังสี เป็นต้น

ยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำห้ส ยาที่ Ribonuclease Protection Assay (RPA) ซึ่งมีหลักการคล้ายกับ Northern blot hybridization แต่แตกต่างตรงที่โพรบจะจับกับอาร์เอ็นเอในสารละลาย (solution hybridization) และต้องใช้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) (รูปที่ 1) ในการตัดสายอาร์เอ็นเอเส้นเดี่ยว (unprotected single-stranded RNA) แต่จะไม่



รูปที่ 1 แผนภูมิเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างขั้นตอนของเทคนิค Northern blot hybridization (A), Ribonuclease Protection Assay (RPA) (B), และ Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (C) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำห้สในหลอดทดลอง

Fig. 1 A diagram compares the differences between techniques used to analyze mRNA expression in vitro, including Northern blot hybridization (A), Ribonuclease Protection Assay (RPA) (B), and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (C).

สามารถตัดสายอาร์เอ็นเอเส้นคู่ (double strand) ซึ่งเกิดจากการจับกันของโพรบและบางส่วนของอาร์เอ็นเอที่สนใจซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกัน ดังนั้นขนาดของแถบ (band) อาร์เอ็นเอที่เห็นจากเทคนิค RPA จึงไม่ใช่ว่าขนาดทั้งหมดของอาร์เอ็นเอที่เห็น ซึ่งจะต่างจากขนาดของแถบอาร์เอ็นเอที่เห็นจากเทคนิค Northern blot hybridization ที่เป็นขนาดจริงของอาร์เอ็นเอที่เห็น ข้อดีของ RPA คือมีความไวต่อการตรวจหาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอมากกว่า Northern blot hybridization ถึง 10 เท่า เนื่องจากการจับกันของโพรบและอาร์เอ็นเอที่เห็นเกิดในสารละลายที่มีปริมาณน้อยๆ เทคนิค RPA นี้จะมีประโยชน์แก่ต้องการศึกษาอาร์เอ็นเอที่เห็นที่มักมีการแสดงออกในระดับต่ำๆ

เทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ตรวจหาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอที่เห็น เช่น Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เทคนิคนี้มีความไวในการตรวจสูงมากกว่าสองเทคนิคข้างต้นโดยสามารถตรวจอาร์เอ็นเอที่เห็นในปริมาณอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ (1-3 µg, รูปที่ 1) และทำได้ง่ายกว่าสองเทคนิคข้างต้น แต่ไม่สามารถวัดระดับปริมาณการแสดงออกของอาร์เอ็นเอได้อย่างถูกต้อง หลักการของเทคนิคนี้ (รูปที่ 1) คือการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่เห็นเป็นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์รีเวิร์ส ทรานสคริปเตส (Reverse Transcriptase) โดยใช้สายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สั้นๆ ที่เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) เฉพาะสำหรับยีนที่ต้องการศึกษา หรือใช้โอลิโกดีที (oligo dT) ซึ่งเป็นสายนิวคลีโอไทด์ยาวประมาณ 16-18 ตัวที่ประกอบด้วยเบสไทมีดิน (thymidine, T) อย่างเดียว ในการเป็นตัวนำสำหรับการเริ่มกระบวนการทราสคริปชันในทิศทางย้อนกลับ (reverse transcription) การใช้โอลิโกดีทีเกิดมาจากหลักการที่ว่าอาร์เอ็นเอที่เห็นทุกตัวของเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic cells) จะมีปลายทางด้านท้ายเป็นโพลีเอเทล (poly A tail) คือประกอบด้วยเบสอะดีนีน (adenine, A) เรียงต่อกันอยู่หลายตัว ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเฉพาะสำหรับอาร์เอ็นเอที่เห็น ดังนั้นเมื่อใส่โอลิโกดีทีเข้าไปในปฏิกิริยาจะจับกับโพลีเอเทลของอาร์เอ็นเอที่เห็นทุกชนิด จึงทำให้เกิดการสร้างดีเอ็นเอที่มีต้นแบบมาจากอาร์เอ็นเอที่เห็นทุกชนิดที่มีการแสดงออกในขณะนั้น หลังจากนั้นใช้หลักการของ polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ทีเคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) จนกระทั่งสามารถตรวจวัดแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR (PCR product) บนฐานอะกาโรสด้วยการย้อมด้วยสีอีเอ็มเอชไอเดียม

โบรไมด์ (Ethidium Bromide) หรือไซเบอร์กรีน (SYBRGreen) และรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม RT-PCR เป็นเทคนิคที่หาการแสดงออกของยีนในระดับกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative) โดยการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) ในขณะที่ Northern blot hybridization และ RPA เป็นการวัดระดับการแสดงออกของยีนอย่างถูกต้องมากกว่า รูปที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างของหลักการของเทคนิคทั้งสามชนิดดังกล่าวข้างต้น

มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR เพื่อให้วัดระดับปริมาณของอาร์เอ็นเอได้ถูกต้องมากขึ้น โดยการเติมดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณแน่ชัดและมีลำดับเบสที่เหมือนกับดีเอ็นเอเข้าไปในตัวอย่างเพื่อเข้าไปแข่งกับดีเอ็นเอที่อยู่ในตัวอย่างในช่วงปฏิกิริยา PCR เรียกวิธีนี้ว่า Competitive RT-PCR ดังนั้นจึงทำให้รู้ปริมาณของดีเอ็นเอในตัวอย่างได้จากการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ เมื่อเร็วๆ นี้มีการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ที่เรียกว่า Real time PCR และ Real time RT-PCR โดยมีหลักการคล้ายกับเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ แต่แตกต่างกันตรงที่สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ถูกต้องเนื่องจากสามารถติดตามผลของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้ในแต่ละรอบของการขยายสารพันธุกรรม (ซึ่งแตกต่างจากเทคนิคดั้งเดิมคือการวิเคราะห์ผลที่รอบสุดท้ายของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (end-point analysis) ซึ่งบางครั้งอาจจะขยายสารพันธุกรรมมากเกินไปจนทำให้ไม่สามารถวัดความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง) ข้อดีของการทราบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR คือทำให้วิเคราะห์ปริมาณได้ในช่วงที่เริ่มมีการเพิ่มขยายสารอย่างรวดเร็วก่อนหรือเรียกว่าล็อกเฟส (log phase) ซึ่งทำให้การวัดปริมาณของสารพันธุกรรมได้ถูกต้อง

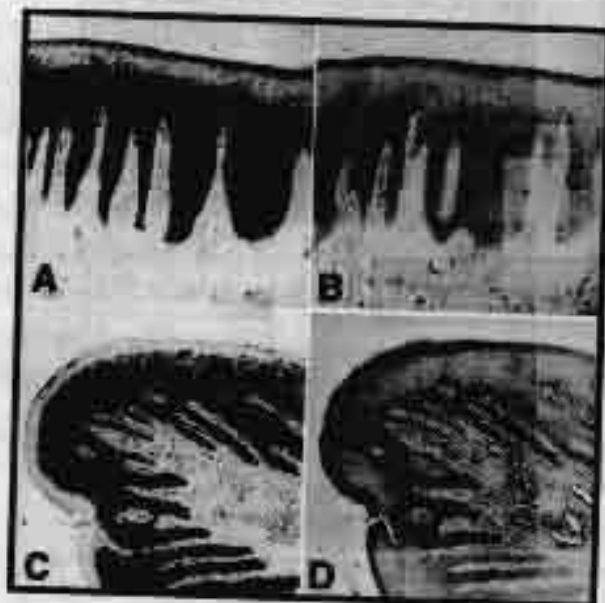
สามารถแบ่งเทคนิค Real-time PCR เป็นสองประเภทใหญ่ๆ คือประเภทแรกใช้ไซเบอร์กรีน ในการจับดีเอ็นเอสายคู่อย่างไม่เฉพาะเจาะจง จึงทำให้ปริมาณของสารพันธุกรรมที่วัดได้จะเป็นจำนวนของสารพันธุกรรมทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่างไม่เฉพาะแค่สารพันธุกรรมที่สนใจ ประเภทสองคือการสร้างไพรเมอร์ที่จับกับสายดีเอ็นเอเฉพาะที่สนใจนอกเหนือไปจากไพรเมอร์ที่ต้องใส่ในปฏิกิริยาอยู่แล้ว ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสารฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) (คือสารที่สามารถถูกกระตุ้นด้วยแสงและปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปแสงที่มีความยาวคลื่นต่างจากตอนที่ถูกกระตุ้น และสามารถวัดปริมาณแสงที่ถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงความยาวคลื่นนั้นๆ) สามารถแบ่งเทคนิค

ประเภทสองออกเป็นอีกสองชนิดตามหลักการในการสังเคราะห์ไฟบรคือ ชนิดที่ใช้หลักการของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) คือจะวัดปริมาณแสงที่ปลดปล่อยออกมาหลังจากที่มีการจับ (hybridization) ของไฟรบกับสายดีเอ็นเอ โดยที่เมื่อแสงไปกระตุ้นฟลูออโรฟอร์ที่ติดอยู่กับไฟรบตัวหนึ่งแล้วปล่อยพลังงานออกมาไปกระตุ้นฟลูออโรฟอร์ที่ติดอยู่กับไฟรบอีกตัวหนึ่ง การถ่ายเทพลังงานระหว่างฟลูออโรฟอร์สองชนิดจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อฟลูออโรฟอร์ทั้งสองชนิดนี้อยู่ใกล้กันในช่วงที่เกิดการจับกันของไฟรบกับสายดีเอ็นเอ และทำการวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent activity) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากฟลูออโรฟอร์ตัวที่สองซึ่งมีความยาวคลื่นที่มากขึ้นและอยู่ในช่วงแคบๆ ได้โดยตรง ชนิดที่สองคือใช้ไฟรบหนึ่งตัวที่ถูกติดฉลากด้วยทั้งฟลูออโรฟอร์และสารเคมีที่เรียกว่า ควีนเชอร์ (Quencher) ซึ่งโดยปกติจะไม่สามารถวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากฟลูออโรฟอร์ได้ เพราะควีนเชอร์ซึ่งรับพลังงานต่อจากฟลูออโรฟอร์จะไม่ปลดปล่อยพลังงานหรือแสงออกมาให้เครื่องวัดได้ แต่เมื่อเกิดการต่อสายใหม่หรือดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นในช่วงโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) จะทำให้ฟลูออโรฟอร์และควีนเชอร์ที่ติดกับตัวไฟรบหลุดออกมาเป็นอิสระ และทำให้สามารถวัดแสงหรือพลังงานที่ฟลูออโรฟอร์ดูดกลืนและปลดปล่อยออกมาโดยไม่มีควีนเชอร์เป็นตัวยับยั้ง มักนิยมเรียกไฟรบชนิดแรกว่าไฮบริดไลเซชันไฟรบ (hybridization probe) และไฟรบชนิดที่สองว่าไฮโดรไลซิสไฟรบ (hydrolysis probe) นอกจากประโยชน์ของ Real-time PCR ในการวัดปริมาณของสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นแล้ว Real-time PCR ที่ใช้หลักการของ FRET ยังมีประโยชน์ในการวิเคราะห์หาไวรัสที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของมนุษย์ได้อีก นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ต่างๆ ได้นำหลักการ Real-time PCR ไปสร้างเป็นชุดเครื่องมือตรวจหาปริมาณเชื้อโรคทั้งแบคทีเรียและไวรัสในตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ ที่เก็บได้จากผู้ป่วย

การวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อ (In vivo analysis of mRNA expression)

เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ได้แก่ *in situ* hybridization ซึ่งทำได้ในเนื้อเยื่อที่อยู่ในซีมีงพาราฟิน (paraffin) หรือที่ถูกแช่แข็ง (frozen section) นอกจากนี้สามารถเลือกใช้ไฟรบได้ทั้งชนิดเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอไฟรบ วิธีการติดฉลากไฟรบสามารถทำได้สองวิธีคือใช้สารรังสี เช่น ซัลเฟอร์-35 ฟอสฟอรัส-32 เป็นต้น หรือใช้สารเคมีที่เรียกว่าดิออกซีเจนิ (digoxigenin) ร่วมกับใช้

ปฏิกิริยาทางเคมีและสารตั้งต้นได้แก่ Nitroblue Tetrazolium (NBT) และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate (BCIP) ในการทำให้เกิดสีบนชิ้นเนื้อเยื่อ รูปที่ 2 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย *in situ* hybridization ด้วยไฟรบที่ติดฉลากด้วยดิออกซีเจนิ ข้ออธิบายขั้นตอนของเทคนิคนี้พอสังเขปดังนี้ หลังจากที่ได้เนื้อเยื่อบนสไลด์และทำการติดฉลากที่ไฟรบเรียบร้อยแล้ว ต้องดึงซีมีงออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffinization) ก่อนในการเนื้อที่ซีมีงพาราฟิน หลังจากนั้นย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนในเซลล์ด้วยเอ็นไซม์โปรตีเอส (protease) ทำให้ไฟรบสามารถเข้าไปจับกับอาร์เอ็นเอได้ดีขึ้น และต่อมาย่อยด้วยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) เพื่อทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เพื่อลดการแย่งจับกับไฟรบ นอกจากนี้ยังช่วยลดสีพื้น (background) อีกด้วย หลังจากนั้นใส่ไฟรบเพื่อเข้าไปจับ



รูปที่ 2 การวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค *in situ* hybridization ร่วมกับไฟรบที่ติดฉลากด้วยดิออกซีเจนิ (ขยาย 40 เท่า) ไฟรบที่ใช้ในรูป A และ C เป็นชนิดแอนติเซนส์ (antisense) ซึ่งสามารถจับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่สนใจได้ และให้ผลออกมาเป็นสีน้ำเงินเข้มสำหรับบริเวณที่มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ในขณะที่ไฟรบในรูป B และ D เป็นชนิดเซนส์ (sense) ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายจึงจะไม่จับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ จึงไม่เกิดสีที่เข้มเยื่อใย ดังนั้นจึงได้เป็นตัวอย่างควบคุมที่พึงประสงค์

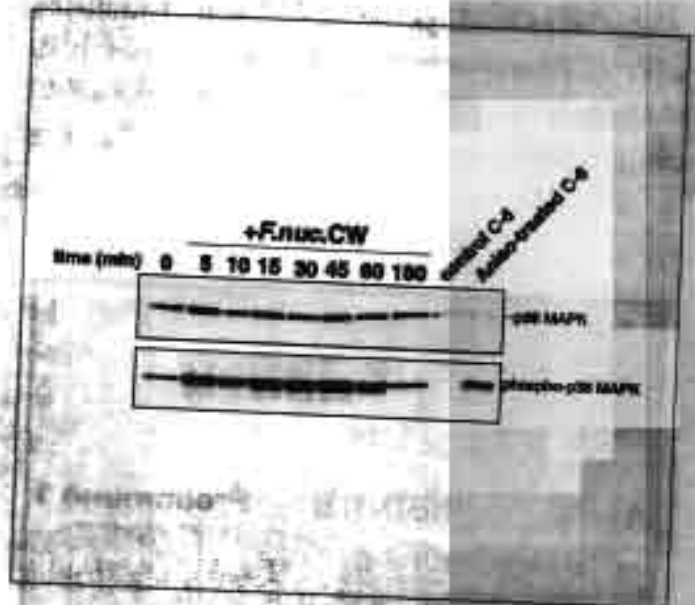
Fig. 2 Analysis of mRNA expression in vivo by *in situ* hybridization and digoxigenin-labeled probe (x40). An antisense probe, which is complementary to the mRNA of interest, is used in panel A and C, while a sense probe in panel B and D, which has sequence identical to mRNA, is a negative control.

กับอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อ โดยปฏิกิริยาการจับ (hybridization) เกิดขึ้นในอุณหภูมิคงที่ตลอดช่วงเวลาข้ามคืน วันถัดไปทำการล้างสไลด์ในสารละลายที่เหมาะสม และดำเนินการขั้นตอนของการตรวจหาตำแหน่งของอาร์เอ็นเอที่ถูกจับด้วยโพรบซึ่งจะขึ้นอยู่กับการใช้วิธีการติดฉลากโพรบ ข้อควรระวังสำหรับการทำ *in situ* hybridization และเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้วิเคราะห์อาร์เอ็นเอคืออาร์เอ็นเอเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรถูกทำลายได้ง่าย ดังนั้นสารเคมีตลอดจนเครื่องมือทุกชนิดต้องปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase)

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในหลอดทดลอง (*In vitro* analysis of protein expression)

เทคนิคที่ใช้คือ Western blot hybridization โดยใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโปรตีนที่สกัดมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยใช้สารเคมีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต [sodium dodecyl sulfate (SDS)] ในสารที่ใช้สกัด ทำให้โปรตีนของโปรตีนทุกๆ ชนิดเป็นประจุลบ นอกจากนี้ยังทำให้เชื้อหุ้มเซลล์แตกและแยกโปรตีนออกจากเซลล์ได้ โปรตีนที่มีประจุลบจะวิ่งเข้าหาขั้วบวกบนวุ้นโพลีอะครีลามายด์ (polyacrylamide gel) การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้ากระทำในแนวตั้ง (vertical electrophoresis) ซึ่งต่างจากการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอซึ่งกระทำทั้งในแนวตั้งและแนวนอน (horizontal electrophoresis) นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาในการทำให้วุ้นโพลีอะครีลามายด์แข็งตัวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมีโดยสารเคมีที่ผสมเข้าไปเกิดการเชื่อมขวางกัน (cross-links) ซึ่งแตกต่างจากวุ้นอะกาโรสที่ใช้อุณหภูมิโปรตีนจะถูกแยกไปบนวุ้นตามขนาดของโปรตีน โดยโปรตีนขนาดเล็กจะวิ่งได้เร็วและไกลกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ หลังจากนั้นจะทำการถ่ายโปรตีนจากวุ้นไปบนเมมเบรนซึ่งมักทำด้วยไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) การส่งถ่ายโปรตีนนี้ต้องอาศัยแรงจากกระแสไฟฟ้า (electroblotting) ซึ่งต่างจากการส่งถ่ายอาร์เอ็นเอที่ใช้แรงนำพาจากบัฟเฟอร์ (capillary transfer) เมื่อส่งถ่ายโปรตีนไปบนเมมเบรนแล้วจะมีการปิดกั้น (block) ตำแหน่งที่ไม่เฉพาะเจาะจงในการจับของแอนติบอดีด้วยนมผงพร่องมัน (non-fat dry milk) หรือสารเคมีชนิดอื่นๆ หลังจากนั้นใส่แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ซึ่งอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเข้าไปจับโปรตีนแอนติเจนเป้าหมาย ต่อจากนั้นใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่ต่อเชื่อมกับเอนไซม์ มักนิยมใช้เอนไซม์สองชนิดคืออัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และฮอราดิเพอร์ออกซิเดส

(horseradish peroxidase) เข้าไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิอีกครั้ง หลังจากนั้นจึงใช้วิธีตรวจสอบที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด โดยการเติมสารตั้งต้นเข้าไปเพื่อให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสีหรือแถบของโปรตีนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือบางครั้งสารตั้งต้นที่ใส่เข้าไปก่อให้เกิดแสงที่เปล่งออกมาซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่าเคมีลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence) ดังนั้นจึงสามารถใช้ฟิล์มเอกซเรย์เข้าไปรับแสงที่เปล่งออกมาเพื่อบันทึกลักษณะของแถบโปรตีน รูปที่ 3 แสดงผลที่ได้จากเทคนิค western blot



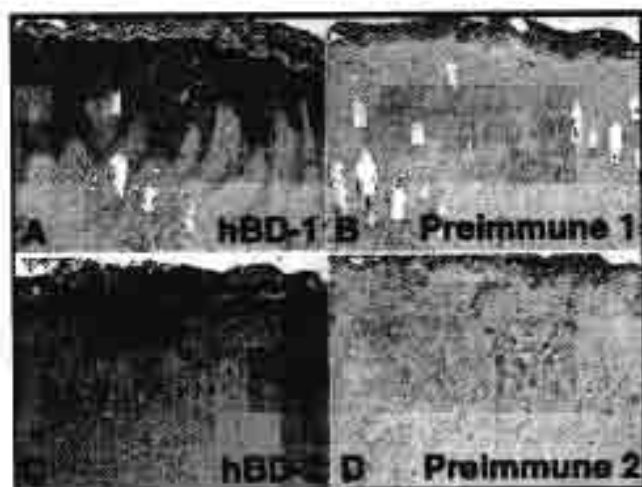
รูปที่ 3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในหลอดทดลอง โดยเทคนิค Western blot hybridization สังเกตความจำเพาะของแอนติบอดีปฐมภูมิในการจับโปรตีนตัวเดียวกันแต่อยู่ในสถานะ คือ ตัวหนึ่งถูกเติมกลุ่มฟอสเฟต (phospho-p38 MAPK) ในขณะที่อีกตัวไม่ถูกเติม (p38 MAPK) ทำให้เห็นที่แตกต่างกันคือกลุ่มตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังของเซลล์พืชที่เกี่ยวข้องกับโรคปอดอักเสบที่มีชื่อว่า *Fusobacterium nucleatum* (+FusC.W) ณ เวลาต่าง ๆ กัน ทำให้ระดับการแสดงออกของ phospho-p38 MAPK เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุม (เพียง 0 นาที) ในขณะที่ระดับของ p38 MAPK ไม่มีการเปลี่ยนแปลง รูปนี้นำมาจาก Krisanaprakornkit และคณะ⁴ โดยได้รับการอนุญาตตีพิมพ์จากสมาคมภูมิคุ้มกันวิทยาประเทศสหรัฐอเมริกา

Fig. 3 Analysis of protein expression *in vitro* by Western blot hybridization. Note the specificity of primary antibody to recognize the same protein, i.e. p38, but in different states, i.e. phosphorylation (phospho-p38 MAPK) and non-phosphorylation (p38 MAPK). This accounts for different results. This figure is reproduced with permission from Krisanaprakornkit et al., 2002⁴ (Copyright © 2002 by the American Association of Immunologists, Inc.).

hybridization ร่วมกับ enhanced chemiluminescence หรือ ECL นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการพัฒนาให้แสงที่เปล่งออกมาเป็นแสงฟลูออเรสเซนต์ซึ่งทำให้ความไวในการตรวจหาโปรตีนสูงมากกว่าเทคนิค ECL ประมาณ 4-20 เท่า และสามารถวัดระดับปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในตัวอย่างได้แม่นยำมากขึ้น

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ (*In vivo* analysis of protein expression)

เทคนิคที่ใช้เรียกว่า immunohistochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แอนติบอดีปฐมภูมิเข้าไปจับกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อเชื่อมกับเอ็นไซม์เข้าไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิอีกทีหนึ่ง หลังจากนั้นใส่สารตั้งต้นเข้าไปเพื่อให้เอ็นไซม์ทำปฏิกิริยาจนทำให้เกิดสีและมองเห็นได้ด้วย



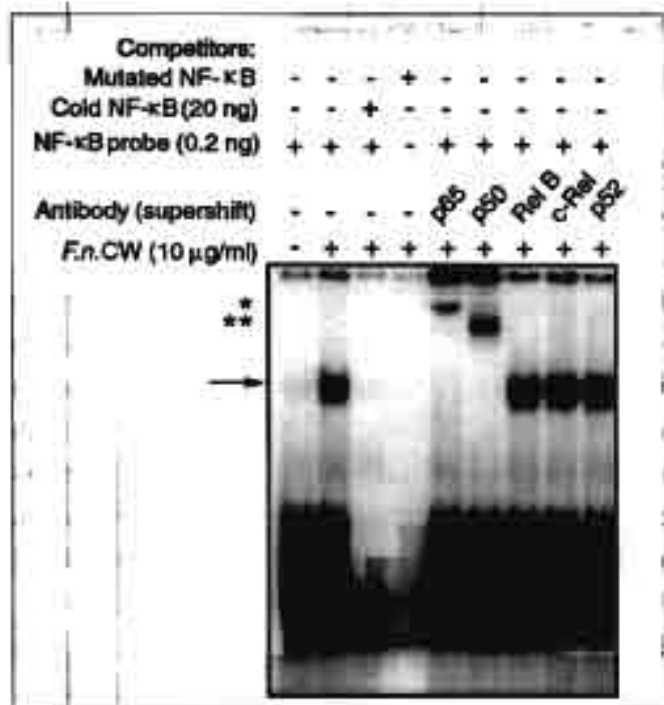
รูปที่ 4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry สังเกตสีน้ำตาลที่เยื่อเมือกช่องปากซึ่งเย็บด้วยการใช้แอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีน hBD-1 (A) และ hBD-2 (C) ภาพในรูป B และ D แสดงถึงตัวควบคุมที่ให้ผลลบคือไม่ติดสีน้ำตาล ด้วยการให้ซีรัมของกระต่ายก่อนที่จะฉีดแอนติเจนเข้าไป แทนการใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ เรียกว่า preimmune serum ต่อ hBD-1 (preimmune 1, B) และต่อ hBD-2 (preimmune 2, D) (ขยาย 100 เท่า)

Fig. 4 Analysis of protein expression in vivo by immunohistochemistry. Note the brown staining in epithelial cells with the use of primary antibodies against hBD-1 (A) and hBD-2 (C). Panel B (preimmune 1) and D (preimmune 2) represent a negative control for A and C, respectively (x100).

กล้องจุลทรรศน์ เทคนิคนี้ทำให้บอกตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ (รูปที่ 4 แสดงถึงผลที่ได้จากเทคนิค immunohistochemistry) นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อเชื่อมกับสารฟลูออโรฟอร์ (แทนเอ็นไซม์) ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงแล้วจะเปล่งพลังงานออกมาเป็นแสงสีต่างๆ โดยสามารถเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope)

หลักการสำคัญในการตรวจหาโปรตีนไม่ว่าในหลอดทดลองหรือในเนื้อเยื่อคือต้องมีแอนติบอดีปฐมภูมิที่จับกับแอนติเจนเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง และต้องจับได้กับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) เนื่องจากขั้นตอนในการสกัดโปรตีนจากเซลล์ในหลอดทดลองหรือขั้นตอนการคงสภาพ (fixation) ของเนื้อเยื่อต้องใช้สารเคมีซึ่งทำให้โปรตีนเสียสภาพไป แบ่งชนิดของแอนติบอดีปฐมภูมิได้เป็นสองประเภทคือโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) สร้างมาจากอิมมูโนโบลัสต์เซลล์ (hybridoma cells) ของหนู ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิที่จับจะเป็นชนิดที่จับกับโปรตีนของหนู (anti-mouse secondary antibody) แอนติบอดีปฐมภูมิอีกประเภทคือโพลีโคลนัลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งมักสร้างมาจากการฉีดแอนติเจนเข้าไปในกระต่ายและเก็บซีรัมของกระต่ายมาเพื่อสกัดเอาแอนติบอดี ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิที่จับจะเป็นชนิดที่จับกับโปรตีนของกระต่าย (anti-rabbit secondary antibody) หลังจากที่ได้แอนติบอดีปฐมภูมิทั้งสองประเภทจะต้องมีการตรวจสอบชนิดของแอนติบอดีและทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงและความสามารถในการจับกับโปรตีนแอนติเจนเสียก่อน ซึ่งเทคนิคที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็น western และ dot blot hybridization การที่จะใช้แอนติบอดีชนิดไหนก็ขึ้นอยู่กับว่าสามารถหาแอนติบอดีได้ในท้องตลาดหรือไม่ ถ้าไม่สามารถหาซื้อได้ก็ต้องมีการสร้างขึ้นมาใช้เอง การสร้างโพลีโคลนัลแอนติบอดีจะง่ายและรวดเร็วกว่าการสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดี แต่ความเฉพาะเจาะจงต่อแอนติเจนจะน้อยกว่า ดังนั้นสิ่งสำคัญในการทดลองแต่ละครั้งคือต้องมีตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) รวมอยู่ด้วยเสมอซึ่งเห็นได้จากการใช้ซีรัมของกระต่ายแทนแอนติบอดีปฐมภูมิ (รูปที่ 4 B และ D)

นอกจากเทคนิค immunohistochemistry แล้ว ยังมีเทคนิคที่เรียกว่า immunocytochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ตรวจหาการแสดงออกและบ่งบอกตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ (ไม่ใช่ในเนื้อเยื่อ) ซึ่งหลักการโดยทั่วๆ ไปของเทคนิคนี้คล้ายกับ immunohistochemistry คือ



รูปที่ 6 การวิเคราะห์หน้าที่ของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โดยเทคนิค EMSA (4 เลน ทางด้านซ้าย) และ gel supershift assay (5 เลนทางด้านขวา) รูปนี้ นำมาจาก Krisanaprakornkit และคณะ* โดยได้ตีพิมพ์การอนุญาตตีพิมพ์จากสมาคมภูมิคุ้มกันวิทยาประเทศสหรัฐอเมริกา —→ แสดงถึงดีเอ็นเอโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่เกิดจากการจับกันของทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับสายดีเอ็นเอ (หรือโปรเบ) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ตัวนั้น และสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดขาดด้วยสารรังสีจึงทำให้สามารถตรวจหาได้ * , ** แสดงถึงคอมเพล็กซ์ที่วิ่งช้าลงเมื่อเติมแอนติบอดีต่อทรานสคริปชันแฟกเตอร์แต่ละตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอมเพล็กซ์ดังกล่าวถูกสร้างโดยโปรตีนจำเพาะกับโปรเบที่จับกับตำแหน่งดังกล่าว เนื่องจากแอนติบอดีต่อทรานสคริปชันแฟกเตอร์ p38 และ p50 ที่เข้ามาจับเพิ่มเติมทำให้คอมเพล็กซ์มีขนาดใหญ่ขึ้นและวิ่งช้าลง สังเกตแถบตำแหน่งบนของโปรบ์บริเวณส่วนเกินซึ่งไม่ได้จับกับโปรตีน

Fig. 6 Functional assays of transcription factor by EMSA (four left lanes) and gel supershift assay (five right lanes). This figure is reproduced with permission from Krisanaprakornkit et al., 2002² (Copyright ©2002 by the American Association of Immunologists, Inc.). —→ indicates DNA-protein complex; *, ** indicates retarded complexes due to added antibody against each transcription factor.

แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วยสิ่งกระตุ้นต่างๆ ทำให้ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทำงานโดยเข้าไปจับกับลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเอ็นไซม์ การวิเคราะห์การทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทำได้โดยวัดการทำงานของ (activity) ของเอ็นไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่ใส่เข้าไป นอกจากนี้ยังสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutate) หรือทำให้หายไป (delete) ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่งใด มีความสำคัญต่อขบวนการทรานสคริปชันของยีนที่สนใจ

การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ (Applications in dental research)

สามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนทุกชนิดที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสร้างอวัยวะภายในช่องปาก หรือที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคในช่องปาก ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน ตัวอย่างเช่น การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อในช่องปากต่อการกระตุ้นด้วยจุลชีพ สารพิษจากทันตวัสดุ หรือสิ่งกระตุ้นอื่นๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยอาจศึกษาเอ็นไซม์สร้างไซโตไคน์ (cytokines) ยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอะพอโทซิส (apoptosis) ของเซลล์ เป็นต้น นอกจากการทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยงแล้ว บางเทคนิคช่วยให้นักวิจัยตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนในรอยโรค ผู้เขียนขอยกตัวอย่างโครงการวิจัยของตนเองที่กำลังดำเนินการอยู่คือการศึกษากการแสดงออกของแอนติโมโครเบียลเปปไทด์แบบตัว-ดีเฟนซิน (hBD-1 และ hBD-2) ในรอยโรคโรคเหงือกพลาแนลในช่องปากและรอยโรคที่ติดเชื้อมา (รูปที่ 4) นอกจากนี้ดังที่ได้กล่าวข้างต้นว่าเทคนิค Real-time PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้หาปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลุ่มอาการโรค (syndrome) ที่พบความผิดปกติในบริเวณโพรงจมูกและศีรษะ หรือการนำเทคนิคนี้มาหาปริมาณของจุลชีพที่สนใจในน้ำลายหรือของเหลวในร่องเหงือก (gingival crevicular fluid) ส่วนเทคนิคที่วิเคราะห์หน้าที่ของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ร่วมกับ Western blot technique (รูปที่ 3 แสดงถึงการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งเป็นเส้นทางส่งสัญญาณ (signaling pathway) เส้นทางหนึ่งด้วยจุลชีพ) มีประโยชน์ในการศึกษาเส้นทางส่งสัญญาณ และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สนใจ ยีนจะนำไปสู่วิธีการควบคุมให้ยีนที่สนใจนั้นแสดงออกมากขึ้นหรือลดน้อยลงตามที่ต้องการ

ประการคือ ทรานสเฟกชันชนิดเสถียร (stable transfection) ซึ่งดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปจะไปรวมกับโครโมโซมของเซลล์ โดยมักนิยมใช้ไวรัสเป็นพาหะ (vector) ในการนำดีเอ็นเอเข้าไปและรวมกับโครโมโซมของเซลล์หลังจากที่ดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์

บทสรุป

ผู้เขียนได้พยายามรวบรวมเทคนิคต่างๆ ทางอณูชีววิทยา โดยได้แบ่งออกเป็นหัวข้อตามลักษณะการใช้ในงานวิจัย แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังมีเทคนิคอื่นๆ อีกมาก อาทิ การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA isolation) การโคลนนิ่ง (cloning) การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (DNA ligation) การหาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวนมากๆ ในหนึ่งครั้ง (High throughput techniques) เป็นต้น ที่ผู้เขียนไม่ได้กล่าวไว้ในบทความนี้เนื่องจากความจำกัดของเนื้อที่ จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาขึ้นอย่างมากในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา ตั้งแต่ที่ Francis H.C. Crick และ James D. Watson ค้นพบโครงสร้างเส้นแกสสิวคู่ (double helix) ของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ในปัจจุบันเทคนิคเหล่านี้ถูกใช้เป็นเครื่องมือในการทดลองวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะในสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้มีส่วนอย่างมากในการผลักดันให้เกิดการสร้างองค์ความรู้ใหม่ๆ ซึ่งรวมไปถึงองค์ความรู้ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับสาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่บุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์และทันตแพทย์ทั่วไปจะต้องตระหนักถึงความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อพัฒนาตนเองให้

ทันสมัยกับความก้าวหน้าทางวิทยาการที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนการตีพิมพ์บทความนี้ ขอขอบคุณ Professor Beverly A. Dale-Crunk (อาจารย์ที่ปรึกษา) และ Mrs. Janet R. Kimball ที่สนับสนุนข้าพเจ้ามาโดยตลอดและสอนเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ให้กับข้าพเจ้าเมื่อครั้งที่ทำการศึกษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยยอชิงตัน เมืองซีแอตเติล ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารอ้างอิง

1. Wu W, Welsh MJ, Kaulman PB, Zhang HH. Methods in Gene Biotechnology. New York: CRC Press; 1997. p. 225-258.
2. Krisanaprakomkit S, Kimball JR, Dale BA. Regulation of human β -defensin-2 by *Fusobacterium nucleatum* in gingival epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not NF- κ B pathway. *J Immunol* 2002;168: 318-24.

Review Article

Techniques in Molecular Biology for Dental Research

Suttichai Krisanaprakornkit*

Abstract

The central dogma of Molecular Biology is transcription and translation. Transcription is a process of RNA synthesis from DNA, whereas translation is a process of protein synthesis. Nowadays, knowledge and various techniques in Molecular Biology have increasingly become a useful tool for scientific experiments to understand molecular mechanisms of cell and organ development and disease pathogenesis. Conducting scientific research in Dentistry, which is part of Health Sciences, unavoidably requires basic and advanced techniques in Molecular Biology to implement the goals of research project. In this review article, these techniques are categorized according to their purposes, i.e. study of mRNA versus protein expression or *in vitro* versus *in vivo*. It is demanded for dental faculties and dentists to understand the basic principles of these techniques in which they can apply for their own research.

Key words : Immunocytochemistry; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization; Molecular Biology; Northern blot hybridization; Western blot hybridization



พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของโรคไลเคนพลาเนียส **Molecular Pathogenesis of Lichen Planus**

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

สำเนาพิมพ์ จาก เชียงใหม่ทันตแพทยสาร
ปีที่ 24 ฉบับที่ 1-2 มกราคม-ธันวาคม 2546

Reprinted from CHIANG MAI DENTAL JOURNAL
vol. 24 No. 1-2 January-December 2003

พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของโรคไลเคนพลาเนียส Molecular Pathogenesis of Lichen Planus

สุทธิชัย ฤกษ์ณะประกรกิจ
ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Suttichai Krisanaprakomkit
Department of Odontology & Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม.ทันตศัลย 2546; 24(1-2)
CM Dent J 2003; 24(1-2)

บทคัดย่อ

ไลเคนพลาเนียสเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังบริเวณเยื่อ مخاطและผิวหนังซึ่งไม่ทราบสาเหตุ และยังไม่มีทราบถึงพยาธิกำเนิดของไลเคนพลาเนียสในระดับโมเลกุลที่แน่ชัด สองสมมติฐานซึ่งได้แก่ กลไกที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงกับที่ไม่เฉพาะเจาะจงได้ถูกเสนอเพื่อที่จะอธิบายผลการทดลองจำนวนมากซึ่งถูกรายงานไว้ตั้งแต่ทศวรรษที่แล้ว กลไกที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงได้แก่กระบวนการนำเสนอแอนติเจนและการทำลายเซลล์เคอราตินocytes โดยซีดีแปด ที-ลิมโฟไซต์ที่เป็นพิษ ในขณะที่กลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงเกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยสารจากแกรนูลของแมสต์เซลล์และการกระตุ้นการทำงานของแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส ผลสุดท้ายของทั้งสองกลไกนี้เห็นได้จากลักษณะทางจุลพยาธิที่พบในไลเคนพลาเนียส ซึ่งประกอบด้วย การสะสมของที-ลิมโฟไซต์ การทำลายเซลล์เมทามาโทซิส และการตายของเซลล์ในชั้นเบซัล (หรือการตายของเซลล์เคอราตินocytes แบบอะพอพโตซิส) นอกจากนี้หลักฐานหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์เคอราตินocytes แบบอะพอพโตซิส ได้แก่ การกระตุ้นเอนไซม์แคสเปส-3 และการตัดโพลี (เอดีพี-ไรโบส) โพลีเมอเรส ได้ถูกเสนอไว้ในบทความปริทัศน์นี้ แต่อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อทำให้เข้าใจถึงสาเหตุและพยาธิกำเนิดของไลเคนพลาเนียสอย่างถ่องแท้

Abstract

Lichen planus is a chronic mucocutaneous inflammatory disorder of unknown etiology. The pathogenesis of lichen planus at the molecular level has not yet been known. Two hypotheses, i.e. antigen-specific versus non-specific mechanisms, are proposed in order to explain a number of experimental results that have been reported since the last decade. Antigen-specific mechanisms include antigen presentation and antigen-specific killing by CD8 cytotoxic T-lymphocytes, while non-specific mechanisms involve mast cell degranulation and matrix metalloproteinase activation. The final consequences of these two mechanisms are apparent from the histological findings of lichen planus, which include accumulation of T-lymphocytes, basement membrane disruption, and basal cell degeneration (or keratinocyte apoptosis). In addition, several lines of evidence regarding keratinocyte apoptosis in oral lichen planus, i.e. activation of caspase-3 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase, have been presented in this review article. However, additional studies are still required for a thorough understanding of the etiology and pathogenesis of lichen planus.

Key Words : lichen planus, pathogenesis, apoptosis

คำไขว่ : ไลเคนพลาเนียส พยาธิกำเนิด อะพอพโตซิส

บทนำ

โรคไลเคนพลาเนียสในช่องปาก (oral lichen planus) เป็นโรคที่เกิดจากขบวนการอักเสบอย่างเรื้อรังที่มีผิวเยื่อเมือกโดยอาศัยเซลล์ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) เป็นสื่อ โดยพบจำนวนเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) พลาสมาเซลล์ (plasma cell) อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) และคอมพลีเมนต์ (complement) ในรอยโรคเล็กน้อยเท่านั้น⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงในซีรัม (serum) ของผู้ป่วย ไลเคนพลาเนียสมีลักษณะทางคลินิกหลายลักษณะ (ดูรายละเอียดบทความปริทัศน์เรื่องโรคไลเคนพลาเนียสในช่องปาก : ลักษณะทางคลินิกและการรักษา) โรคนี้พบได้บ่อยที่สุดในช่องปากที่งูขึ้นกับลิ้น และเหงือก พบโรคนี้ได้ประมาณร้อยละ 1-2 ของประชากรผู้ใหญ่ที่อายุมากกว่า 40 ปี ถึงแม้ว่าพบได้ในเด็กหรือวัยรุ่นบ้าง⁽²⁾ นอกจากนี้ยังเป็นโรคเยื่อเมือกช่องปากและไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในคลินิกเวชศาสตร์ช่องปาก (Oral Medicine Clinic) พบว่าผู้หญิงเป็นโรคนี้นานกว่าผู้ชาย 1.4 เท่า⁽³⁾ โดยปกติพบโรคไลเคนพลาเนียสทั้งสองข้าง และพบรอยโรคชนิดฝ่อลีบ (atrophic) หรือแผลถลอก (erosive) ได้บ่อยซึ่งทำให้ผู้ป่วยรู้สึกปวดแสบปวดร้อนและมาพบทันตแพทย์ ในบางครั้งพบรอยโรคบนผิวหนังบริเวณข้อมือ ข้อเท้า และอวัยวะเพศ ร่วมกับรอยโรคในช่องปาก ลักษณะที่พบจะเป็นตุ่มนูนแบบๆ (papules) บางครั้งพบรอยโรคที่เจ็บจนทำให้เสียน้ำลาย หรือที่หนังศีรษะจนทำให้ผมร่วงและเกิดแผลเป็น แต่สิ่งที่น่าสนใจคือไม่พบว่ารอยโรคที่เยื่อเมือกขาดอาหาร และกลืนเสียง⁽⁴⁾

ลักษณะทางจุลวิทยาของโรคไลเคนพลาเนียส (Histological features of lichen planus)

รูปที่ 1A แสดงถึงความหนาของชั้นเยื่อเมือกไมโครพลาเนียสด้วยการย้อมเคอราตินซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเซลล์เคอราติโนไซต์ พบเซลล์ที-ลิมโฟไซต์จำนวนมากอยู่ใต้เยื่อเมือก (lymphocytic band) (รูปที่ 2A) และในเยื่อเมือก (intra-epithelial T-lymphocyte) (รูปที่ 1B) พบมีการทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte) ในชั้นเบซัล (basal layer) และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า คอลลอยด์ บอดี้ [colloid (civatte, hyaline, cytoid) bodies] ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมติดสีชมพู นอกจากนี้พบ



รูปที่ 1 การปรากฏของที-ลิมโฟไซต์ในชั้นเยื่อเมือกของโรคไลเคนพลาเนียส (A) ชิ้นเนื้อโรคไลเคนพลาเนียสถูกย้อมด้วยโมโนโคลนัล แอนติบอดี ต่อเคอราตินชนิดที่เป็นตัว (AE3) เพื่อแสดงขอบเขตของชั้นเยื่อเมือกในชิ้นเนื้อ เส้นที่มีลูกศรทั้งสองปลายแสดงถึงความหนาของชั้นเยื่อเมือก (B) ชิ้นเนื้อเดียวกันที่ถูกย้อมด้วยโมโนโคลนัล แอนติบอดี ต่อที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นการทำงาน (CD45RO) หัวลูกศร แสดงให้เห็นถึงที-ลิมโฟไซต์ที่อยู่ในชั้นเยื่อเมือกขยายจากขนาดครึ่งต้น 10 เท่า

Figure 1 The presence of intra-epithelial T-lymphocytes in lichen planus. (A) Lichen planus biopsies were stained with monoclonal antibody against basic keratins (AE3) to indicate the area of epithelium in the section. A line with double arrowheads indicates the epithelial thickness. (B) The same specimen was stained with monoclonal antibody against activated T-lymphocytes (CD45RO). Arrowheads indicate intra-epithelial T-lymphocytes. Original magnification 10X.

การทำลายเบสเมมเบรน (basement membrane)⁽⁵⁾ ทำให้ขาดและไม่ต่อเนื่อง (รูปที่ 2B) มีการทำลายโครงสร้างเฮมิเดสโมโซม (hemidesmosome) และเส้นใยต่างๆ ที่ยึดชั้นเยื่อเมือกกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจนทำให้เยื่อเมือกหลุดออกมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพบว่ามีการสะสมของไฟบริน (fibrin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) จำนวนมากแทนโมเลกุลที่พบในสภาวะปกติของเบสเมมเบรน เช่น ลามินิน (laminin) เป็นต้น⁽⁶⁾ บางครั้งอาจพบตุ่มน้ำเกิดขึ้นในบริเวณรอยโรค (bullous lichen planus) และยังพบว่าชั้นเยื่อเมือกหนาตัวขึ้น (acanthosis) วิธีการตรวจด้วยอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescent) ไม่ได้เป็นวิธีการให้การวินิจฉัยโรคไลเคนพลาเนียส⁽⁷⁾ เนื่องจากไม่พบการสะสมของอิมมูโนโกลบูลินและคอมพลีเมนต์ในรอยโรคทุกครั้ง ซึ่งไม่เหมือนกับเพมฟิกัส วุลกาวิส (pemphigus vulgaris) หรือบูลลัส เพมฟิกอยด์ (bullous pemphigoid) สาเหตุของโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่มีผู้เสนอสมมติฐาน⁽⁸⁾ ของการเกิดโรคไว้ 2 แนวทางคือ



รูปที่ 2 การไม่ปรากฏพบเบสเมมเบรนในไลเคนพลาเนียส (A) ลักษณะทางจุลวิทยาของไลเคนพลาเนียส ย้อมด้วยเมทิลเลนดีโอ เส้นที่มีลูกศรทั้งสองปลายแสดงถึงความหนาของชั้นเยื่อเมือก (B) ชิ้นเนื้อเดียวกันที่ถูกย้อมด้วยโพลีโคลนัล แอนติบอดีต่อลามินิน สังเกตว่าไม่พบการติดสีที่เบสเมมเบรนซึ่งอยู่ตรงรอยต่อของชั้นเยื่อเมือกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่พบการติดสีรอบๆ เส้นเลือดในรอยโรค ซึ่งยังคงมีชั้นเบสเมมเบรนอยู่ (หัวลูกศร) ขยายจากขนาดดั้งเดิม 10 เท่า

Figure 2 The absence of basement membrane in lichen planus. (A) Histological features of lichen planus stained with H&E. A line with double arrowheads indicates the epithelial thickness. (B) The same specimen was stained with polyclonal antibody against laminin. Note the absence of staining at basement membrane lying between epithelium and connective tissue, but the presence of staining around blood vessels, which still have intact basement membrane (arrowheads). Original magnification 10X.

1. เป็นโรคที่เกิดจากแอนติเจน (antigen) ที่เฉพาะเจาะจงในการกระตุ้นที-ลิมโฟไซต์
2. กลไกการเกิดโรคไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน

สมมติฐานที่ 1 เกี่ยวข้องกับความเฉพาะเจาะจงของแอนติเจน

ซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์ (CD8 T-lymphocyte)

ชนิดของที-ลิมโฟไซต์ที่พบส่วนใหญ่ในชั้นเยื่อเมือกได้แก่ ชั้นเยื่อเมือก และบริเวณที่มีการทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์ในชั้นเบซัลคือ ซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์ ดังนั้นซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์ มีรายงานการศึกษา⁽⁴⁾ พบว่าที-ลิมโฟไซต์ที่สกัดได้จากไลเคนพลาเนียสเป็นพิษ (cytotoxic) ต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ได้จากรอยโรคเองมากกว่าที-ลิมโฟไซต์ที่สกัดจากตำแหน่งปกติในผู้ป่วยรายเดียวกัน ส่วนที-ลิมโฟไซต์ที่ไม่เป็นพิษจะเป็นชนิดซิติแนปต์ (CD4) นอกจากนี้เมื่อทำการ

ยับยั้งโมเลกุลเอ็มเอชซี คลาสวัน (MHC class I) โดยการเติมแอนติบอดี (antibody) เข้าไปก็ไม่ได้ จะทำให้ความเป็นพิษของซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์ถูกยับยั้ง⁽⁵⁾ จึงเป็นไปได้ว่าซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์อาจจะรับรู้แอนติเจนที่ถูกเสนอโดยเซลล์เคอราติโนไซต์บริเวณรอยโรคโดยผ่านทางโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวันบนเซลล์เคอราติโนไซต์ หลังจากที่มีการรับรู้แอนติเจนแล้ว ซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์จะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ นอกจากนี้ซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์ และเซลล์เคอราติโนไซต์อาจจะปล่อยคีโมไคน (chemokine) ซึ่งจะช่วยชักนำลิมโฟไซต์และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ เข้ามาที่บริเวณรอยโรคนั้น^(6,10)

ความเกี่ยวข้องระหว่างซิติแนปต์ที-ลิมโฟไซต์และเซลล์เคอราติโนไซต์

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์ในการทำหน้าที่เสนอแอนติเจน⁽¹¹⁾ ทำให้เกิดการกระตุ้นซิติแนปต์ที-ลิมโฟไซต์ ซึ่งเข้ามาในรอยโรค เพราะว่าเซลล์เหล่านี้เข้ามาตรวจตราในเยื่อเมือกเป็นประจำอยู่แล้ว (routine surveillance) ซึ่งจะพบกับเซลล์เคอราติโนไซต์ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยบังเอิญ (chance encounter hypothesis) หรือเป็นไปได้ว่าซิติแนปต์ถูกชักนำเข้ามาในรอยโรคโดยคีโมไคนที่สร้างจากเซลล์เคอราติโนไซต์ที่เปลี่ยนแปลง (directed migration hypothesis) โดยมีผลการศึกษาที่สนับสนุนสมมติฐานทั้งสองนี้ เช่น พบซิติแนปต์ที-ลิมโฟไซต์ในเยื่อเมือกปกติได้บ้าง⁽¹²⁾ ส่วนอีกสมมติฐานหนึ่งถูกสนับสนุนโดยการพบตัวรับสัญญาณ (receptor) ต่อคีโมไคนที่สร้างจากเซลล์เคอราติโนไซต์บนที-ลิมโฟไซต์⁽¹³⁾ โดยสรุปเหตุการณ์เริ่มต้นของการเกิดไลเคนพลาเนียสอาจจะเกิดจากเซลล์เคอราติโนไซต์เสนอแอนติเจนทางโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวัน ในตำแหน่งที่จะเป็นรอยโรคในอนาคต โดยอาจจะมีการกระตุ้นการสร้างคีโมไคนจากเซลล์เคอราติโนไซต์หรือไม่ก็ได้ หลังจากนั้นซิติแนปต์ ที-ลิมโฟไซต์จะเข้ามาสู่รอยโรคโดยเข้ามาตรวจตราเป็นประจำหรือถูกชักนำเข้ามาโดยคีโมไคน และจะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ในชั้นเบซัล การสะสมของที-ลิมโฟไซต์ได้ขึ้นเยื่อเมือกและการทำลายเบสเมมเบรน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงหลังอาจจะเป็นผลที่ตามมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์เคอราติโนไซต์ที่เสนอแอนติเจนเฉพาะและที-ลิมโฟไซต์

ชนิดและตำแหน่งของแอนติเจนเฉพาะที่ทำให้เกิดโรคเอนพลาณัส

ไม่มีใครทราบชนิดของแอนติเจนเฉพาะ ถึงแม้แอนติเจนนี้จะเปปไทด์ (peptide) ในเซลล์เคราติโนไซต์เอง ถ้าเป็นเช่นนั้นจึงโรคเอนพลาณัสก็จะจัดเป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตัวเอง (autoimmune disease) โดยมีข้อมูลสนับสนุนจากโรคนี้เป็นโรคเรื้อรัง เกิดขึ้นในผู้ใหญ่ พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย เกี่ยวข้องกับโรคภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตัวเองอื่นๆ พบโคลน (clone) ของที-ลิมโฟไซต์ที่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อตัวเองในรอยโรคนี้ สรุปได้ว่าเหตุการณ์เริ่มแรกของโรคนี้อาจจะเกิดขึ้นจากการนำเสนอแอนติเจนโดยเซลล์เคราติโนไซต์จากการกระตุ้นของยา การสัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (allergen) ในวัสดุอุดหรือยาสีฟัน ยันตรายจากการกระแทก การติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส หรือสารอื่นๆ ที่ยังไม่ทราบชนิด ต่อมา ซิตีแปด ที-ลิมโฟไซต์จะรับรู้แอนติเจนโดยผ่านทางโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาส II ที่อยู่บนเซลล์เคราติโนไซต์ในบริเวณรอยโรคและกระตุ้นทำให้เซลล์เคราติโนไซต์ตาย

ฮีตช็อกโปรตีน (Heat-shock proteins)

การแสดงออกของฮีตช็อกโปรตีนในโรคเอนพลาณัส^(14,15) อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเนื่องจากกระบวนการอักเสบที่มีอยู่แล้วในรอยโรค หรือการกระตุ้นการแสดงออกของฮีตช็อกโปรตีนโดยเซลล์เคราติโนไซต์อาจจะเป็นเส้นทางร่วมที่เชื่อมต่อกันระหว่างสารเคมีภายนอกที่ได้กล่าวแล้ว เช่น ยา สารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ การติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส ที่มากระตุ้นเซลล์ทำให้เกิดโรค จึงอาจเป็นไปได้ว่า ฮีตช็อกโปรตีนที่สร้างมากขึ้นจากเซลล์เคราติโนไซต์จะกระตุ้นให้เซลล์ที-ลิมโฟไซต์ทำลายเซลล์เคราติโนไซต์ในรอยโรค นอกจากฮีตช็อกโปรตีนที่ถูกสร้างมากขึ้น เปปไทด์ขนาดเล็กๆ ชื่อว่าเบต้า-ดีเฟนซิน (β-defensins) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคและเกี่ยวข้องกับการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) และกระบวนการอักเสบ (inflammatory response) ก็ถูกสร้างมากขึ้นในโรคเอนพลาณัสเช่นเดียวกัน⁽¹⁶⁾ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเบต้า-ดีเฟนซินอาจมีส่วนร่วมในพยาธิกำเนิดของโรคเอนพลาณัส

กลไกในการทำลายเซลล์เคราติโนไซต์

ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่ซิตีแปดที-ลิมโฟไซต์

กระตุ้นการตายของเซลล์เคราติโนไซต์ แต่กลไกที่เป็นไปได้ประกอบด้วย 1. ที-ลิมโฟไซต์หลั่งทูเนอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor-α; TNF-α) และไปจับกับตัวรับสัญญาณของ TNF-α (TNFR1) บนผิวเซลล์เคราติโนไซต์ 2. ฟาส ลิกานด์ (Fas Ligand) บนผิวเซลล์ที-ลิมโฟไซต์จับกับ ฟาส (Fas) บนผิวเซลล์เคราติโนไซต์ หรือ 3. ที-ลิมโฟไซต์หลั่งเอ็นไซม์แกรนซายม์บี (granzyme B) และเข้าไปในเซลล์เคราติโนไซต์ทางรูเปิดบนผิวเซลล์ หลังจากนั้นจะกระตุ้นเอ็นไซม์แคสเปส (caspase) ที่มีหลายชนิดและทำงานต่อเนื่องกัน (cascade) ในเซลล์เคราติโนไซต์ทำให้เกิดการตายแบบที่เรียกว่า อะพอพโตซิส (apoptosis) มีรายงานการทดลองที่ยืนยันกลไกอันแรก^(17,18) คือพบ TNF-α สูงขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยโรคเอนพลาณัส และ ที-ลิมโฟไซต์ที่สกัดจากรอยโรคสร้างอาร์เอ็นเอเข้ารหัส (messenger RNA) ของ TNF-α และหลั่ง TNF-α ออกมา นอกจากนี้ยังพบว่า TNF-α แสดงออกในที-ลิมโฟไซต์ได้ขึ้นเยื่อผิวและที่ติดกับเซลล์เคราติโนไซต์ และพบตัวรับสัญญาณของ TNF-α (TNFR1) แสดงออกบนเซลล์เคราติโนไซต์ในชั้นเบซัลและที่อยู่เหนือชั้นเบซัล สรุปได้ว่าซิตีแปด ที-ลิมโฟไซต์อาจจะหลั่ง TNF-α ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคราติโนไซต์โดยผ่านทาง TNFR1

ซิตีสี่ ที-ลิมโฟไซต์ (CD4 T-lymphocytes)

นอกจากพบซิตีแปดที-ลิมโฟไซต์จำนวนมากในชั้นเยื่อผิวแล้วยังพบซิตีสี่ที-ลิมโฟไซต์จำนวนมากในชั้นลามินา โพรเพรีย (lamina propria) เป็นไปได้ว่าลักษณะทางคลินิกของโรคเอนพลาณัสขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างปริมาณของซิตีแปดและซิตีสี่ที-ลิมโฟไซต์ นอกจากนี้บทบาทของซิตีสี่ที-ลิมโฟไซต์จะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาส II ที่ถูกสร้างมากขึ้นบนเซลล์ที่เสนอแอนติเจน เช่น แลนเกอร์ฮานส์ เซลล์ (Langerhans cell) ที่พบจำนวนมากขึ้นในโรคเอนพลาณัส หรือ เคราติโนไซต์ และ ทีเซลล์ซีพีเตอร์ (T cell receptor; TCR) บนซิตีสี่ที-ลิมโฟไซต์ ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ซิตีสี่ที-ลิมโฟไซต์หลั่งอินเตอร์ลิวคิน-2 (interleukin-2; IL-2) และอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon-gamma; IFN-γ) ซึ่งจะไปกระตุ้นซิตีแปดที-ลิมโฟไซต์แล้วทำให้เกิดกระบวนการอะพอพโตซิสของเซลล์เคราติโนไซต์ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่ามีสารสร้างโมเลกุล ซิตีสี่ลิบ

(CD40) และ ซิติแปกติบ (CD80) มากขึ้นและมีการหลั่ง อินเตอร์ลิวคิน-12 จากเซลล์ที่เสนอแอนติเจน ซึ่งจะกระตุ้น เซลล์ซิติสตี-ลิมโฟซัยท์ให้สร้างและหลั่ง IFN- γ มากขึ้น ในรอยโรคไลเคนพลาเนีย⁽¹⁹⁾ เป็นไปได้ว่าการสร้างและหลั่ง ของ IFN- γ ที่เพิ่มขึ้นตรงบริเวณรอยโรคช่วยทำให้เกิดการ แสดงออกของโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสทูบนเซลล์เคอราติ- โนซัยท์ที่อยู่ตลอดเวลาซึ่งส่งเสริมให้โรคนี้อาจเป็นเรื้อรัง ซึ่งเป็น ลักษณะเด่นของไลเคนพลาเนีย สรุปลักษณะของโมเลกุล ที่แสดงออกบนเซลล์แต่ละชนิดหรือโมเลกุลที่ถูกหลั่งออกมา จากเซลล์บ่งชี้ถึงกลไกการเกิดพยาธิกำเนิดของโรคว่า เป็นแบบระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อ (cell-mediated immunity)

แอนติเจนหนึ่งหรือสองชนิด ?

ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามีแอนติเจนกี่ชนิดและอะไร บ้างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไลเคนพลาเนีย เป็นไปได้ว่า จะเป็นแอนติเจนเพียงชนิดเดียวที่ถูกเสนอบนทั้งโมเลกุล เอ็มเอชซีคลาสวันและคลาสทู หรืออาจจะเป็นแอนติเจน คนละชนิด แต่สิ่งที่สำคัญคือว่าแอนติเจนจะต้องถูกเสนอ บนเอ็มเอชซีทั้งสองโมเลกุลนี้พร้อมๆ กัน เพื่อทำให้เกิด การกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ทั้งสองชนิดไปพร้อมๆ กันและ ทำให้เกิดโรคขึ้น นอกจากนี้ทั้งซิติสตีและซิติแปกติ- ลิมโฟ- ซัยท์สามารถกระตุ้นกันไปมาได้อีก

ชนิดของไซโตไคน์ (Cytokine) ที่ถูกหลั่งออกมา จากที-ลิมโฟซัยท์

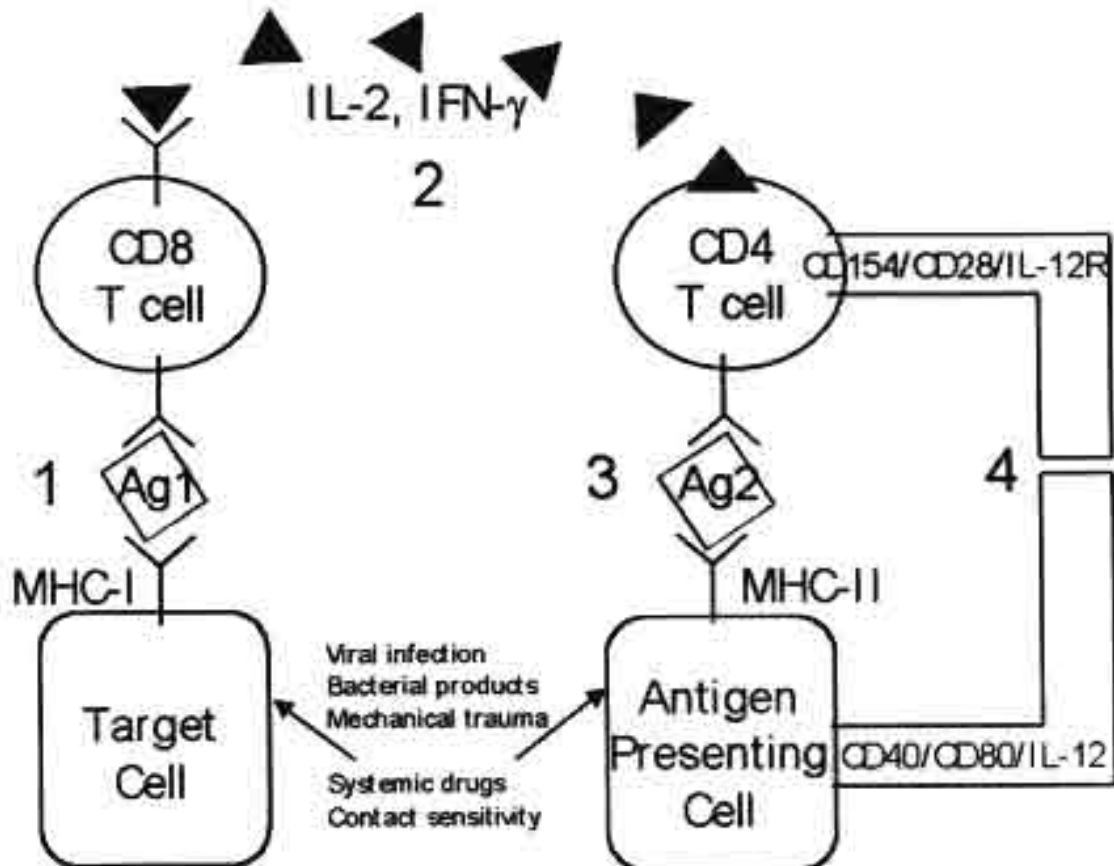
พบว่าเป็นชนิดที่ถูกสร้างจากที-เฮลเปอร์เซลล์ชนิดที่ 1 (T-helper cell 1; Th1) เพราะสามารถตรวจพบ IFN- γ และ TNF- α ในรอยโรคไลเคนพลาเนียแต่ตรวจไม่ พบไซโตไคน์ที่ถูกสร้างจากที-เฮลเปอร์เซลล์ชนิดที่ 2 (Th2) ซึ่งได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-4 และ -10⁽²⁰⁾ โมเลกุลต่างๆ บนเยื่อผิวของเซลล์ที่เสนอแอนติเจน เช่น ซิติสตีบ ซิติ แปกติบ และ เอ็มเอชซีคลาสทู หรือไซโตไคน์ที่ถูกหลั่ง มาจากเซลล์ที่เสนอแอนติเจน คือ อินเตอร์ลิวคิน-12 กระตุ้น ให้ที-ลิมโฟซัยท์เปลี่ยนไปเป็น Th1 และมีการแสดงออก ของตัวรับสัญญาณของแต่ละโมเลกุลที่อยู่บนเยื่อผิวของ Th1 นี้ได้แก่ ซิติหนึ่งร้อยห้าสิบสี่ (CD154; CD40 recep- tor) ซิติยี่สิบแปด (CD28; CD80 receptor) และตัวรับ สัญญาณของ IL-12 ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าไลเคนพลาเนีย เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อโดยผ่านทาง

Th1 ดังนั้นถ้ายับยั้งการออกฤทธิ์ของโมเลกุลเหล่านี้เช่น IFN- γ , TNF- α , ซิติแปกติบ ซิติสตีบ อินเตอร์ลิวคิน-12 โดยใช้ตัวยับยั้ง (inhibitor) ก็น่าจะมีผลในการรักษาไล เคนพลาเนีย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาดังกล่าวใน ไลเคนพลาเนีย นอกเหนือไปจากการศึกษาในโรคมุมคุ้มกัน ด้านเนื้อเยื่อตัวเองชนิดอื่นๆ เช่นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคปลอกประสาท (mul- tiple sclerosis)^(20,21) เป็นต้น

สรุปสมมติฐานที่ 1 เกี่ยวกับการนำเสนอแอนติเจนและ การกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์

ซิติแปกติ-ลิมโฟซัยท์อาจจะจับกับแอนติเจนสิ่งแปลกปลอมร่วมกับโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวันที่อยู่บนเคอราติ- โนซัยท์ในชั้นเบซัล (หมายเลข 1 รูปที่ 3) หลังจากนั้นซิติ แปกติ-ลิมโฟซัยท์อาจจะต้องการสัญญาณเพิ่มเติมจากซิติ สตี-ลิมโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์เป้าหมายซึ่งก็คือเคอราติ- โนซัยท์ในชั้นเบซัล โดยผ่านทาง IL-2 และ IFN- γ (หมายเลข 2 รูปที่ 3) ซึ่งถูกสร้างและปลดปล่อยมาจาก Th1 ที่เปลี่ยนแปลงมาจากซิติสตี-ลิมโฟซัยท์โดยสัญญาณที่ เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง TCR-แอนติเจน (อาจจะเป็น คนละชนิดกับแอนติเจนข้างบน)-โมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสทู (หมายเลข 3 รูปที่ 3) ซึ่งแสดงออกมาจากเซลล์ที่เสนอ แอนติเจน ซึ่งอาจจะเป็แลนเกอร์ฮานส์เซลล์หรือเซลล์ เคอราติโนซัยท์เอง นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลอื่นๆ ที่มีส่วน ร่วมในการกระตุ้น ได้แก่ ซิติสตีบ ซิติแปกติบ และ อินเตอร์- ลิวคิน-12 บนเยื่อผิวเซลล์ที่เสนอแอนติเจน และ ซิติ หนึ่งร้อยห้าสิบสี่ ซิติยี่สิบแปด และตัวรับสัญญาณของ อินเตอร์ลิวคิน-12 บนเยื่อผิวเซลล์ซิติสตี-ลิมโฟซัยท์ (หมายเลข 4 รูปที่ 3) สมมติฐานนี้แสดงว่าซิติสตี และซิติ แปกติ-ลิมโฟซัยท์ต้องจับกับแอนติเจนสิ่งแปลกปลอมที่ ถูกเสนอขึ้นมาบนโมเลกุลเอ็มเอชซี และเกี่ยวข้องกับเซลล์ ที-ลิมโฟซัยท์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์เคอราติโน- ซัยท์ นอกจากนี้สมมติฐานนี้ยังอธิบายกลไกในการปกป้อง ไม่ให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันด้านเนื้อเยื่อตัวเองโดยไม่จำเป็น เพราะว่าจำเป็นต้องอาศัยสัญญาณมาจากทั้งปฏิกิริยาที่เกิด กับซิติแปกติ และซิติสตี-ลิมโฟซัยท์ถึงจะทำให้เกิดการ ทำลายเคอราติโนซัยท์และเกิดโรคในที่สุด

จากสมมติฐานนี้การกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ให้ทำงาน เป็นสิ่งจำเป็น แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาโดย Sugerman และคณะ⁽²²⁾ พบว่าไม่ใช่ซิติแปกติ-ลิมโฟซัยท์ทั้งหมดที่ถูก



รูปที่ 3 สมมติฐานที่ 1 สำหรับกลไกการนำเสนองานแอนติเจนเฉพาะเจาะจงและการกระตุ้นที-ลิมโฟไซต์ในไลเคนพลาเน็ต สังเกตว่าแอนติเจนชนิดที่ 1 (Ag1) และแอนติเจนชนิดที่ 2 (Ag2) อาจจะเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ก็ได้ คัดแปลงแก้ไขจาก Sugerman และคณะ⁽¹⁾
 Figure 3 The first hypothesis for specific antigen presentation and T-lymphocyte activation in lichen planus. Note that Ag1 and Ag2 may or may not be identical. Modified from Sugerman et al.⁽¹⁾

สกัดออกมาจากรอยโรคเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ในหลอดทดลอง และโมเลกุลที่แสดงบนเยื่อผิวของที-ลิมโฟไซต์ในชั้นเยื่อผิวตรงบริเวณรอยโรคก็เป็นชนิดที่ยังไม่เคยได้ถูกกระตุ้น (naïve) จากแอนติเจนเลย⁽²²⁾ ดังนั้นคำถามจึงเกิดขึ้นว่าเซลล์ที่ยังไม่เคยถูกกระตุ้นจำนวนมากนี้มาจากไหน และมีบทบาทอย่างไรในพยาธิกำเนิดของไลเคนพลาเน็ต จึงเป็นที่มาของสมมติฐานที่สองคือกลไกการเกิดโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน

สมมติฐานที่ 2 กลไกการเกิดโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนเบสเมทเมมเบรน

ลักษณะทางคลินิกที่สำคัญประการหนึ่งของไลเคนพลาเน็ตคือการที่เบสเมทเมมเบรนตรงบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันฉีกขาด (รูปที่ 2B) แดกเป็นกิ่งก้าน หรือ มีการสร้างขึ้นอีกครั้ง เป็นที่ทราบกันดี

ว่าเคอราติโนไซต์ส่งเสริมการสร้างเบสเมทเมมเบรน โดยการปลดปล่อยคอลลาเจนชนิดที่ 4 (collagen type IV) และลามินิน 5 (laminin V)⁽²³⁾ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ตายจากขบวนการอะพอพโตซิสไม่สามารถช่วยสร้างเบสเมทเมมเบรนขึ้นมา หรือในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการฉีกขาดของเบสเมทเมมเบรนทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์ชั้นเบซัลไม่สามารถยึดติดกับสิ่งใด จึงกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส คำตอบต่อมาคือสิ่งไหนเกิดก่อนระหว่างการตายของเคอราติโนไซต์หรือเบสเมทเมมเบรนฉีกขาด ลักษณะที่เป็นวงจรเช่นนี้แสดงให้เห็นถึงการที่โรคเป็นเรื้อรัง (chronicity)

แมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinases; MMPs)

MMPs เป็นเอ็นไซม์โปรตีนเอส (proteinase) ที่อาศัยสังกะสี (Zinc) ในการย่อยโปรตีนแมทริกซ์ภายนอกเซลล์

เช่น MMP-2 และ MMP-9 ตัดคอลลาเจนชนิดที่ 4 ในขณะที่ MMP-3 และ MMP-10 ตัดคอลลาเจนชนิดที่ 4 และลามินิน พบการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-3 ในเยื่อหุ้มบริเวณรอยโรค ในขณะที่พบ MMP-9 ถูกสร้างอย่างมากบริเวณแถบของเซลล์ที-ลิมโฟไซต์ซึ่งอยู่ได้ขึ้นเยื่อหุ้ม⁽²⁴⁾ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า TNF- α สามารถกระตุ้นการสร้างและการทำงานของ MMP-9 ดังนั้นเป็นไปได้ว่าระดับ TNF- α ที่เพิ่มขึ้นในรอยโรคใดเดนพลานัสจะกระตุ้นการทำงานของ MMP-9 ทำให้เกิดการทำลายเบสเมมเบรน ซึ่งเป็ผลทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์ตาย นอกจากนี้การฉีกขาดของเบสเมมเบรนยังทำให้ซิติแปดที-ลิมโฟไซต์ที่เป็นพิษเข้าไปทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์เพิ่มมากขึ้น

แมสท์เซลล์ (Mast cells)

พบจำนวนแมสท์เซลล์ในรอยโรคมากขึ้น⁽²⁵⁾ นอกจากนี้ประมาณ 60% ของจำนวนแมสท์เซลล์ที่พบในรอยโรคมีการปลดปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูล (degranulation)⁽²⁶⁾ อาทิ TNF- α เอ็นไซม์คัยเมส (chymase) และทริพเทส (tryptase) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าแมสท์เซลล์จะมีบทบาทสำคัญในการทำลายเบสเมมเบรน โดย TNF- α ที่ถูกหลั่งออกมากระตุ้นการทำงานของ MMP-9 และนอกจากนี้เอ็นไซม์คัยเมสยังช่วยกระตุ้นการทำงานของ MMP-9 อีกด้วย⁽²⁷⁾

คีโมไคน์ (Chemokine)

คีโมไคน์ถูกจัดอยู่ในครอบครัวซีเคไคน์และถูกสร้างโดยเซลล์เกือบทั้งหมดของร่างกาย ตัวอย่างเช่น เวกูเลตเตด ออน แอคติเวชัน นอร์มัล ที-เซลล์ เอ็กซ์เพรสส์ แอนด์ ซีเคร็ต (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; RANTES) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ (monocyte) อีโอซิโนฟิล (eosinophil) และแมสท์เซลล์เคลื่อนที่ RANTES ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิด เช่น ที-ลิมโฟไซต์ เซลล์เคอราติโนไซต์จากช่องปาก แมสท์เซลล์ จากการศึกษาพบว่าที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกสกัดจากรอยโรคมีการแสดงออกของ RANTES และนอกจากนี้ TNF- α ยังกระตุ้นให้หลั่ง RANTES เพิ่มขึ้นจากที-ลิมโฟไซต์⁽²⁸⁾ ดังนั้นเป็นไปได้ว่า

RANTES ที่หลั่งออกมาจากที-ลิมโฟไซต์บริเวณรอยโรคจะเหนี่ยวนำให้แมสท์เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้ามาสู่รอยโรคและกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูลของแมสท์เซลล์ ได้แก่ TNF- α ซึ่งก็จะกระตุ้นการสร้างและหลั่ง RANTES อีกที ซึ่งกลไกที่กระตุ้นกันไปมานี้จะทำให้โรคใดเดนพลานัสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ RANTES จะช่วยในการเหนี่ยวนำและการปลดปล่อยสารจากแกรนูลของแมสท์เซลล์แล้ว RANTES ยังช่วยให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบมีชีวิตรอดยืนยาวขึ้นทำให้โรคเป็นเรื้อรังมากขึ้น

สรุปสมมติฐานที่ 2 กลไกการเกิดโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับชนิดของแอนติเจน

สมมติฐานนี้ประกอบไปด้วย 1. การทำลายเบสเมมเบรนโดย MMP-9 ทำให้ 2. เซลล์เคอราติโนไซต์ตายแบบอะพอพโตซิส 3. มีการเคลื่อนที่ของซิติแปดที-ลิมโฟไซต์เข้าไปทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์มากขึ้น 4. MMP-9 ที่สร้างมาจากที-ลิมโฟไซต์ถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้นโดยเอ็นไซม์คัยเมสจากแมสท์เซลล์ 5. แมสท์เซลล์ถูกชักนำให้เคลื่อนเข้ามาในรอยโรคและปล่อยสารจากแกรนูลโดย RANTES จากที-ลิมโฟไซต์ 6. ซึ่งหนึ่งในสารที่ถูกปลดปล่อยออกมาได้แก่ TNF- α ที่ทำให้เกิดการสร้าง RANTES มากขึ้นหรือกระตุ้นการเคลื่อนที่ของที-ลิมโฟไซต์จากเส้นเลือดเข้าสู่รอยโรคมากขึ้น สมมติฐานนี้กล่าวถึงเฉพาะที-ลิมโฟไซต์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงหรือยังไม่เคยถูกกระตุ้นโดยแอนติเจนใดๆเลย ซึ่งพบได้ในรอยโรค ดังนั้นที-ลิมโฟไซต์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคโดยการสร้าง MMP-9 และ RANTES

การตายของเซลล์เคอราติโนไซต์แบบอะพอพโตซิสในรอยโรค

จากที่กล่าวมาข้างต้นการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์แบบอะพอพโตซิสเป็นผลลัพธ์สุดท้ายของการเกิดพยาธิสภาพ ไม่ว่ารอยโรคจะเริ่มเกิดเนื่องจากการรับรู้แอนติเจนของใดเดนพลานัสโดยที-ลิมโฟไซต์ (ตามสมมติฐานที่ 1) หรือเริ่มจากการที่แมสท์เซลล์ปลดปล่อยสารในแกรนูลทำให้เกิดการกระตุ้นที-ลิมโฟไซต์และการทำลายเบสเมมเบรนด้วยเอ็นไซม์ MMP-9 จนทำให้ที-ลิมโฟไซต์



รูปที่ 4 การปรากฏของรูปแบบที่ถูกกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเปส-3 (ถูกกระตุ้นในภาพ A) และรูปแบบที่ถูกตัดของโพลิ (เอดีที-ไรโบส) โพลิเมอเรส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์แคสเปส-3 (หัวลูกศรในภาพ B) ในเซลล์เคอราติโนไซต์ของไลเคนพลาเนีย สิ่งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเกิดการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ในไลเคนพลาเนียแบบอะพ็อพโตซิส ขยายจากขนาดคั้งต้น 10 เท่า

Figure 4 The presence of activated form of caspase-3 (arrows in panel A) and cleaved form of poly (ADP-ribose) polymerase, which is a substrate of caspase-3 (arrowheads in panel B), in keratinocytes of lichen planus. These demonstrate that keratinocytes in lichen planus undergo apoptotic cell death. Original magnification 10X.



รูปที่ 5 ไม่พบการทำลายสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนๆ ในไลเคนพลาเนีย (A) ในขณะที่พบว่ามีกรดดีเอซีในนิวเคลียสของเซลล์เคอราติโนไซต์จากชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียเดียวกัน (หัวลูกศรในภาพ B) หลังจากที่ใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอสไอย่อยสารพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวกในระหว่างขั้นตอนของการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่าอินซัยดู ทันเนต ขยายจากขนาดคั้งต้น 10 เท่า

Figure 5 DNA fragmentation in lichen planus was not found (A), while nuclear staining was found in keratinocytes from the same lichen planus specimen (arrowheads in panel B) after DNase I was used to digest DNA in order to be a positive control during the experimental steps of an in situ TUNEL assay. Original magnification 10X.

เข้าไปทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์ (ตามสมมติฐานที่ 2) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเหตุการณ์เริ่มต้นของพยาธิกำเนิดของไลเคนพลาเนียในผู้ป่วยแต่ละคนจะมีความแตกต่างกันไป เนื่องจากผู้เขียนมีความสนใจในขบวนการอะพ็อพโตซิสที่เกิดขึ้นในไลเคนพลาเนีย ผู้เขียนจึงได้ทำการศึกษาโดยการอ้อมขึ้นเนื้อที่ได้จากรอยโรคไลเคนพลาเนีย และพบว่ามีกรดแสดงออกที่มากขึ้นของเอนไซม์แคสเปส (caspase) ในรูปแบบที่ถูกกระตุ้นการทำงาน (activated form) ในนิวเคลียส (nuclear staining) ของเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้หนึ่งของการเกิดอะพ็อพโตซิส (รูปที่ 4A) เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อผิวปกติ นอกจากนี้หนึ่งในสารตั้งต้น (substrate) ของเอนไซม์แคสเปสที่ถูกกระตุ้นการทำงานซึ่งได้แก่ โพลิ (เอดีที-ไรโบส) โพลิเมอเรส [Poly (ADP-ribose) polymerase; PARP] ถูกตัด (cleaved) ในเซลล์เคอราติโนไซต์ (ขึ้นเยื่อผิว) จากรอยโรคไลเคนพลาเนีย (รูปที่ 4B) เมื่อเปรียบเทียบกับไม่พบสารตั้งต้นที่ถูกตัดนี้ในเซลล์เคอราติโนไซต์จากเยื่อผิวปกติ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแท้จริงแล้วเกิดการกระตุ้นเอนไซม์แคสเปส และการทำงานของเอนไซม์นี้จริง ๆ ในรอยโรคไลเคนพลาเนีย ซึ่งจะนำไปสู่ขบวนการอะพ็อพโตซิสในที่สุด

ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถตรวจพบการทำลายสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนๆ (DNA fragmentation) ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของการเกิดขบวนการอะพ็อพโตซิสก็ตาม (รูปที่ 5A) ผลการศึกษานี้ตรงกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงว่าไม่จำเป็นต้องเกิดการทำลายสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนๆ ในขบวนการเกิดอะพ็อพโตซิสทุกครั้งเสมอไป^(28,29)

บทสรุป

พยาธิกำเนิดของไลเคนพลาเนียอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกต่างๆ ที่ถูกอธิบายด้วยสมมติฐานทั้งสองตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น แต่ก็ยังไม่มีใครทราบถึง เหตุการณ์เริ่มต้นของการเกิดไลเคนพลาเนีย สาเหตุหรือชนิดของแอนติเจนหรือปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยคนใดคนหนึ่งเสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลาเนียมากขึ้น ดังนั้นจึงมีคำถามมากมายที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของไลเคนพลาเนียซึ่งกำลังรอคำตอบอยู่ อาทิ แอนติเจนที่ทำให้เกิดไลเคนพลาเนียคืออะไร ลำดับเหตุการณ์ในการเกิดไลเคนพลาเนียเป็นอย่างไร กลไกไหนที่กระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสของเซลล์เคอราติโนไซต์ ปัจจัยอะไรที่ทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลาเนียมากขึ้น เป็นต้น คำตอบหรือความรู้ที่ได้จากการค้นคว้า

วิจัยนี้มีความสำคัญอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิกเพื่อหาวิธีใหม่ ๆ หรือสารใหม่ ๆ ในการรักษาโรคเอนพลาณัสต่อไปในอนาคต นอกเหนือจากการใช้ยาสเตียรอยด์ (steroid) ที่ใช้รักษาโรคเอนพลาณัสในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อ. ดร. ทพญ. ศาครินทร์ คงขุนเทียน ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนบทความนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณทุนสนับสนุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) หมายเลข TRG4580028 ประจำปี พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนการตีพิมพ์บทความนี้และงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

1. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 351-367.
2. Chainani-Wu N, Silverman SJr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 901-909.
3. Axéll T, Rundqvist L. Oral lichen planus- a demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 52-56.
4. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:431-436.
5. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 2001; 28:72-82.
6. Haapalainen T, Oksala O, Kallioinen M, Oikarinen A, Larjava H, Salo T. Destruction of the epithelial anchoring system in lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 100-103.
7. Scully C, Beyli M, Ferreira MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus:

etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 86-122.

8. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Auto-cytotoxic T cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142:449-456.
9. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:309-315.
10. Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 104:784-788.
11. Holmstrup P, Dabelsteen E. Changes in carbohydrate expression of lichen planus affected oral epithelial cell membrane. *J Invest Dermatol* 1979; 73:364-367.
12. Spetz AL, Strominger J, Groh-Spies V. T cell subsets in normal human epidermis. *Am J Pathol* 1996; 149:665-74.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568-574.
14. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:1-8.
15. Chaiyapit P, Kafrawy AH, Miles DA, Zunt SL, Van Dis ML, Gregory RL. Oral lichen planus: an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:210-215.
16. Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi Y, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, et al. Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198:537-542.
17. Sugerman PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor alpha (TNF-

วิจัยนี้มีความสำคัญอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิกเพื่อหาวิธีใหม่ ๆ หรือสารใหม่ ๆ ในการรักษาโรคเอนพลาณัสต่อไปในอนาคต นอกเหนือจากการใช้ยาสเตียรอยด์ (steroid) ที่ใช้รักษาโรคเอนพลาณัสในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อ. ดร. ทพญ. ศาครรัตน์ คงขุนเทียน ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียบเรียงบทความนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) หมายเลข TRG4580028 ประจำปี พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนการตีพิมพ์บทความนี้และงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

1. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 351-367.
2. Chainani-Wu N, Silverman SJr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 901-909.
3. Axéll T, Rundqvist L. Oral lichen planus- a demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 52-56.
4. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:431-436.
5. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 2001; 28:72-82.
6. Haapalainen T, Oksala O, Kallioinen M, Oikarinen A, Larjava H, Salo T. Destruction of the epithelial anchoring system in lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 100-103.
7. Scully C, Beyli M, Ferreira MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 86-122.
8. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Auto-cytotoxic T cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142:449-456.
9. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:309-315.
10. Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 104:784-788.
11. Holmstrup P, Dabelsteen E. Changes in carbohydrate expression of lichen planus affected oral epithelial cell membrane. *J Invest Dermatol* 1979; 73:364-367.
12. Spetz AL, Strominger J, Groh-Spies V. T cell subsets in normal human epidermis. *Am J Pathol* 1996; 149:665-74.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568-574.
14. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:1-8.
15. Chaivayit P, Kafrawy AH, Miles DA, Zunt SL, Van Dis ML, Gregory RL. Oral lichen planus: an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:210-215.
16. Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi Y, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, et al. Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198:537-542.
17. Sugerman PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor alpha (TNF-

