



สถาบันราชานุกูลมีความยินดีเผยแพร่ข้อมูล องค์ความรู้ นี้แก่ผู้สนใจ
การนำข้อมูลจากเว็บไซต์นี้ไปใช้เพื่อการศึกษา วิจัย
หรือเผยแพร่ต่อเพียงบางส่วน หรือทั้งหมด
กรุณาอ้างอิง “ชื่อเจ้าของผลงาน” เป็นแหล่งที่มาของข้อมูล



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจาก

โพรงประสาทฟันและกระดูกขากรรไกร

Isolation and characterization mesenchymal stem cells

from human dental pulp and alveolar bone

โดย

นางสาว จุฬารพร เต็มทอง

นางสาว วินิรมล ศรีวัฒนา

นาย ชัยภัทร วณิชชานนท์

นางสาว ฌติกาณ ม่วงกล่อม

นางสาว มัทนา จองกา

สถาบันราชานุกูล

กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข

2552-2553

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาเป็นอย่างยิ่งจากนายแพทย์วีรยุทธ ประพันธ์พจน์ หัวหน้าศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยและติดตามการทำวิจัยครั้งนี้อย่างใกล้ชิดตลอดมานับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อย สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้กำลังใจในการทำวิจัย ซึ่งผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ แพทย์หญิงพรณพิมล วิบุลากร ผู้อำนวยการสถาบันราชานุกูล ทันตแพทย์หญิงสุทธิมาศ วงษ์ประภารัตน์ และทันตแพทย์หญิงกัตติมา บุรพลกุล ผู้บังคับบัญชา ที่อนุญาติและสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มงานทันตกรรมสถาบันราชานุกูลและโรงพยาบาลสงฆ์รวมทั้งบุคลากรศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงาน

ขอบคุณ ทันตแพทย์หญิงธิดารัตน์ อังวรารวงค์ นิสิตปริญญาคุชฎีบัณฑิต จีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ RNA ของเซลล์ต้นกำเนิดที่คัดแยกจากกระดูกเบ้าฟัน

ขอบคุณ คุณมัทธมา นันทรัตน์ นิสิตปริญญาคุชฎีบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ mRNA GAPDH

ขอบคุณ คุณนันทวัน นวโรจน์ นักวิทยาศาสตร์หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาในเรื่องขั้นตอนและวิธีการในห้องปฏิบัติการ

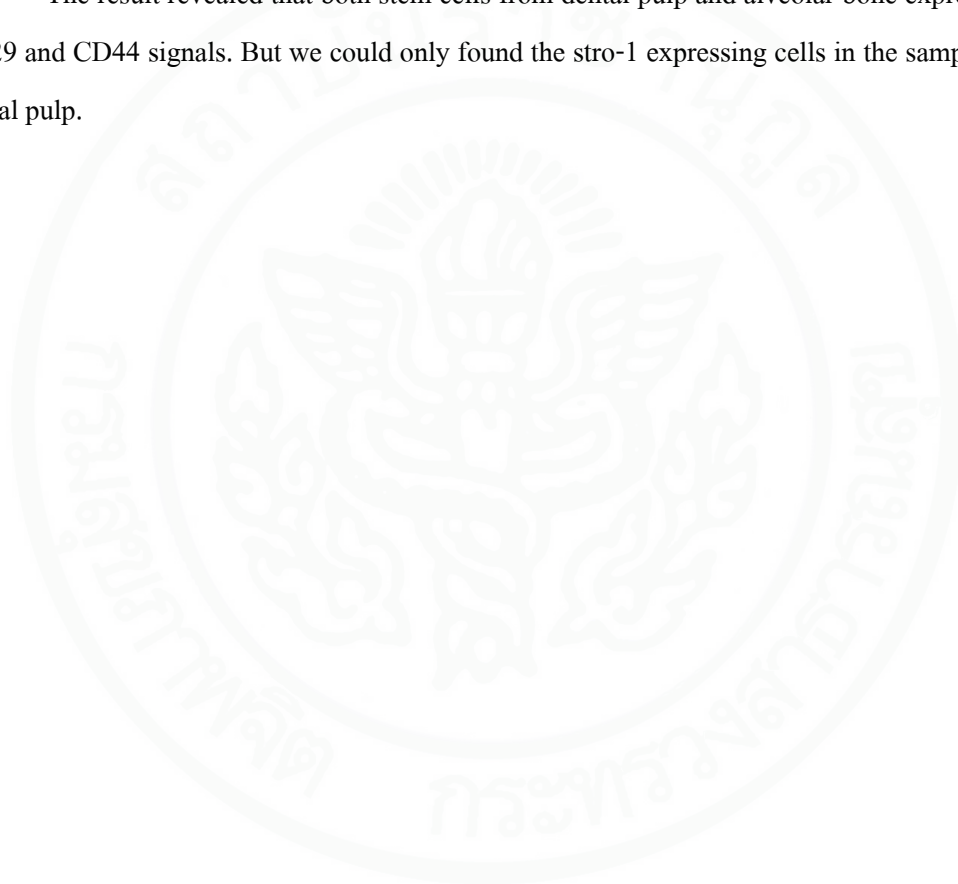
ขอบคุณ คุณชนิสิตา เวชวิรุฬห์ และ ทันตแพทย์หญิงอรนุช เตชาธาราพิทย์ที่กรุณาให้คำปรึกษาในเรื่องการวิเคราะห์ข้อมูล

Abstract

This study aimed to isolate and characterize stem cells from dental pulp and alveolar bone obtained from patients who came to have the third molar, premolar tooth or alveolar bone removal at Rajanukul Institute and Priest Hospital.

The stem cells were isolated by the Out growth method. The characterization was performed by Immunofluorescence assay using anti-stro1 antibody and Reverse transcription polymerase chain reaction using CD29 and CD44 makers.

The result revealed that both stem cells from dental pulp and alveolar bone expressed the CD29 and CD44 signals. But we could only found the stro-1 expressing cells in the samples from dental pulp.



บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดออกมาจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน พร้อมทั้งระบุเซลล์ต้นกำเนิดที่คัดแยกได้โดยทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน ที่ได้จากผู้มารับบริการถอนฟันกรามซี่ที่สามหรือฟันกรามน้อยที่สถาบันราชานุกูลหรือโรงพยาบาลสงฆ์ และ ผู้ที่มารับบริการตัดกระดูกเบ้าฟันส่วนที่งอกเกินที่โรงพยาบาลสงฆ์ ด้วยวิธีการ Out growth method และระบุเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันด้วยการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay โดยใช้ anti Stro-1 antibody ร่วมกับการตรวจการแสดงออกของ stem cell markers CD29 และ CD44 ด้วยวิธีการ reverse transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR)

สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดได้จากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันโดย พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมีเซลล์ซึ่ง express Stro-1 ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเบ้าฟันไม่พบว่ามีเซลล์ซึ่ง express Stro-1 แต่จากการระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการตรวจการแสดงออกของ CD29 และ CD 44 โดยวิธี RT-PCR พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของ CD29 และ CD 44

คำสำคัญ (keywords): dental pulp stem cells, alveolar bone, เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน, กระดูกเบ้าฟัน

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
เซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด	3
ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด	4
แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดในร่างกาย	5
การใช้เซลล์ต้นกำเนิดในทางพันธุกรรม	8
แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน	9
การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกขากรรไกรบน	10
การระบุเซลล์ต้นกำเนิด	11
บทที่3 วัสดุและวิธีการวิจัย	
รูปแบบการวิจัยและหลักเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมในงานวิจัย	13
การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟันและกระดูกขากรรไกรบน	13
การแยกเซลล์ต้นกำเนิดออกจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกขากรรไกรบน	14
การเพาะเลี้ยงเซลล์	18
การระบุเซลล์ต้นกำเนิด	23
บทที่4 ผลการวิจัย	33
บทที่5 สรุปและอภิปรายผล	41
เอกสารอ้างอิง	45
ประวัติผู้วิจัย	50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	รายละเอียดของการเก็บตัวอย่างพืกรามชี้ที่สาม พืกรามน้อยและกระดุกเบ้า พืงปีงบประมาณ 2552	33
4.2	รายละเอียดของการเก็บตัวอย่างพืกรามชี้ที่สามพืกรามน้อยและกระดุกเบ้า พืงปีงบประมาณ 2553	33
4.3	รายละเอียดของตัวอย่างพืกรามชี้ที่สามพืกรามน้อยและกระดุกเบ้าพืงที่ สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน 2 ปีงบประมาณ	34
4.4	รายละเอียดข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงได้	34
4.5	สัดส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่ย้อมด้วยAnti-stro-1ติด (positive cell) ต่อเซลล์ ทั้งหมดที่กำลังขยาย 100 เท่า จากตัวอย่างโพรงประสาทพืง 7 คน และจาก กระดุกเบ้าพืง 3 คน	36

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงการแบ่งประเภทเซลล์ต้นกำเนิดตามคุณสมบัติความสามารถในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่น	5
2.2	แสดงEmbryonic stem cells จากระยะตั้งแต่การปฏิสนธิจนกลายเป็น blastocyst	6
2.3	แสดงภาพทารกในครรภ์	7
2.4	ตัวอย่างของแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดในร่างกาย	8
2.5	การทำ Induced pluripotent stem cells (iPS)	8
2.6	แสดงส่วนประกอบของฟัน และกระดูกเบ้าฟัน	10
2.7	แสดงหลักการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay	12
3.1	แสดงการผ่าฟันบริเวณรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน ด้วย high speed diamond fissure bur	13
3.2	แสดงการนำตัวอย่างฟัน ไปยังห้องปฏิบัติการ	14
3.3	แสดงการใช้เครื่องมือไม่มีคมใส่ระหว่างรอยบากบนตัวฟันแล้วบิดให้ตัวฟันแตกออก	15
3.4	แสดงการใช้ Endodontic spoon ตักเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออก	15
3.5	แสดงการใช้ใบมีดผ่าตัดหั่นชิ้นโพรงประสาทฟันเป็นชิ้นเล็กๆ	16
3.6	แสดงการวางชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dishเป็นระยะห่างเท่าๆกัน	16
3.7	แสดงการวางชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dishเป็นระยะห่างเท่าๆกัน	17
3.8	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 5 วัน (กำลังขยาย200)	19
3.9	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน (กำลังขยาย40)	19
3.10	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน (กำลังขยาย100)	20

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.11	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชั้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน (กำลังขยาย200)	20
3.12	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชั้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วันphase contrast (กำลังขยาย200)	21
3.13	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่เจริญเป็นกลุ่มๆ	21
3.14	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่เจริญจนสามารถทำการถ่ายเซลล์ได้	22
3.15	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่ปล่อยให้เจริญนานเกินจนไม่สามารถทำการ ถ่ายเซลล์ได้	22
3.16	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่หดรัดตัวในขณะที่ทำการ ถ่ายเซลล์	23
3.17	แสดงเซลล์ที่ย้อม Immunofluorescence ที่เป็น control	25
3.18	แสดงเซลล์ที่ย้อม Immunofluorescence ที่เป็น Test	26
3.19	แสดงเซลล์ที่ย้อม Immunofluorescence ที่เป็น control เพื่อใช้เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ย้อมติด Immunofluorescence anti Stro-1 ที่เป็น Test	27
3.20	แสดงการนับเซลล์ที่ย้อม Immunofluorescence anti Stro-1 ที่เป็น Test ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop	27
4.1	ภาพเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันที่นำมาระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assayโดยใช้ Anti Stro-1 antibody เปรียบเทียบระหว่าง control และ test	35
4.2	ภาพเซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเบ้าฟันที่นำมาระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assayโดยใช้ Anti Stro-1 antibody เปรียบเทียบระหว่าง control และ test	36
4.3	ภาพการแสดงออกของCD 29 ในการทำ duplex PCR	37
4.4	แผนภูมิแท่งแสดงค่า Relative density ระหว่างCD29 กับ GAPDH	38
4.5	ภาพการแสดงออกของCD 44 ในการทำ duplex PCR	39
4.6	แผนภูมิแท่งแสดงค่า Relative density ระหว่างCD44 กับ GAPDH	40

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถาบันราชานุกูล เป็นสถาบันที่ให้บริการผู้ที่มีความบกพร่องทางสติปัญญาตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 18 ปี โดยปัญหาทางทันตกรรมที่พบบ่อยในบุคคลกลุ่มนี้ ได้แก่ปัญหาฟันผุและเหงือกอักเสบเนื่องจากความบกพร่องในการดูแลสุขภาพช่องปากของตนเอง อีกทั้งยังพบว่ามักมีโรคลมชักซึ่งมักเกิดอุบัติเหตุทำให้ฟันหัก

อุปสรรคที่สำคัญในการให้การรักษานี้ คือการที่ผู้ป่วยไม่สามารถให้ความร่วมมือในการรักษาได้อย่างเต็มที่ ทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาฟันไว้ได้ และต้องถอนฟันออกโดยไม่จำเป็น และหากผู้ป่วยมีโรคทางระบบ เช่น โรคหัวใจ หรือ ชักเกร็ง ร่วม การรักษาโดยการถอนฟันจะมีความเสี่ยงในการเกิดเหตุการณ์ฉุกเฉินซึ่งมีอันตรายถึงชีวิตได้มากขึ้น ดังนั้น หากสามารถหาวิธีการรักษาปัญหาทันตกรรมดังกล่าวที่ใช้เวลาน้อย มีอัตราการหายจากโรคสูง และไม่ต้องการความร่วมมือจากผู้ป่วยมากนัก ก็จะเป็นประโยชน์ในการช่วยให้ผู้ป่วยมีฟันบดเคี้ยวอาหารทำให้มีคุณภาพชีวิตที่ดี และยังช่วยลดความเสี่ยงจากการรักษาฟันที่ผู้ดูแลวิธีการถอนฟันอีกด้วย

เซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1960 โดยนักวิจัยชาวแคนาดา ชื่อ Ernest McCulloch และ James E. Till¹ จากการศึกษาที่ผ่านมานักวิจัยใช้ประโยชน์จากเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) หลากหลาย เช่น การใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากไขกระดูกและจากไตในการซ่อมแซมและสร้างไต² การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดผิวกระจกตาตัวเอง (autologous limbal stem cells) ในการรักษาผู้ป่วยที่มีการสูญเสียกระจกตาอย่างรุนแรง³ การนำเซลล์ต้นกำเนิดจากสมอง (Adult neuronal stem cells) บริเวณโพรงน้ำใต้สมอง (Subventricular zone) เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (Bone marrow stem cells) เซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์ผิวหนัง (Epithelial stem cells) และเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการกระตุ้นเหนี่ยวนำ (induced pluripotent stem cells:iPS) มาใช้ปลูกถ่ายเพื่อรักษาโรคทางระบบประสาทส่วนกลางเสื่อม เช่น โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคฮันติงตัน (Huntington's disease) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคเซลล์ประสาทสั่งการเสื่อมชนิด Amyotrophic lateral sclerosis การใช้ Oligodendrocyte progenitor cells ในการรักษาโรค Multiple sclerosis และ ต้อหิน (Glaucoma)⁴ การนำเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่บนผิวหนังบริเวณรากผมที่โป่งเป็นกระเปาะ (Keratinocyte stem cells –interfollicular /-follicular) และ Melanocyte stem ในการปลูกผม การนำเซลล์ต้นกำเนิดจากผิวหนัง (Dermal stem cells) มาสร้างผิวหนังเทียม⁵

ฟันเป็นอวัยวะหนึ่งที่สามารถพบเซลล์ต้นกำเนิด โดยสามารถพบได้ใน เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (Dental pulp) เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) เนื้อเยื่อส่วนปลายราก (Periapical region) เป็นต้น⁶ เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟันมนุษย์สามารถนำไปสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในการรักษารอยทะลุของกะโหลกศีรษะในหนู⁷ รวมทั้งนำไปเพิ่มความหนาของผนังหัวใจ

และลดบริเวณกล้ำเนื้อหัวใจขาดเลือด⁸ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากฟัน มาใช้ในการรักษาปัญหาทางทันตกรรมของผู้ปกครองทางสถิติปัญหา โดยในเบื้องต้นมุ่งหวังให้สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดได้จากโพรงประสาทฟันหรือเศษกระดูกเบ้าฟันซึ่งอาจมีเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหลงเหลืออยู่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยก (Isolation) เซลล์ต้นกำเนิดออกมาจากโพรงประสาทฟัน (dental pulp) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone)

2. เพื่อระบุ (characterization) เซลล์ต้นกำเนิดที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อมาใช้ในการรักษาโรคในช่องปากหรือโรคทางระบบอื่นๆ ต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยนอกร่างกายมนุษย์ (*ex vivo study*) ซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันราชานุกูลแล้ว

กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้มารับบริการถอนฟันกรามซี่ที่สามเนื่องจากเป็นฟันคุดหรือฟันกรามน้อยด้วยเหตุผลในการจัดฟัน ที่สถาบันราชานุกูล หรือที่โรงพยาบาลสงฆ์ ผู้ที่มารับบริการตัดกระดูกเบ้าฟันส่วนที่งอกเกิน (exostosis) เพื่อเหตุผลในการใส่ฟัน ที่โรงพยาบาลสงฆ์ ในช่วงเวลาที่ดำเนินการวิจัย

สมมติฐานการวิจัย

ในโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันมีเซลล์ต้นกำเนิด

คำสำคัญ (Keywords): dental pulp stem cells, alveolar bone, เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน, กระดูกเบ้าฟัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด
2. ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด
3. แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดในร่างกาย
4. การใช้เซลล์ต้นกำเนิดในทางพันธุกรรม
5. แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน
6. การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกขากรรไกร
7. การระบุเซลล์ต้นกำเนิด

1. เซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด

เซลล์ต้นกำเนิดหมายถึงเซลล์ใดๆก็ตามที่มีลักษณะ 2 ประการ คือ

1. เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเองได้ (Self replicate)
2. สามารถเจริญไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม

โดยในการแบ่งเซลล์ หนึ่งในสองเซลล์จะต้องคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด คือยัง

ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ⁹

เซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 โดยนักวิจัยชาวแคนาดา ชื่อ Ernest McCulloch และ James E. Till และในปี ค.ศ. 1970 Freidenstien และคณะพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Clonogenic fibroblast precursor cells (CFU-F) จากไขกระดูกสามารถพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ของกระดูกและกระดูกอ่อน¹

การรักษาโรคทางโลหิตวิทยาได้นำเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกมาใช้เป็นเวลานานหลายสิบปีแล้ว โดยศาสตราจารย์นายแพทย์ E. Donnall Thomas แห่ง Fred Hutchinson Research Center มหาวิทยาลัยวอชิงตัน ซีแอตเติล เป็นผู้ริเริ่มและบุกเบิกการรักษาด้วยการปลูกถ่ายไขกระดูกเป็นคนแรกและได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาหรือการแพทย์เมื่อปี พ.ศ. 2532 ปัจจุบันการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเป็นวิธีการรักษามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจาง อะพลาสติก โรคธาลัสซีเมีย โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคภูมิโผลมา และโรคออดิอิมมูน พบว่าได้ผลดีมาก แต่การนำออกจากไขกระดูกยุ่งยาก ต้องเจาะไขกระดูกโดยดมยาสลบผู้ป่วย

ต่อมา มีการใช้ growth factor เช่น Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกออกมาในกระแสเลือดมากขึ้น ไม่ต้องทำการเจาะไขกระดูก ทำให้การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดง่ายขึ้น และการฟื้นตัวของการสร้างเม็ดเลือดภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากเม็ดเลือดเร็วกว่าการปลูกถ่ายจากไขกระดูก แต่มีอุบัติการณ์ของ chronic graft versus host disease สูงกว่า

ปัจจุบัน วงการแพทย์ให้ความสนใจเรื่องการปลูกถ่ายอวัยวะเพื่อการรักษาโรคที่มีอวัยวะพิการ เช่น โรคไตวาย โรคตับวาย โรคหัวใจพิการ และจากความสำเร็จในการผ่าตัดและประสิทธิภาพของยากดภูมิคุ้มกันเพื่อให้ร่างกายของผู้ป่วยรับอวัยวะที่ได้รับบริจาคจากผู้อื่น ทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนอวัยวะ จึงมีความสนใจในการสร้างอวัยวะเทียมและค้นหาวิธีในการซ่อมแซมหรือสร้างอวัยวะนั้นขึ้นมาใหม่ โดยการวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (Embryonic stem cells) เพื่อนำไปใช้ซ่อมแซมอวัยวะของร่างกายที่ผิดปกติจากโรค ความเสื่อมจากความสูงอายุ โดยการปลูกถ่ายเซลล์เพื่อให้มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในบริเวณที่มีการปลูกถ่าย หรือกระตุ้นเซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงเพื่อให้มีการแบ่งตัว เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติหรือสร้างอวัยวะหรือเนื้อเยื่อแล้วนำไปฝังในบริเวณที่ผิดปกติเพื่อทำหน้าที่ทดแทนอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่ผิดปกตินั้น เรียกวิธีการรักษาแบบนี้ว่า regenerative medicine^{10, 11}

2. ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด¹²

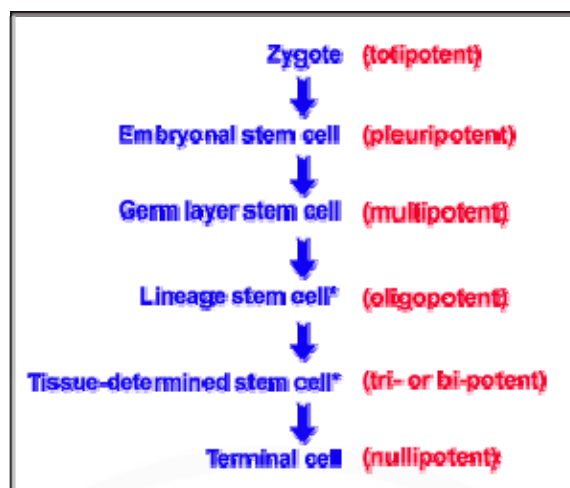
หากแบ่งเซลล์ต้นกำเนิดตามคุณสมบัติความสามารถในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่นที่ทำหน้าที่จำเพาะเจาะจง สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1 Totipotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการที่ไข่ผสมกับอสุจิและมีการแบ่งตัวในระยะ blastomere ประมาณ 2 วัน เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ร่างกายชนิดใดก็ได้รวมถึงการพัฒนาไปเป็นทั้งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells) และรก (Placenta tissue)

2.2 Pluripotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการที่ไข่ผสมกับอสุจิและมีการแบ่งตัวในระยะ blastocyst ประมาณ 5 วัน เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ร่างกายได้ทุกชนิด ทั้ง 3 germ layers ยกเว้นรก

2.3 Multipotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในเนื้อเยื่อของมนุษย์ที่โตเต็มวัย (adult stem cells) มีความสามารถจำกัด คือไม่สามารถพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์ทุกชนิดได้เหมือนอย่าง Totipotent stem cells และ Pluripotent stem cells เพราะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของร่างกายที่โตเต็มที่และมีการพัฒนาไปบ้างแล้วแต่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้บางชนิดเฉพาะที่อยู่ใน germ layer เดียวกัน

เซลล์ที่พัฒนาต่อจาก Multipotent stem cells เรียกว่า Progenitor หรือ Precursor cells ได้แก่ oligopotent, tri or bi potent stem cells เป็นเซลล์ในช่วงสุดท้ายของเซลล์ต้นกำเนิดที่พร้อมจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเพื่อทำหน้าที่ซ่อมแซมร่างกายส่วนที่สึกหรอแต่ขาดคุณสมบัติการสร้างเซลล์ทดแทนตัวเอง (self renewal)



ภาพที่ 2.1 แสดงการแบ่งประเภทเซลล์ต้นกำเนิดตามคุณสมบัติความสามารถในการพัฒนา
เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่น

3. แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดในร่างกาย¹²

แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดได้มาจากร่างกายมนุษย์ในช่วงอายุต่างๆ ดังนี้

3.1 ระยะตัวอ่อน (Embryo)

3.2 ระยะทารกในครรภ์ (Fetus)

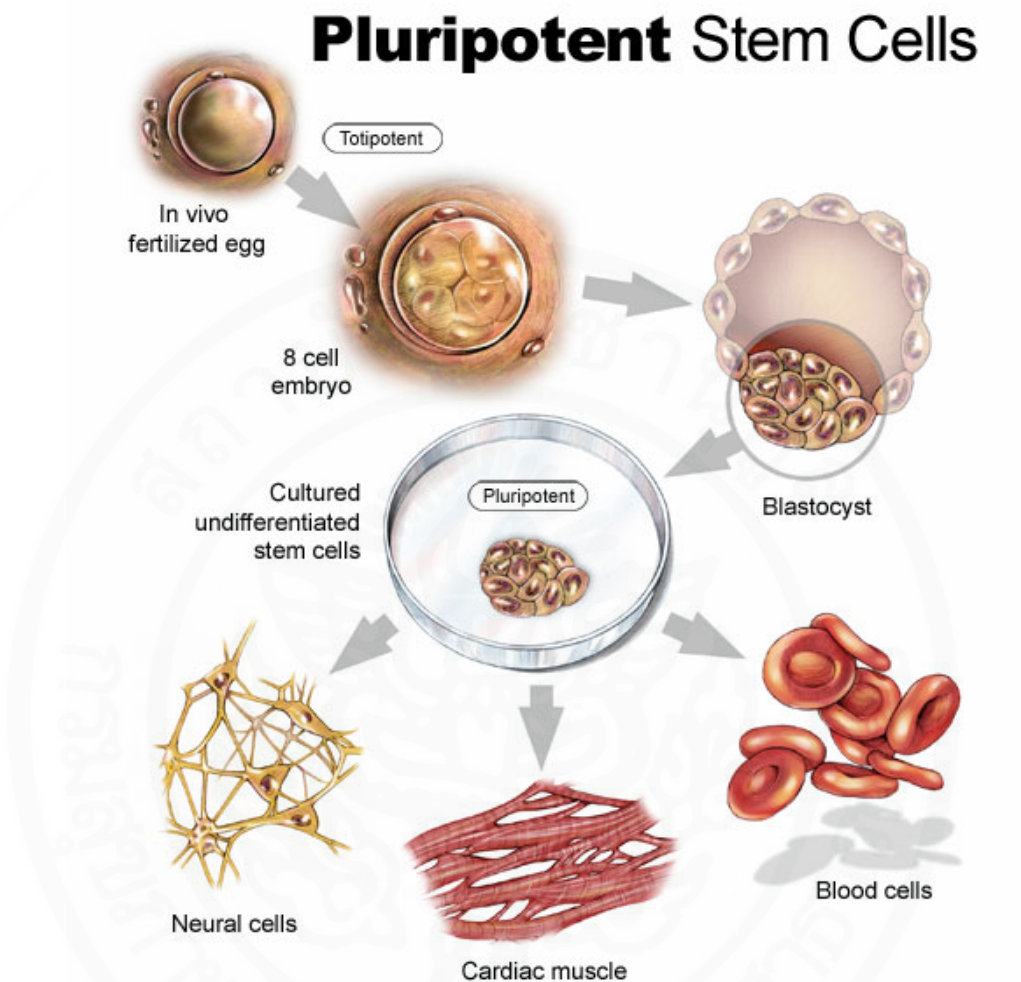
3.3 ระยะผู้ใหญ่เต็มวัย (Adult)

3.1 ระยะตัวอ่อน (Embryo)

เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากช่วงอายุนี้นี้ เรียกว่า Embryonic stem cells คือช่วงที่ไข่ถูกผสมแล้วจะเป็นตัวอ่อนอายุไม่เกิน 2 วัน มีการแบ่งตัว 2-3 ครั้งเท่านั้น จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ blastocyst และเข้าสู่ระยะ morula ประมาณ 5 วัน ภายในจะพบลักษณะของเซลล์เป็นก้อนเกิดขึ้นซึ่งเรียกว่า inner cell mass ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาได้ครบทั้ง 3 germ layers คือ ectoderm, mesoderm และ endoderm การนำเซลล์ต้นกำเนิดจากส่วน inner cell mass ของ blastocyst มาเพาะเลี้ยงจะมีคุณสมบัติเป็น Pluripotential stem cells ซึ่งจะใช้เป็นสายพันธุ์ของเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell line) ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ไขกระดูก เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ของตับอ่อน ฯลฯ แต่จะไม่รวมเซลล์ส่วนที่จะเจริญไปเป็นรก

Embryonic stem cells ที่ใช้นำมาจากคลินิกผู้มีบุตรยากโดยเป็นตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมเทียมภายนอกมดลูกจากการนำไข่มาผสมอสุจิในหลอดแก้ว In vitro fertilization (IVF) โดยแพทย์จะคัดไข่ออก 5-15 ใบจากรังไข่ ถ้าผสมสำเร็จมากกว่า 1 ใบ แพทย์จะเลือกใบที่ดีที่สุดนำเอาไปปลูกในผนังมดลูก ส่วนใบที่ผสมสำเร็จที่เหลือ สามารถนำส่วน inner cell mass มาเป็น embryonic stem cell line ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนไปเรื่อยๆ และยังสามารถเหนี่ยวนำให้พัฒนาไปเป็นอวัยวะมนุษย์เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามยังเป็นเรื่องผิดจริยธรรม เนื่องจาก

การนำ inner cell mass ออกมาเป็นการทำลายชีวิต เพราะเป็นการตัดโอกาสที่ไข่จะเจริญไปเป็นมนุษย์



ภาพที่ 2.2 แสดงEmbryonic stem cells จากระยะตั้งแต่การปฏิสนธิจนกลายเป็น blastocyst

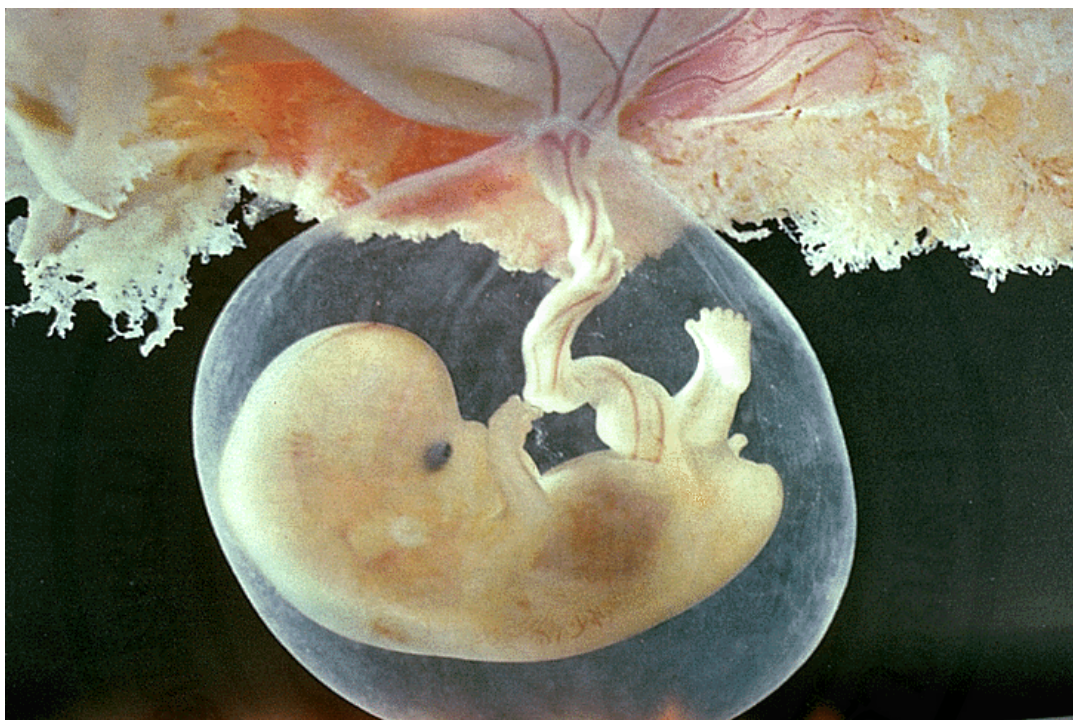
3.2 ระยะทารกในครรภ์ (Fetus)

เซลล์ต้นกำเนิดระยะนี้ได้มาจากทารกในครรภ์ เมื่อมีอายุประมาณ 8 สัปดาห์ซึ่งกำลังมีการแบ่งเซลล์และพัฒนาตัวเองให้เป็นอวัยวะต่างๆที่สมบูรณ์ทุกอย่างก่อนจะคลอด ในระยะนี้ทารกจะมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลาและมีการหลุดลอกของเซลล์ (shedding of cells) อยู่ตลอด จึงสามารถพบ germ cells ทั้ง 3 ชนิดในน้ำคร่ำ เรียก fetal stem cells

Fetal stem cells มีความสามารถคล้าย Embryonic stem cells มาก คือเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่คล้ายจะมีคุณสมบัติเป็น pluripotent (สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆเกือบทุกชนิด) ร่วมกับคุณสมบัติ Multipotent (สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆได้บางชนิดเฉพาะที่อยู่ใน germ

layer เดียวกัน) Fetal stem cells ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม Adult stem cells เนื่องจากทารกได้พัฒนาอวัยวะสมบูรณ์ไปแล้ว

เซลล์ต้นกำเนิดจากทารกในครรภ์ สามารถเก็บได้จาก 3 แหล่งคือ จากเลือดสายสะดือ (umbilical cord stem cells) จากรก (Placenta stem cells) และจากน้ำคร่ำ (Amniotic fluid - derived stem cells)



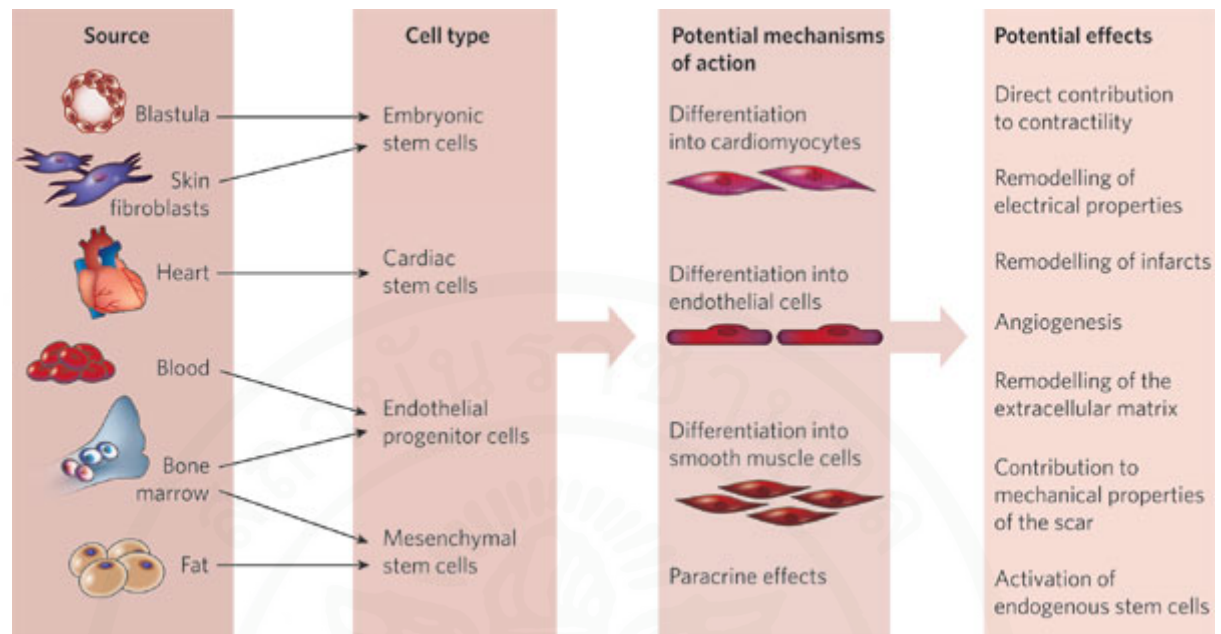
ภาพที่ 2.3 แสดงภาพทารกในครรภ์

3.3 ระยะผู้ใหญ่เต็มวัย (Adult)

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ได้มาจากร่างกายมนุษย์หลังจากได้คลอดออกมาสู่โลกภายนอก (post natal stage) มีความสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่จำกัด สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่อยู่ใน germ layer เดียวกันได้ แต่การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชั้น layer ก่อนข้างยากสามารถพบได้ในไขกระดูก เลือด ผิวหนัง ตับ ฯลฯ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Somatic stem cells หรือ tissue specific stem cells

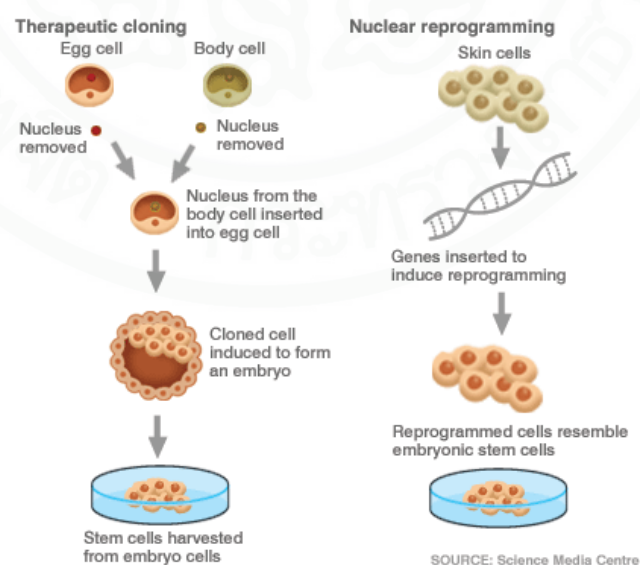
Adult stem cells สามารถนำมาได้จากหลายแหล่ง เช่น จากการเจาะและดูดไขกระดูก (bone marrow – derived mesenchymal stem cells) จากการผ่าตัดดูดไขมัน (Adipose –

derived stem cells) จากเลือด (peripheral blood – derived stem cells) จากผิวหนัง (skin derived stem cells) และจากหัวใจ (cardiac stem cells) เป็นต้น



ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างของแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดในร่างกาย

ปัจจุบัน มีการนำ Adult stem cells มาเปลี่ยนให้เป็น Embryonic stem cells โดยการทำ nuclear programming ได้ออกมาเป็น Induced pluripotent stem cells (iPS)



ภาพที่ 2.5 การทำ Induced pluripotent stem cells (iPS)

4.การใช้เซลล์ต้นกำเนิดในทางพันธุกรรม¹²

งานวิจัยในการใช้เซลล์ต้นกำเนิดในทางพันธุกรรมได้แก่

4.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อสร้างอวัยวะในช่องปากและใบหน้า (Organ tissue engineering)

เพื่อแก้ปัญหาความพิการ ผิดรูปหรือการสูญเสียการทำหน้าที่ของอวัยวะบริเวณช่องปากและใบหน้าอันเกิดจากการติดเชื้อ การได้รับอุบัติเหตุ ความพิการแต่กำเนิดและโรคมะเร็ง การผ่าตัดโดยใช้เนื้อเยื่อของผู้ป่วยเองมักพบปัญหาปริมาณเนื้อเยื่อไม่เพียงพอและมีความเสี่ยงสูงจากการผ่าตัดใหญ่ จึงมีความคิดสร้างเนื้อเยื่อทดแทนโดยกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิด โครงสร้างแบบให้เซลล์ยึดเกาะ (scaffold) และ signaling molecules เช่น การสร้างข้อต่อขากรรไกร (mandibular condyle reconstruction) เป็นต้น

4.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อสร้างฟันทั้งซี่ (tooth organogenesis)^{13,14,15,16}

4.3 วิศวกรรมการสร้างเสริมอวัยวะบางส่วนหรือเพื่อทดแทนบางส่วน (Tissue engineering) ได้แก่ การสร้าง Periodontal complex ซึ่งประกอบด้วย cementum, periodontal ligament¹⁷ และ/หรือส่วนของ alveolar bone¹⁸ การปลูกกระดูกในช่องปาก¹⁹ และการปลูกเนื้อเยื่ออ่อนในช่องปาก²⁰ และการสร้าง dentin/pulp tissue²¹ เป็นต้น

4.4 การซ่อมแซมเนื้อเยื่อของฟัน (dental tissue regenerative therapy) เช่น การทำ dentine regeneration²² periodontal ligament regeneration²³ และ dental pulp regeneration²¹ ซึ่งใช้วิธีการนำเซลล์ต้นกำเนิดใส่เข้าไปในโพรงประสาทฟัน เพื่อหวังผลให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน

4.5 การนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้เสริมประสิทธิภาพของรากเทียมโดยการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาเคลือบบนผิวรากเทียม²⁴

5. แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน¹²

5.1 เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันแท้ (dental pulp stem cells; DPSCs)

ใส่งานวิจัยการพบเซลล์ต้นกำเนิดในโพรงประสาทฟันที่สามารถพัฒนาไปเป็นเนื้อฟัน กระดูก ไขมัน และเซลล์ประสาท การจัดเก็บ มักได้มาจากฟันคุด หรือฟันที่ต้องทำการถอนเพื่อประโยชน์ในการจัดฟัน

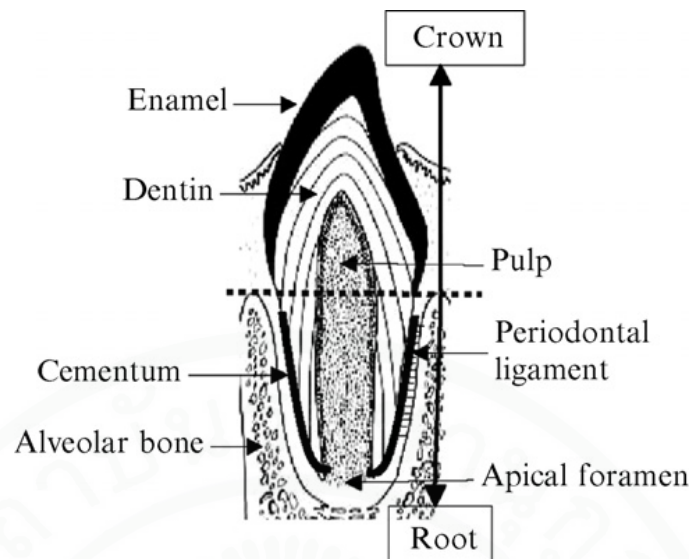
5.2 เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนม (stem cells from human exfoliated deciduous teeth ; SHED) การจัดเก็บจะได้มาจากฟันน้ำนมที่หลุดเองตามธรรมชาติ

5.3 เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อปริทันต์ (Periodontal ligament stem cells ; PDLSCs) การจัดเก็บจะได้มาจากฟันคุด หรือฟันที่ต้องทำการถอนเพื่อประโยชน์ในการจัดฟัน

5.4 เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายราก (stem cells from apical part ; SCAP) การจัดเก็บ มักได้มาจากฟันคุด หรือฟันที่ต้องทำการถอนเพื่อประโยชน์ในการจัดฟัน

5.5 เซลล์ต้นกำเนิดจากถุงน้ำหุ้มฟัน (dental follicle stem cells ; DFSC) การจัดเก็บ มักได้มาจากฟันคุดที่ยังไม่ขึ้นและยังมีถุงน้ำหุ้มฟันอยู่

ในส่วนของกระดูกเบ้าฟัน มีส่วนของกระดูกพรุน (spongy bone) ซึ่งเป็นส่วนที่มีไขกระดูก จึงน่าจะสามารถพบเซลล์ต้นกำเนิดได้เช่นกัน



ภาพที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบของฟัน และกระดูกเบ้าฟัน

6.การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน

6.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน²⁵

โดยการนำฟันกรามซี่ที่สามหรือฟันกรามน้อยที่ถอนออกจากกระดูกเบ้าฟันทั้งซี่ มาขูดเนื้อเยื่อเหงือกออก จากนั้นเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรคเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นผ่าฟัน บริเวณรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) ด้วย high speed diamond fissure bur ปราศจากเชื้อ ที่มีน้ำกลั่น spray เพื่อลดความร้อนให้เป็นรอยบากรอบๆตัวฟัน แล้วดึงเอาเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออก

6.2 การเก็บตัวอย่างกระดูกเบ้าฟันจากกระดูกงอกเกิน (exostosis)

ศึกษาหาในบริเวณที่จะทำการตัดกระดูกจากนั้น เปิดเยื่อหุ้มกระดูก (periostium) ออกแล้วตัดกระดูกงอกเกินออกจากเบ้าฟันด้วย fissure carbide bur และหวักรอคความเร็วต่ำ (straight hand piece) ภายใต้การหล่อเย็น (coolant) ด้วยสารละลาย normal saline solution จากนั้นใช้ sterile forcep คีบเอาเศษกระดูกที่ได้จากการตัดใส่ใน หลอดพลาสติกที่มีสารอาหารเลี้ยงเซลล์

6.3 การแยกเซลล์ต้นกำเนิดออกจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน

ทำได้โดยใช้วิธีการ outgrowth method²⁶ โดยการตัดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ดึงออกจากตัวฟัน และ กระดูกเบ้าฟันชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1x1 มม วางชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันหรือกระดูกเบ้าฟันชิ้น จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dish เป็นระยะห่างเท่าๆกัน ใส่สารอาหาร (media)

ที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละประเภท ใส่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (incubator) ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 100 (100% humidity) และมีปริมาณคาร์บอน ไดออกไซด์ร้อยละ 5 คอยเปลี่ยนสารอาหาร วันเว้นวัน ประมาณ 2-3 วันให้เซลล์จะเจริญออกมา ทำการลอกเซลล์ (trypsin) ไปสู่จานเพาะเลี้ยงใหม่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นที่จานเพาะเลี้ยงเก่า

สำหรับเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันอาจใช้วิธีการ digestion method ²¹ โดยทำการตัดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1x1 มม. และนำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนส ชนิดที่ 1 (type I collagenase) ที่ความเข้มข้น 4 mg/ml (Gibco, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ (low speed rotor)

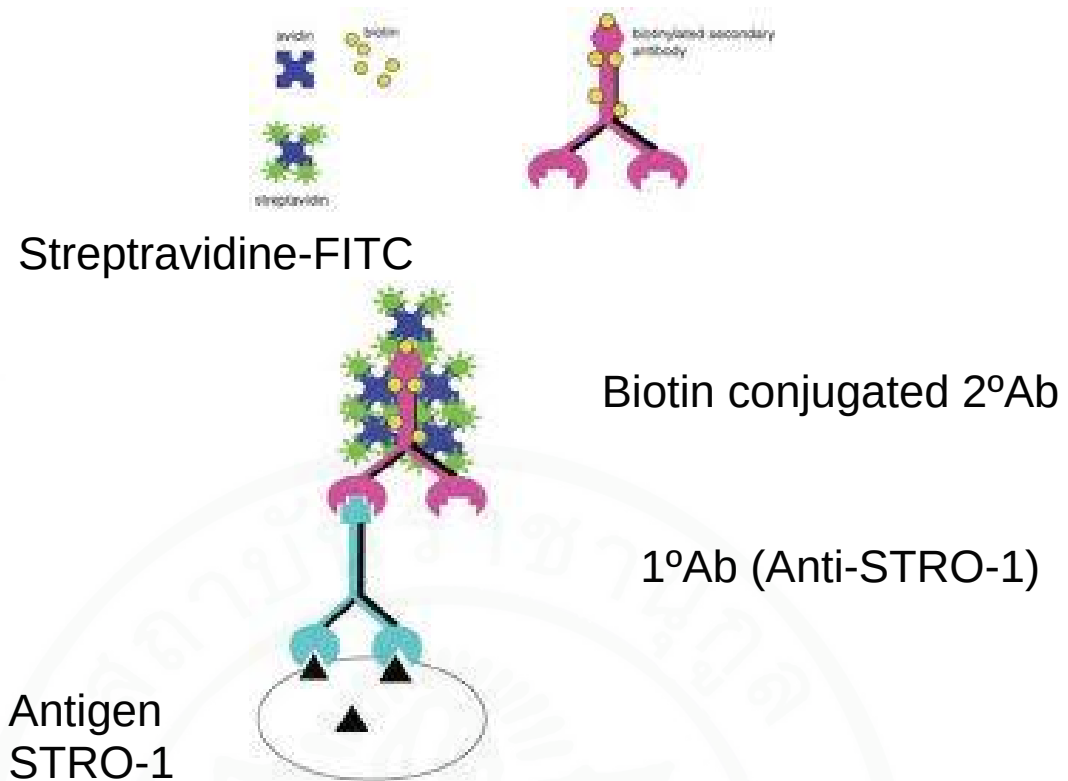
หลังจากย่อยแล้ว จึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และนำ pellet ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 35 มม. ที่มี DMEM ที่มีสารอาหารเลี้ยงเซลล์ ในตู้บออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งเซลล์เติบโตจนเต็มจานเลี้ยง

7.การระบุเซลล์ต้นกำเนิด

สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

7.1 การย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay ²⁵ โดยเลี้ยงเซลล์บน cover slip และใช้ primary antibody ที่สามารถจับกับ antigen บนผิวเซลล์ที่ต้องการตรวจ ไปทำปฏิกิริยากับเซลล์ จากนั้นใช้ secondary antibody ซึ่งมีสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ติดอยู่ไปจับกับ primary antibody อีกครั้งแล้วตรวจดูเซลล์ที่มี antigen ที่ต้องการตรวจด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์

เซลล์ต้นกำเนิดจะมี surface antigen หลายตัว เช่น CD44, CD105 (SH2; endoglin), CD106 (vascular cells adhesion molecule; VCAM-1), CD166, CD29, CD73, (SH3 and SH4), CD90 (Thy-1), CD117, STRO-1 และ Sca-1 โดยจะไม่มี surface antigen ที่เป็นโปรตีนบน hematopoietic precursor และ endothelial cells lineages เช่น CD11b, CD14, CD31, CD33, CD34 และ CD45 นอกจากนี้บนผิวเซลล์ต้นกำเนิดยังมีโปรตีนที่เป็น receptors ที่เกี่ยวข้องกับ matrix และ cell to cell interaction เช่น $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 และ L-selectin ²⁷ แต่ที่เป็น surface antigen หลักที่แสดงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดคือ STRO-1, CD 29 และ CD44 ²⁵



ภาพที่ 2.7 แสดงหลักการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay

7.2 การตรวจด้วยวิธี flow cytometry ⁷ โดยมีหลักการเช่นเดียวกับการย้อมด้วยวิธี

Immunofluorescence assay แต่ต่างไปโดยใช้เครื่อง flow cytometry วัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแอนติบอดีที่จับกับเซลล์ที่มี stem cell marker ที่ต้องการตรวจ วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เซลล์จำนวนมาก(อย่างน้อย 10^6 เซลล์) และเครื่อง flow cytometry ราคาสูงมาก มีค่าใช้จ่ายในการตรวจสูง และเซลล์ที่ผ่านการคัดแยกแล้วไม่สามารถนำกลับมาใช้งานได้

7.3 การตรวจหา expression ของ stem cell markers ด้วยวิธีการ RT-PCR ²⁵

โดยการนำเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้ มาสกัด RNA นำ RNA จากแต่ละตัวอย่างไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปเตส (reverse transcriptase, RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA) แล้วขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์แทคโพลิเมอเรส (Taq polymerase) และไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ mRNA ของ marker ที่เราสนใจตรวจ ซึ่งในงานวิจัยนี้ ใช้ stem cell marker CD29 และ CD44

การวิจัยนี้ เป็นการการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้ใหญ่ (adult stem cells) จากโพรงประสาทฟันและกระดูกเข่าฟัน และระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยวิธีการ Immunofluorescence assay ในการตรวจหา surface antigen Stro-1 และวิธีการ RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ mRNA ของ CD29 และ CD44

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

รูปแบบการวิจัย เป็นการวิจัยแบบพรรณนา(descriptive study) การวิจัยนี้เป็นการวิจัยนอกร่างกายมนุษย์ (*ex vivo study*) ซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันราชานุกูลแล้ว

1.ผู้เข้าร่วมการวิจัย

หลักเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมในงานวิจัย

1.เป็นผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ ยาสเตียรอยด์ และ/หรือยากภูมิคุ้มกัน ก่อนเข้าร่วมการวิจัยเป็นเวลา 3 เดือน

2. ต้องการรับการรักษาทางทันตกรรมด้วยการถอนฟันกรามซี่ที่สามหรือฟันกรามน้อยด้วยเหตุผลในการจัดฟัน ที่สถาบันราชานุกูล หรือที่โรงพยาบาลสงฆ์ หรือ ต้องการรับการรักษาทางทันตกรรมด้วยการตัดปุ่มกระดูกเบ้าฟันส่วนที่งอกเกินด้วยเหตุผลในการใส่ฟันปลอมที่ โรงพยาบาลสงฆ์ ในช่วงเวลาที่ดำเนินการวิจัย

2.การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน

2.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน²⁵

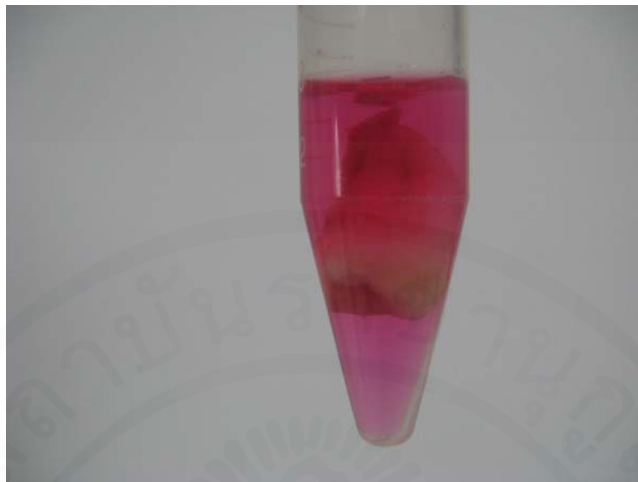
2.1.1 นำฟันกรามซี่ที่สามหรือฟันกรามน้อยที่ถอนออกจากกระดูกเบ้าฟันทั้งซี่ มาชุบน้ำเกลือเหวี่ยงออกด้วยใบมีดผ่าตัดเบอร์ 15 จากนั้นเช็ดด้วยโพวิโดไอโอดีนเป็นเวลา 2 นาที แล้วเช็ดด้วย 70 % เอทานอล เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย

2.1.2 ฟันบริเวณรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) ด้วย high speed diamond fissure bur ปราศจากเชื้อ ที่มีน้ำกลั่น spray เพื่อลดความร้อนให้เป็นรอยบากรอบๆตัวฟัน



ภาพที่ 3.1 แสดงการผ่าฟันบริเวณรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน ด้วย high speed diamond fissure bur

2.1.3 นำฟันใส่หลอดพลาสติกขนาด 15 ml. ที่มี culture media (10% FBS in DMEM) เพื่อนำไปแยกเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่3.2 แสดงการนำตัวอย่างฟันไปยังห้องปฏิบัติการ

2.2 การเก็บตัวอย่างกระดูกเบ้าฟันจากกระดูกงอกเกิน (exostosis)

ศึกษาหาบริเวณที่จะทำการตัดกระดูกจากนั้น เปิดเยื่อหุ้มกระดูก (periostium) ออกแล้วตัดกระดูกงอกเกินออกจากเบ้าฟันด้วย fissure carbide bur และหัวกรอความเร็วต่ำ (straight hand piece) ภายใต้การหล่อเย็น (coolant) ด้วยสารละลาย normal saline solution จากนั้นใช้ sterile forcep คีบเอาเศษกระดูกที่ได้จากการตัดใส่ใน หลอดพลาสติกขนาด 15 ml. ที่มี culture media (20% FBS in DMEM)

3.การแยกเซลล์ต้นกำเนิดออกจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน

เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันใช้วิธี Out growth method ²⁶

3.1 การแยกเซลล์ต้นกำเนิดออกจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน

3.1.1 ล้างฟันตัวอย่างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 ครั้ง

3.1.2 ล้างฟันตัวอย่างด้วยสารละลาย culture media (DMEM) 1 ครั้ง

3.1.3 ใช้เครื่องมือไม่มีคมใส่ระหว่างรอยบากบนตัวฟันแล้วบิดให้ตัวฟันแตกออก

จากกันตรรรอยบาก แล้วใช้ sterile endodontic spoon ดักเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออกใส่ glass dish



ภาพที่ 3.3 แสดงการใช้เครื่องมือไม่มีคมใส่ระหว่างรอยบากบนตัวฟันแล้วบิดให้ตัวฟันแตกออก



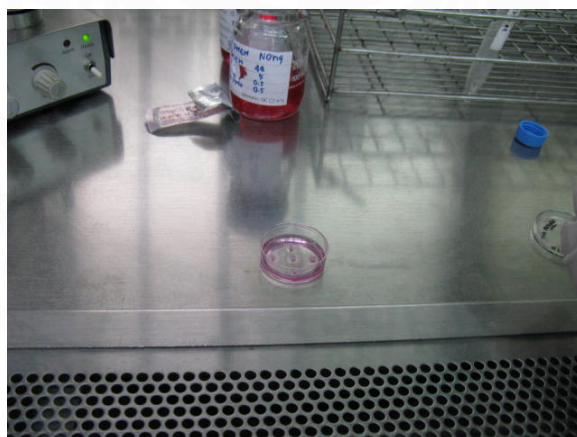
ภาพที่ 3.4 แสดงการใช้ Endodontic spoon ดักเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออก

3.1.4 หั่นชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด
ประมาณ 1x1x1 มิลลิเมตร ด้วย sterile blade



ภาพที่ 3.5 แสดงการใช้ไบโอมัดผ่าตัดหั่นชิ้นโพรงประสาทฟันเป็นชิ้นเล็กๆ

3.1.5 วางชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเข้าฟัน จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dish (Corning Incorporated) เป็นระยะห่างเท่าๆกัน



ภาพที่ 3.6 แสดงการวางชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dish เป็นระยะห่างเท่าๆกัน

3.1.6 ใส่ culture media ซึ่งประกอบด้วย

- 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen: Gibco)
- [Dulbecco's Modified Eagle Medium](#) high glucose (DMEM; Invitrogen: Gibco)
- 1% Antibiotics anti- mycotics (contain 10,000 unit of penicillin (base), 10,000 µg of streptomycin (base) and 25 µg of amphotericin B/ml utilizing Penicillin G (sodium salt) streptomycin sulfate, amphotericin B in 0.85% saline (Invitrogen: Gibco)
- 1% L – Glutamine (Glutamax-I supplement; Invitrogen: Gibco)

3.1.7 นำ culture dish ใส่ตู้ incubator 37 °C 5% carbon dioxide 100 % humidity

3.1.8 เปลี่ยน culture media วันเว้นวัน

3.2 การแยกเซลล์ต้นกำเนิดออกจากกระดูกเบ้าฟัน

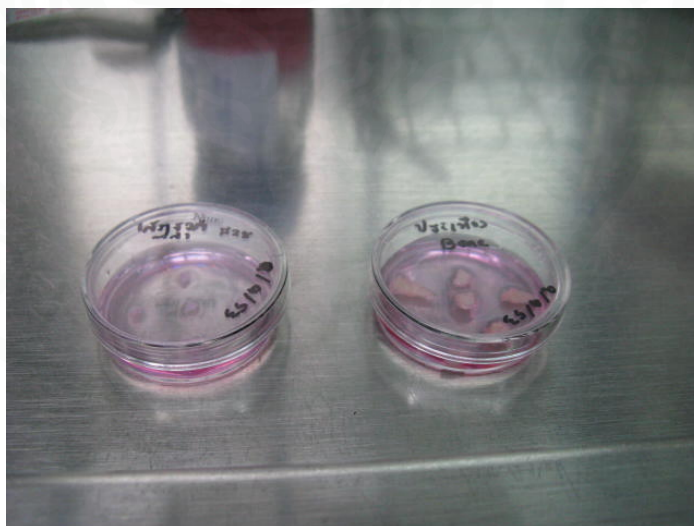
3.2.1 ล้างกระดูกเบ้าฟันตัวอย่างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 ครั้ง

3.2.2 ล้างกระดูกเบ้าฟันตัวอย่างด้วยสารละลาย culture media (DMEM) 1 ครั้ง

3.2.3 หั่นกระดูกเบ้าฟันเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1x1 มิลลิเมตร ด้วย sterile blade

3.2.4 วางชิ้นกระดูกเบ้าฟัน จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dish (Corning Incorporated)

เป็นระยะห่างเท่าๆกัน



ภาพที่ 3.7 แสดงการวางชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน จำนวน 3-5 ชิ้นลงใน 35 mm culture dish เป็นระยะห่างเท่าๆกัน

3.2.5 ใส่ culture media ซึ่งเป็น 20% FBS in DMEM (ส่วนประกอบเหมือน culture media ของโพรงประสาทฟัน)

3.2.6 นำ culture dish ใส่ตู้ incubator 37 °C 5% carbon dioxide 100 % humidity

3.2.7 เปลี่ยน culture media วันเว้นวัน

4.การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เมื่อเวลาผ่านไป 2-3 วัน จะพบเซลล์เริ่มงอกออกจากชิ้นเนื้อ โดยมีลักษณะเป็น cuboidal shape และ spindle shape

รอให้เซลล์งอกออกมาจากเนื้อเยื่อโครงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันจนเต็มพื้นที่ 35 mm culture dish (ใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์) โดยดูว่าเซลล์ไม่เบียดกันมากเกินไป แล้วจึง ถ่ายเซลล์ (Trypsinization) ออกมาใส่ 60 mm culture dish โดยมีขั้นตอนดังนี้²⁸

1. ดูด culture media ออกจาก culture dish
2. ล้างเซลล์ใน culture dish ด้วยสารละลาย PBS
3. ใส่สารละลาย 0.5% Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) warm พอต้มเซลล์

อบ culture dish ในตู้ incubator 37 °C ประมาณ 5 นาที

4. ต่อกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์เริ่มมีการหลุดเป็นเซลล์รูปร่างกลมให้ดูดสารละลาย 0.5% EDTA ออก

5. นำ culture media ที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดมาทำการ flush เพื่อชะล้างเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของ culture dish

6. ดูด culture media ที่มีเซลล์ลอยอยู่จำนวน 1 ml. ใส่ 60 mm culture dish

7. นำ culture dish ใส่ตู้ incubator 37 °C 5% carbon dioxide 100 % humidity

8. ใส่ culture media ประมาณ 4 ml. ในวันรุ่งขึ้นเมื่อสังเกตพบว่าเซลล์เกาะพื้นผิวแล้ว (เหยียดกลับไปเป็นรูป spindle shape)

9. เปลี่ยน culture media วันเว้นวัน

10. แยกเซลล์ออกมาใส่ 60 mm culture dish ใบใหม่ตามขั้นตอนข้อ 1-9 เมื่อพบว่าเซลล์เจริญเต็มพื้นที่และไม่เบียดกันมากเกินไป



ภาพที่ 3.8 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 5 วัน(กำลังขยาย200)

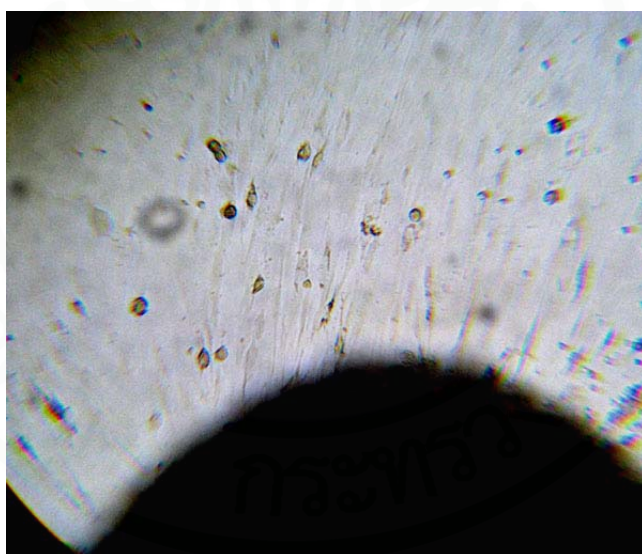
ลักษณะของเซลล์ที่งอกออกมาจะเป็นลักษณะ round หรือ cuboidal shape ก่อนที่จะยืดเป็น spindle shape



ภาพที่ 3.9 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน(กำลังขยาย40)

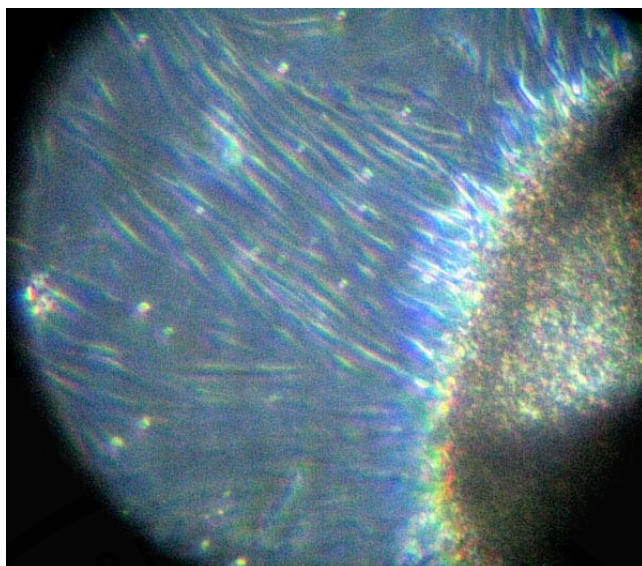


ภาพที่ 3.10 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน(กำลังขยาย100)



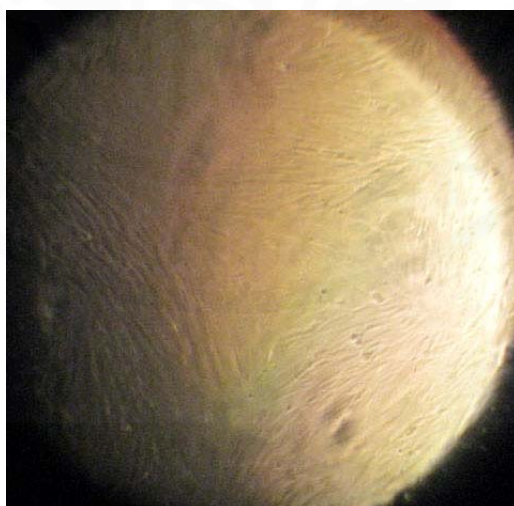
ภาพที่ 3.11 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน(กำลังขยาย200)

เซลล์ที่งอกออกมาส่วนใหญ่จะมีรูปร่าง spindle shape ดังภาพที่ 3.12



ภาพที่ 3.12 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่งอกออกมาจากชิ้นเนื้อที่เพาะเลี้ยงประมาณ 9 วัน phase contrast (กำลังขยาย 200)

ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเนื้อเยื่อทั้งจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันจะมีลักษณะเป็นกลุ่มๆ ดังภาพ 3.13



ภาพที่ 3.13 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่เจริญเป็นกลุ่มๆ

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเต็มจานเพาะเลี้ยงให้ทำการถ่ายเซลล์ไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยเซลล์จากจานเลี้ยงเดิม 1 จานจะทำการถ่ายไปสู่จานเลี้ยงใหม่ 3 จาน

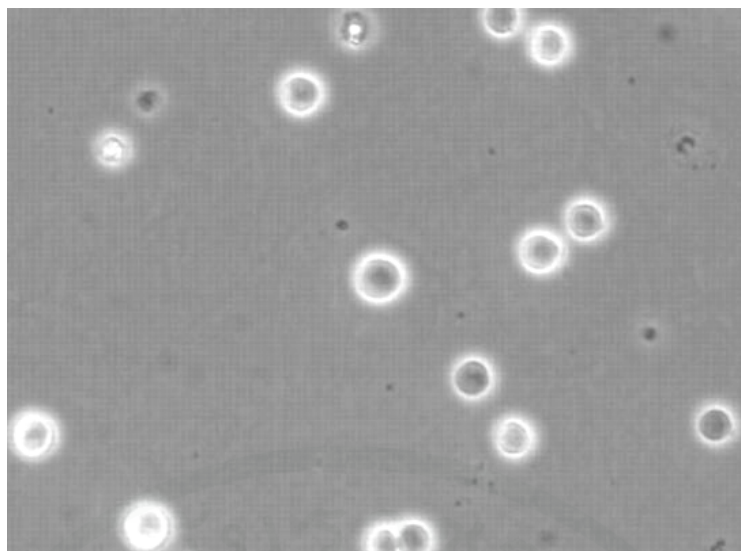


ภาพที่ 3.14 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่เจริญจนสามารถทำการถ่ายเซลล์ได้

หากไม่ทำการ ถ่ายเซลล์เซลล์จะเบียดแน่นและจะยึดเกาะแน่นกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง ทำให้ การ ถ่ายเซลล์ทำได้ยาก อัตราการตายจะเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 3.15 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่ปล่อยยให้เจริญนานเกินจนไม่สามารถทำการ ถ่ายเซลล์ ได้



ภาพที่ 3.16 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดที่หัดตัวในขณะที่ทำการ ถ่ายเซลล์

5.การระบุเซลล์ต้นกำเนิด ทำโดย การย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay²⁵ เพื่อดูการแสดงออกของ STRO-1 marker และการทำ RT-PCR เพื่อดูการแสดงออกของ CD 29 และ CD 44 surface markers

5.1 การย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay²⁵

5.1.1 การเตรียม Cover slip (Menzel-Glaser: Greman)

5.1.1.1 นำ Cover slip มาใส่ในก๊อช แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการอบไอน้ำ (autoclave)

5.1.1.2 ใช้ forcep หนีบ Cover slip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาใส่ใน 12 well plate

(Corning: USA)

5.1.1.3 ล้างด้วย autoclaved de-ionize water (DI) 2 ครั้ง

5.1.1.4 ล้างด้วย autoclaved PBS 1 ครั้ง

5.1.2 การ plate เซลล์ลงไปบน Cover slip

5.1.2.1 ทำการถ่ายเซลล์ ออกจาก culture dish

5.1.2.2 นับเซลล์ด้วย hemocytometer แล้วคำนวณหาปริมาตร ที่จะทำให้ได้เซลล์

จำนวน 70,000 เซลล์

5.1.2.3 Plate เซลล์จำนวน 70,000 เซลล์ลงไปบน Cover slip ที่เตรียมไว้

5.1.2.4 นำเซลล์ที่ Plate ลงไปบน Cover slip เข้าตู้ incubator 37 °C 5% carbon dioxide 100 % humidity ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ Cover slip

5.1.3 การ Fix เซลล์

5.1.3.1 ใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูเซลล์บน Cover slip ว่ามีการเหยียดตัวและเจริญทั่ว Cover slip โดยไม่เบียดกัน

5.1.3.2 ดู culture media ออกจาก 12 well plate

5.1.3.3 ล้างเซลล์บน Cover slip ด้วย autoclaved PBS 2 ครั้ง

5.1.3.4 ใส่ cold methanol (-30°C) ลงใน 12 well plate ทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วดูดทิ้ง

5.1.3.5 ล้างเซลล์บน Cover slip ด้วย autoclave PBS อีก 2 ครั้ง

5.1.3.6 ใส่สารละลาย autoclaved PBS เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนถึงเวลาข้อม (ไม่ควรมากเกิน 1 เดือน)

5.1.4 การข้อม Immunofluorescence ²⁹

5.1.4.1 เก็บ cover slip ที่มีเซลล์ของกลุ่มตัวอย่างจำนวน 2 อันออกจาก 12 well plate เพื่อนำมาใช้เป็น control และ test cover slip

5.1.4.2 หยด สารละลาย 10% FBS in PBS ลงบน control และ test cover slip ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อ block non specific antigen

5.1.4.3 หยด 1° antibody (mouse anti stro-1 monoclonal antibody: MAB 4315; Chemicon international USA.) ในสารละลาย 10% FBS in PBS ความเข้มข้น 1:100 จำนวน 100 μL ลงบน test cover slip ให้ทั่ว ส่วน control cover slip ให้สารละลาย 10% FBS in PBS ในปริมาณเท่ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด over night

5.1.4.4 ล้าง cover slip ทั้งสองด้วยสารละลาย PBS บนเครื่องสั่น (shaker) นาน 5 นาที 3 ครั้ง

5.1.4.5 หยด 2° antibody (Goat anti mouse IgG Biotin conjugated affinity purified antibody; AP124B; Chemicon international USA.) ในสารละลาย 10% FBS in PBS ความเข้มข้น 1:500 จำนวน 100 μL ลงบน test และ control cover slip ทิ้งไว้ในที่มืด 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5.1.4.6 ล้าง cover slip ด้วยสารละลาย PBS บนเครื่องสั่น (shaker) นาน 5 นาที 3 ครั้ง

5.1.4.7 หยด Strep FITC (Goat anti mouse IgG Biotin conjugated affinity purified antibody; S 3762; Sigma Aldrich.) ในสารละลาย 10% FBS in PBS ความเข้มข้น 1:500 จำนวน 100 μL ลงบน test และ control cover slip ทิ้งไว้ในที่มืด 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5.1.4.8 ล้าง cover slip ด้วยสารละลาย PBS บนเครื่องสั่น (shaker) นาน 5 นาที 3 ครั้ง

5.1.4.9 หยด DAPI working solution (Dilution 1:1000) จำนวน 10 μL ลงบน cover slip ด้านที่มีเซลล์ แล้วคว่ำลงบน glass slide ห่อด้วยกระดาษฟอยล์ เตรียมนำไปตรวจดูเซลล์ที่มีการ express stro-1 antigen ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Applied spectral imaging: USA)

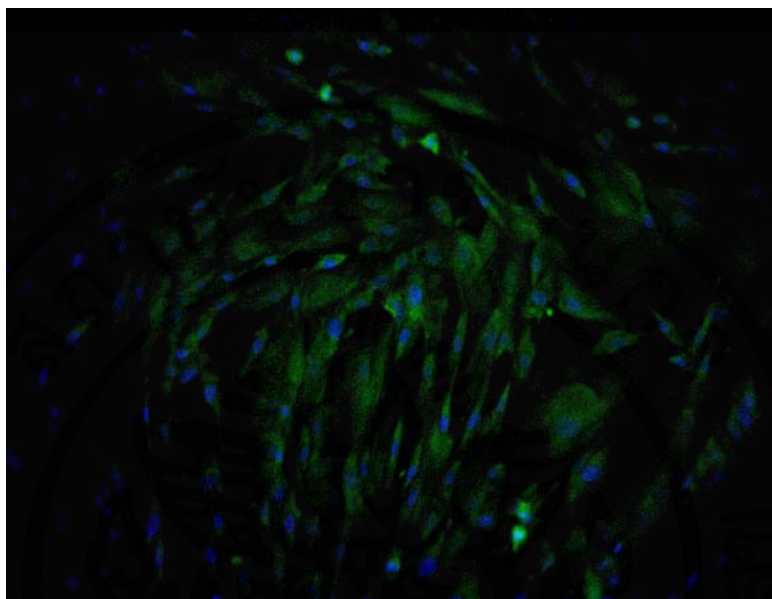
5.2 การตรวจการ express stro-1 antigen ²⁶

5.2.1 การตรวจการ express stro-1 antigen

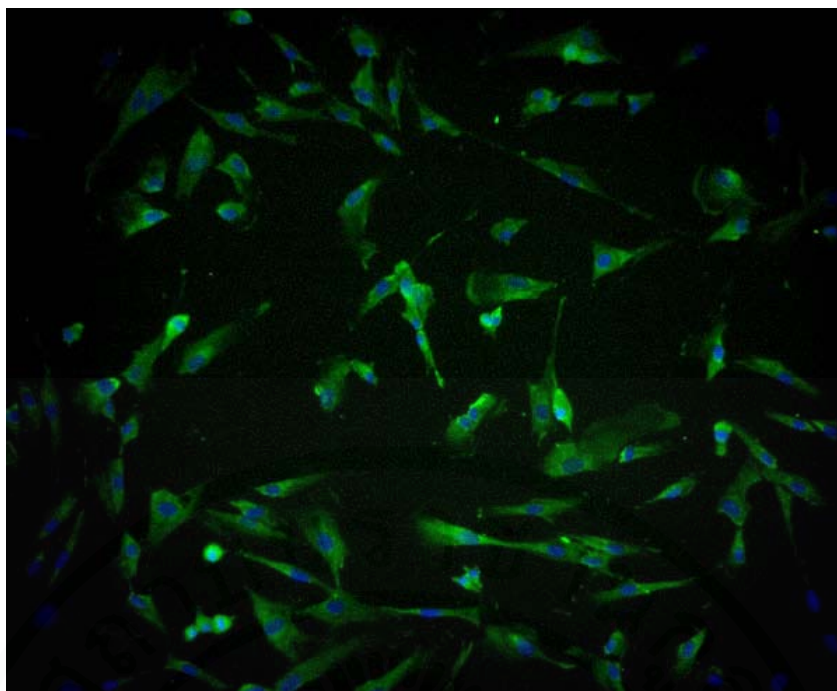
5.2.1.1 นำสไลด์ออกจากตู้เย็นมาส่องด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

5.2.1.2 ตรวจ cover slip ที่เป็น control และ test ที่กำลังขยาย 100 เท่า

cover slip ที่เป็น control จะไม่ปรากฏสัญญาณเรืองแสงสีเขียว ขณะที่ cover slip ที่เป็น test จะปรากฏสัญญาณเรืองแสงสีเขียวบริเวณ cytoplasm ดังภาพ 3.17-3.18



ภาพที่ 3.17 แสดงเซลล์ที่เชื่อม Immunofluorescence ที่เป็น control



ภาพที่ 3.18 แสดงเซลล์ที่เชื่อม Immunofluorescence ที่เป็น Test

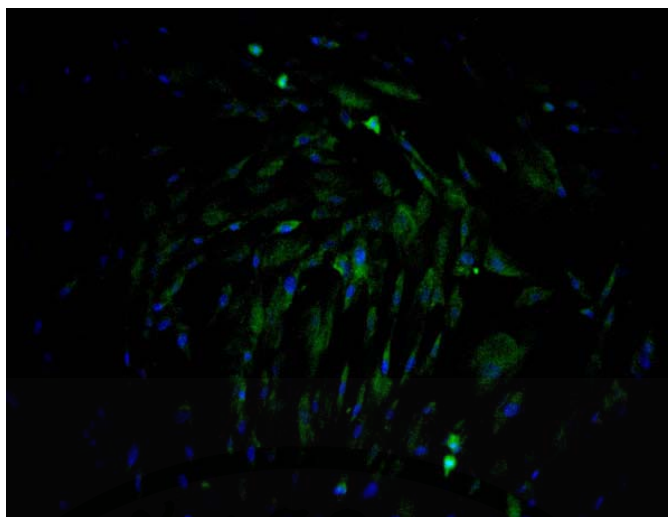
5.2.2 การหาค่าสัดส่วนเซลล์ที่ express STRO-1 ต่อเซลล์ทั้งหมด³⁰

5.2.2.1 เลือกพื้นที่บริเวณที่เซลล์ที่ express STRO-1 แบบสุ่มจำนวน 3 บริเวณที่

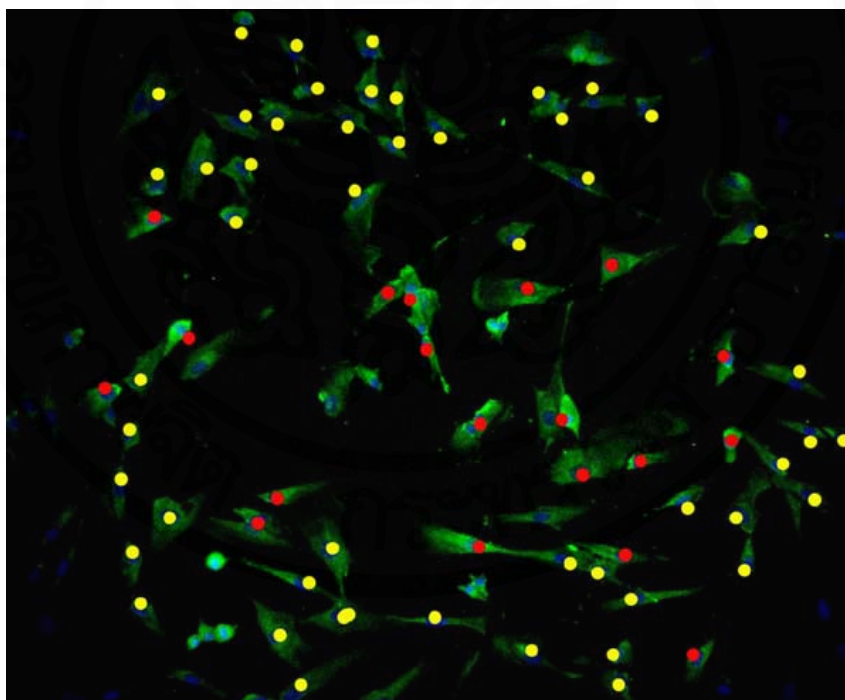
กำลังขยาย 100 เท่า

5.2.2.2 ถ่ายภาพใน mode DAPI และ FITC แล้วนำภาพมาซ้อนกัน

5.2.2.3 บันทึกภาพนั้นออกมานับเซลล์ที่ express STRO-1 และเซลล์ทั้งหมดในบริเวณนั้น ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop



ภาพที่ 3.19 แสดงเซลล์ที่ย้อม Immunofluorescence ที่เป็น control เพื่อใช้เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ย้อมติด
Immunofluorescence anti Stro-1 ที่เป็น Test



ภาพที่ 3.20 แสดงการนับเซลล์ที่ย้อม Immunofluorescence anti Stro-1 ที่เป็น Test ด้วยโปรแกรม

Adobe Photoshop

จุดสีเหลืองแสดงเซลล์ที่ไม่สามารถย้อมติดด้วย antistro-1 antibody (ไม่express Stro-1)

จุดสีแดงแสดงเซลล์ที่ย้อมติดด้วย antistro-1 antibody (express Stro-1)

5.2.2.4 คำนวณหาค่าสัดส่วนของเซลล์ที่ express STRO-1 ต่อเซลล์ทั้งหมด ของเซลล์ที่ได้จากโพรงประสาทฟันและเซลล์ที่ได้จากกระดูกเบ้าฟัน

5.3 การตรวจการ express CD29 และ CD 44³¹

5.3.1 การสกัด RNA

5.3.1.1 Trypsinize เซลล์ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ดูด culture media ออกจาก culture dish
2. ล้างเซลล์ใน culture dish ด้วยสารละลาย PBS
3. ใส่สารละลาย 0.5% Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) warm พอต่วมเซลล์

อบ culture dish ในตู้ incubator 37 °C ประมาณ 5 นาที

4. ส่องกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์เริ่มมีการหลุดเป็นเซลล์รูปร่างกลมให้ดูดสารละลาย 0.5% EDTA ออก

5. ใส่ culture media ที่ไม่มี serum จำนวน 10 ml แล้ว flush ให้ให้ออกจากพื้นผิวของ culture dish

6. ดูด culture media ที่มีเซลล์ลอยอยู่ใส่ tube 15 ml.

7. นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด

8. ดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งให้เหลือ media 1 ml แล้วนำไปสกัด RNA

5.3.1.2 สกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด RNA extraction kit (Qiagen)³²

ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ดูดเซลล์จาก tube 15 ml. ใส่ลงใน 1.5 ml. eppendoph tube
2. นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 400 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งให้เหลือแต่เซลล์ด้านล่าง (cell pellet)
4. ใส่ 1% β Mercaptan ในสารละลาย RLT จำนวน 600 μ l. ใน cell pellet แล้ว vortex จนใส
5. ดูดสารละลายในข้อ 4 ใส่ลงใน QIA shredder spin column ที่อยู่ใน 2 ml. collection tube นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้ง QIA shredder เก็บส่วนน้ำใส
6. ใส่ 70 % ethanol จำนวน 600 μ l. ลงในน้ำใสในข้อ 5 ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน
7. ดูดสารละลายในข้อ 6 ใส่ลงใน QIA shredder spin column อันใหม่ที่อยู่ใน 2 ml. collection tube นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที
8. ย้าย QIA shredder spin column ในข้อ 7 ไปใส่ใน 2 ml. collection tube อันใหม่ ใส่ สารละลาย Buffer RW1 จำนวน 700 μ l. ลงใน QIA shredder spin column นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที

9.ย้าย QIA shredder spin column ในข้อ 8 ไปใส่ใน 2 ml. collection tube อันใหม่ ใส่ สารละลาย Buffer RPE จำนวน 500 μ l. ลงใน QIA shredder spin column นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที

10.เปิดฝา QIA shredder spin column อย่างระมัดระวัง ใส่ สารละลาย Buffer RPE จำนวน 500 μ l. ลงไป นำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

11.ย้าย QIA shredder spin column ในข้อ 10 ไปใส่ใน 2 ml. collection tube อันใหม่ปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

12.ย้าย QIA shredder spin column ในข้อ 11 ไปใส่ใน 2 ml. collection tube อันใหม่ ใส่ RNase-free water 30 μ l ที่ไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่ QIA shredder spin column และเก็บส่วนน้ำใสไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5.3.2 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุด super script III First –Strand Synthesis System for RT PCR ของ Invitrogen ตามขั้นตอนต่อไปนี้

5.3.2.1 การวัดค่า ความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้โดยใช้ spectrophotometer (Biomate ;Thermo Electron Cooperation)³³

- 1.เลือกโปรแกรมการวัด RNA
- 2.ใส่ deionized water (DI) 100 μ l ใน cuvette ใส่ในเครื่อง กด set blank
- 3.ดูด RNA extraction จำนวน 1 μ l ผสมกับ deionized water (DI) 99 μ l ใส่ ใน cuvette ใส่ในเครื่อง กด measure เครื่องจะให้ค่า Absorption (Abs) ที่ 260 nm. Abs 280 nm, RNA ratio, RNA (μ g/ μ l) และค่า Protein (μ g/ μ l)

4. นำค่า RNA (μ g/ μ l) มาคำนวณหาปริมาณ สารสกัด RNA เพื่อที่จะได้ปริมาณของ RNA 1 μ g

5.3.2.2 การทำ Oligo-dt recipe(RNA/primer mix)³⁴

- 1.ผสม oligo dT primer (50 μ M) จำนวน 1 μ l +dNTP mix (10 μ M) จำนวน 1 μ l
- 2.ใส่ RNA ตามปริมาณที่คำนวณได้เพื่อให้ได้ RNA 1 μ g
- 3.ใส่ DEPC-treated water จำนวน 8 ลบด้วยปริมาณของ RNA ในข้อ 2 เพื่อให้ได้ส่วนผสมทั้งหมด 10 μ l
- 4.นำไปเข้าเครื่อง RT PCR เติมน้ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 11 นาที

5.3.2.3 การทำ cDNA synthesis mix
ผสมสารต่อไปนี้ลงในสารที่ได้จากข้อ 5.3.2.2³⁴

1. RT buffer 10x จำนวน 2 μ l
2. MgCl₂ 25 mM จำนวน 4 μ l
3. DTT 0.1 M จำนวน 2 μ l
4. RNase OUT 400u/ μ l จำนวน 1 μ l
5. Superscript III 200u/ μ l จำนวน 1 μ l

นำไปเข้าเครื่อง RT PCR [Thermal cycler (Bio-rad)]

- Incubate ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที
- หยุดปฏิกิริยาที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- Incubate ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

ปั่นตก แล้วเติม RNase H1 จำนวน 1 µl

นำไปเข้าเครื่อง RT PCR

- Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส หรือนำมาทำ PCR ทันที

5.3.3 การทำ Duplex PCR

5.3.3.1 Primers

CD 29 (Proligo :Sigma; Singapore) 346 bp

Forward: 5'AATGAAGGGCGTGTGGTAG 3 Tm.64 °C

Reverse: 5' CGTTGCTGGCTTCACAAGTA 3 Tm.64 °C

CD 44 (Proligo :Sigma; Singapore) 231 bp

Forward: 5' GCAATGCTTCTCAGACCACA 3 Tm.61 °C

Reverse: 5' CTGGCCAATGTAGTTCACAG 3 Tm.64 °C

mRNA GAPDH (Techdragon ; Hongkong) 84 bp

Forward: 5' AACAGCGACACCCACTCCTC 3 Tm.56.1 °C

Reverse: 5' CATAACCAGGAAATGAGCTTGACAA3 Tm.56.9 °C

5.3.3.2 การทำ Polymerase chain reaction (PCR)

ผสมสารต่อไปนี้ตามความเข้มข้นและปริมาตรที่แสดงไว้ในตาราง

	stock conc	final conc	Volume(µl)
Ultra pure H2O	-	-	15.875
Buffer(Qiagen)+ 15mM MgCl2	10x	1x	2.5
dNTPs (Biolab)	10mM	0.2 mM	0.5
Hotstar Taq (Qiagen)	5 u/1µl	0.625 u	0.125
mRNA GAPDH F	10µM	0.5µM	1.25
mRNA GAPDH R	10µM	0.5µM	1.25
Primer CD29/CD44 F	10µM	0.5µM	1.25
Primer CD29/CD44 R	10µM	0.5µM	1.25
cDNA			1

ปริมาตรรวม

25

นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาดังนี้

- step1 95°C 15 mins initial denaturation
- step2 95°C 1 min cycle denaturation
- step3 55°C 1 min Primer annealing
- step4 72°C 1 min Primer extension
- step5 Go to step 2 34 cycles
- step6 72°C 10 mins substrate clearance
- step7 4°C hold storage

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ จะได้ PCR product เกือบที่ 25 องศาเซลเซียส หรือนำมา run gel ทันที

5.3.4 การทำ Agarose gel electrophoresis ³⁵

5.3.3.3 ทำ 2% agarose gel (USB)

1. ชั่งผง agarose 0.600 g. ใส่ลงใน flask 100 µl
2. ตวง 1xTris Borate EDTA (TBE) 30 µl ใส่ใน flask
3. นำ flask เข้า microwave ตั้งเวลา 1 นาที
4. นำ flask ออกจาก microwave สังเกตดูว่าสารละลาย agarose ใสเป็นเนื้อเดียวกัน
5. นำ flask ไปผ่านน้ำก๊อกเพื่อลดอุณหภูมิของสารละลาย agarose
6. หยด ethidium bromide (10 mg/ml) จำนวน 5 µl ลงไปในสารละลาย agarose แกว่งให้เข้ากัน
7. เทสารละลายในข้อ 6 ลงในถาดเจลที่มี ซี่พลาสติก (comb) เสียบอยู่
8. ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัว

5.3.3.5 การ run gel ³⁶

1. ค้าง comb ออกจากเจลที่แข็งตัวแล้วอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
2. นำถาดเจลออกมาใส่ Electrophoretic chamber (Amersham) ที่มีสารละลาย 1xTBE ท่วมเจล
3. ใส่สารละลาย 100 bp marker ที่ผสม loading dye (bromophenol blue) (Sigma B8026) ลงใน well ที่ 1
4. ใส่ PCR product 5 µl+ loading dye 2 µl ในแต่ละ well
5. well สุดท้ายใส่ 100 bp marker
6. ปิดฝาทank
7. เปิดเครื่อง Electrophoretic power supply (Amersham) ตั้งค่าความต่างศักย์ 69 volt กระแสไฟ 2

ampere เป็นเวลา 90 นาที

8. ปิดเครื่อง Electrophoretic power supply เมื่อสิ้นสุดกระบวนการในข้อ 7
9. นำเจลที่ผ่านกระบวนการ run gel ไปเข้าตู้ที่มีแสงอัลตราไวโอเลต [Gel Doc (Syngene)]
10. อ่านค่าและถ่ายภาพ PCR product ที่ได้ด้วยโปรแกรม Gene Snap (G Box :Bioimaging systems)

5.4 การอ่านค่าการแสดงออกของ CD29/CD44

5.4.1 โดยการดูความสว่างของแถบ PCR product

เนื่องจากได้ทำการควบคุมปริมาณ RNA ตั้งต้นที่นำมาสังเคราะห์เป็น cDNA และใช้ cDNA ในการทำ PCR เท่ากันในทุกตัวอย่างจึงสามารถเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ CD29/CD44 ของตัวอย่างแต่ละคนได้ (semiquantitative RT-PCR)³¹

5.4.2 โดยการโปรแกรม Scion Image วัด relative expression ระหว่าง CD29/CD44 กับ

GAPDH

การวิเคราะห์ผล

1. ดูสัดส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่มี STRO-1 expression ที่ต้องการตรวจต่อเซลล์ทั้งหมดจากการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence และเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟันกับจากกระดูกเบ้าฟันด้วยสถิติ Mann Withney U test

2. เปรียบเทียบการแสดงออกของ surface marker CD 29 และ CD 44 จากการทำ RT-PCR

บทที่ 4 ผลการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน ได้ดำเนินการใน
ปีงบประมาณ 2552 และต่อเนื่องมาในปีงบประมาณ 2553 ดังนี้

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

จำนวนตัวอย่างในการเก็บฟันกรามซี่ที่สาม ฟันกรามน้อยและกระดูกเบ้าฟันมีจำนวนทั้งสิ้น 87 ตัวอย่าง
โดยเป็นตัวอย่างจากฟัน 76 ซี่ และตัวอย่างจากกระดูกเบ้าฟัน 11 ซี่ สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดที่ศูนย์วิจัยพันธุ
ศาสตร์ สถาบันราชานุกูล ได้ 18 และ 4 ตัวอย่างตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 รายละเอียดของการเก็บตัวอย่างฟันกรามซี่ที่สาม ฟันกรามน้อยและกระดูกเบ้าฟันปีงบประมาณ
2552

	ต.ค.- ธ.ค.51		ม.ค.-มี.ค.52		เม.ย.- มิ.ย.52		ก.ค.-ก.ย.52		รวม	
	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์
จำนวนฟัน (ซี่)	16	5	24	0	7	0	3	0	50	5
จำนวนกระดูก (ชิ้น)	4	1	3	2	1	0	2	0	10	3

ตารางที่ 4.2 รายละเอียดของการเก็บตัวอย่างฟันกรามซี่ที่สาม ฟันกรามน้อยและกระดูกเบ้าฟันปีงบประมาณ
2553

	ต.ค.- ธ.ค.52		ม.ค.-มี.ค.53		เม.ย.- มิ.ย.53		ก.ค.-ก.ย.53		รวม	
	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์	เก็บ	ได้ เซลล์
จำนวนฟัน (ซี่)	25	12	1	1	0	0	0	0	26	13
จำนวนกระดูก (ชิ้น)	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1

ในตัวอย่างฟันกรามซี่ที่สามและฟันกรามน้อยที่แยกเซลล์ต้นกำเนิดได้สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ 7 ตัวอย่าง
และ 3 ตัวอย่างจากเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟัน รายละเอียดในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 รายละเอียดของตัวอย่างฟืนกรามซี่ที่สามฟืน กรามน้อยและกระดูกเป่าฟืนที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน 2 ปีงบประมาณ

แหล่ง	จำนวนที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนที่คัดแยกได้	จำนวนที่เพาะเลี้ยงได้
ฟืนกรามซี่ที่สามและฟืน กรามน้อย (ซี่)	76	18	7
กระดูกเป่าฟืน(ชิ้น)	11	4	3

ลักษณะข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

ตารางที่ 4.4 รายละเอียดข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงได้

	ตัวอย่างฟืนกรามซี่ที่สาม และฟืนกรามน้อย	ตัวอย่างกระดูก
หญิง - จำนวน (คน)	4	1
- ช่วงอายุ (ปี)	17,22,24,25	17
- อายุเฉลี่ย(ปี)	22.00	17
- ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน ($\pm$ ปี)	3.55	0
ชาย - จำนวน (คน)	3	2
- ช่วงอายุ (ปี)	26,35,41	27,68
- อายุเฉลี่ย(ปี)	34.00	47.50
- ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน ($\pm$ ปี)	7.54	28.99

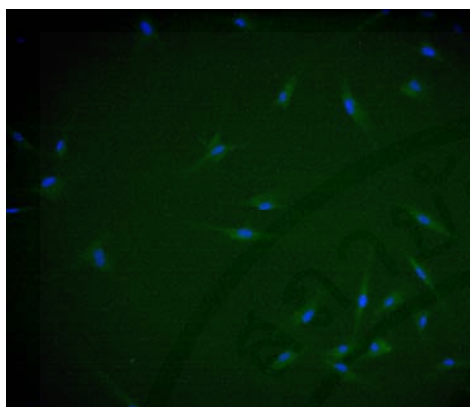
หมายเหตุ 1.กลุ่มตัวอย่างที่เป็นเพศชายที่เป็นตัวอย่างเซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเป่าฟืน1ตัวอย่างมีอายุมาก เนื่องจากตัวอย่างจากกระดูกเพาะเลี้ยงยากจึงเก็บทุกตัวอย่างที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยง

2.ได้ทำการขอความอนุเคราะห์สารสกัด RNA เซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเป่าฟืนจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมาจำนวน 4 ตัวอย่างเพื่อมาทำการระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยวิธีการ RT PCR

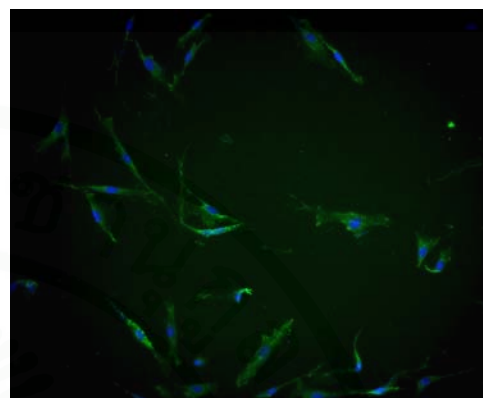
ผลการระบุเซลล์ต้นกำเนิด

1.การระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay

เมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงได้มาย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay โดยใช้ Anti Stro-1 antibody พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมีเซลล์ซึ่ง express Stro-1 ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกขากรรไกรบน ไม่พบว่ามีเซลล์ซึ่ง express Stro-1 ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และ 4.2

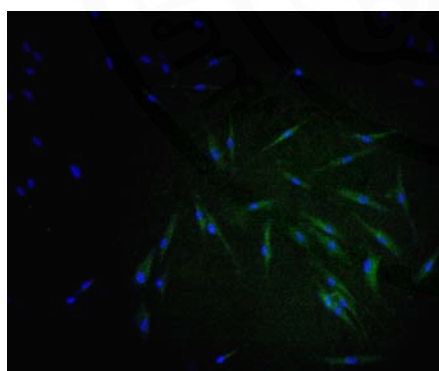


Pulp Control

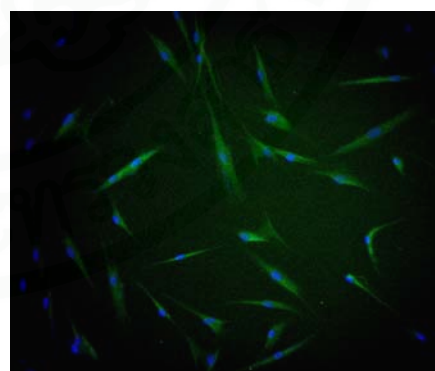


Pulp Test (Anti-Stro-1 antibody)

ภาพที่ 4.1 ภาพเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันที่นำมาระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay โดยใช้ Anti Stro-1 antibody เปรียบเทียบระหว่าง control และ test



Bone Control



Bone Test (Anti-Stro-1 antibody)

ภาพที่ 4.2 ภาพเซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเบ้าฟันที่นำมาระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการย้อมด้วยวิธี

Immunofluorescence assay โดยใช้ Anti Stro-1 antibody เปรียบเทียบระหว่าง control และ test

จะเห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันที่เป็น test มีการเรืองแสงสีเขียวมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันที่เป็น control ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเบ้าฟันไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง control และ test

ตารางที่ 4.5 สัดส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่ย้อมด้วยAnti-stro-1ติด (positive cells) ต่อเซลล์ทั้งหมดที่

กำลังขยาย 100 เท่า จากตัวอย่างโพรงประสาทฟัน 7 คน และจากกระดูกเบ้าฟัน 3 คน

Source	Subject	Control	Field No.1			Field No.2			Field No.3			total positive	Total negative	Total Proportion
		Pos	Pos	Neg	Prop	Pos	Neg	Prop	Pos	Neg	Prop			
pulp	1P3	0	20	38	0.34	8	44	0.15	19	40	0.32	47	122	0.28
Pulp	2P6	0	2	14	0.13	0	9	0.00	0	28	0.00	2	51	0.04
Pulp	3P9	0	9	64	0.12	8	57	0.12	0	104	0.00	17	225	0.07
pulp	4P3	0	10	112	0.08	5	104	0.05	20	66	0.23	35	282	0.11
pulp	5P4	0	18	50	0.26	6	132	0.04	14	57	0.20	38	239	0.14
Pulp	6P3	0	28	100	0.22	5	62	0.07	11	130	0.08	44	292	0.13
Pulp	7P3	0	4	20	0.17	5	18	0.22	4	19	0.17	13	57	0.19
pulp	7P5	0	5	20	0.20	10	17	0.37	9	20	0.31	24	57	0.30
Bone	1P8	0	0	114	0.00	0	87	0.00	0	80	0.00	0	281	0.00
Bone	2P3	0	0	27	0.00	0	22	0.00	0	8	0.00	0	57	0.00
Bone	3P3	0	0	55	0.00	0	3	0.00	0	2	0.00	0	60	0.00

หมายเหตุ Pos = Positive cells หมายถึงเซลล์ที่ย้อมติด AntiStro-1; Neg = Negative cells หมายถึงเซลล์ที่ย้อมไม่ติด AntiStro-1; Prop = Proportion หมายถึง สัดส่วนของเซลล์ที่ย้อมติด AntiStro-1 ต่อเซลล์ทั้งหมด

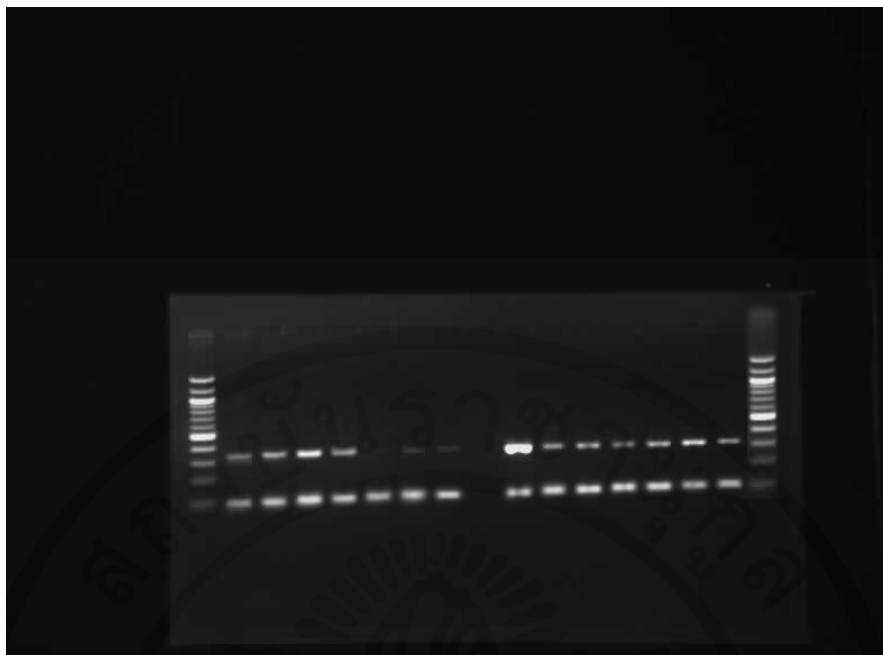
P หมายถึง passage ของการ trypsinize เซลล์

จากตารางที่ 4.5 พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมีสัดส่วนของเซลล์ที่ย้อมติด AntiStro-1 ต่อเซลล์ทั้งหมดตั้งแต่ 0.04 – 0.30 ส่วน เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันไม่พบมีเซลล์ที่ย้อมติด

AntiStro-1เลย สัดส่วนของเซลล์ที่ย้อมติด AntiStro-1 ต่อเซลล์ทั้งหมดจากตัวอย่างคนเดียวกันแต่คนละ passage ไม่เท่ากัน (ตัวอย่างคนที่ 7)

2.การระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการตรวจการแสดงออกของ CD29 และ CD 44 โดยวิธี RT-PCR

2.1 การระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการตรวจการแสดงออกของ CD29

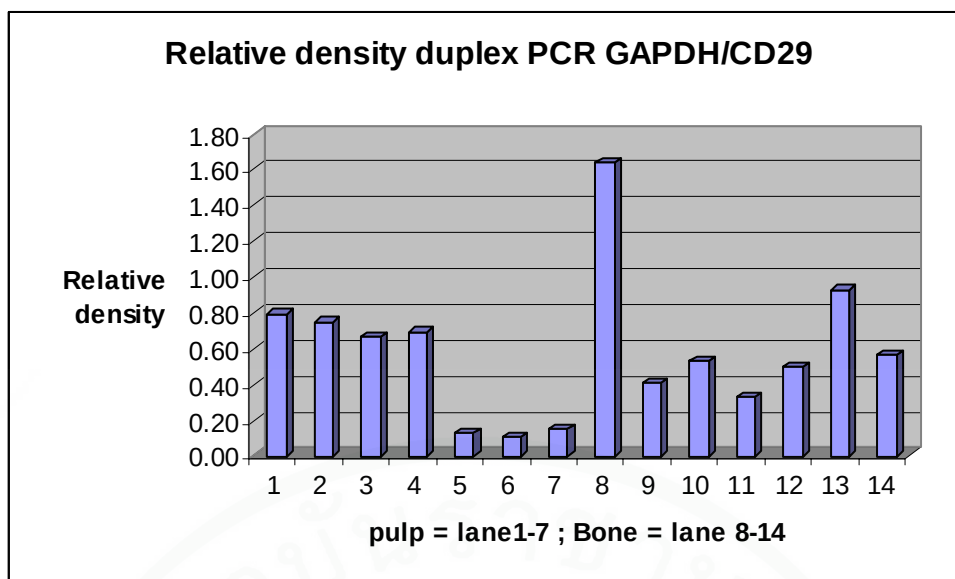


ภาพที่ 4.3 ภาพการแสดงออกของCD 29 ในการทำ duplex PCR

เลนที่ 1 – 7 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เลนที่ 8 เป็น negative control (น้ำ) และเลนที่ 9-15 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟัน โดยใช้ 100 bp ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ แถวบนเป็นCD29 (346 bp) แถวล่างเป็น mRNA GAPDH (84 bp)

จากภาพที่ 4.1 จะเห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของ CD29 (346 bp) และ GAPDH(84 bp)ในทุกตัวอย่าง โดยที่ 3 ใน 5 ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากทั้งโพรงประสาทฟันมีการแสดงออกของCD29 น้อยเมื่อเทียบกับ GAPDH ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของCD29 ค่อนข้างชัดเจนทั้ง 5 ตัวอย่าง

เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของCD29 ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน ได้ทำการหาค่า Relative density ระหว่างCD29 กับ GAPDH โดยวัดความเข้มของแถบสว่าง CD29 และนำมาหารด้วยความเข้มของแถบสว่าง GAPDH โดยใช้โปรแกรม scion Image³⁷ ค่า Relative density ที่สูงแสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอย่งนั้นมีการแสดงออกของมาร์กเกอร์ที่สูงเมื่อนำมาทำแผนภูมิแท่งได้ผลดังนี้



ภาพที่ 4.4 แผนภูมิแท่งแสดงค่า Relative density ระหว่าง CD29 กับ GAPDH กราฟแท่งที่ 1 – 7 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน กราฟแท่งที่ 8-14 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟัน

จากแผนภูมิแท่งที่ 4.1 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟันตัวอย่างที่ 1-4 มีค่า relative density ระหว่าง 0.6-0.8 ส่วนตัวอย่างที่ 5-7 มีค่า relative density น้อยกว่า 0.2 ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันตัวอย่างที่ 8 มีค่า relative density สูงถึง 1.6 ส่วนตัวอย่างที่ 9,10,12,13,14 มีค่า relative density ระหว่าง 0.4-0.9 เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันตัวอย่างที่ 11 มีค่า relative density ต่ำที่สุดคือ 0.3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันส่วนใหญ่มีค่าการแสดงออกของ CD29 เมื่อเทียบกับ GAPDH สูงกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟันแต่เมื่อนำค่า relative density ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟันและเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมาทดสอบด้วยสถิติ Mann-Whitney U พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น .01

2.2 การระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการตรวจการแสดงออกของ CD44



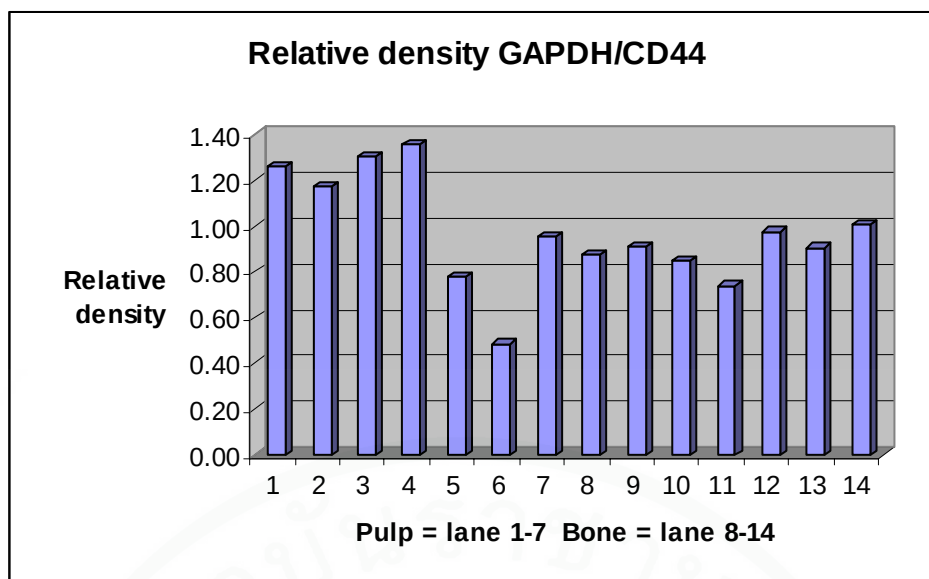
ภาพที่ 4.5 ภาพการแสดงออกของCD 44 ในการทำ duplex PCR

เลนที่ 1 – 7 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เลนที่ 8 เป็น negative control (น้ำ) และ

เลนที่ 9-15 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟัน โดยใช้ 100 bp ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ แถวบนเป็นCD44 (231 bp) แถวล่างเป็น mRNA GAPDH (84 bp)

จากภาพที่ 4.2 จะเห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของ CD44 (231 bp) และ GAPDH(84 bp)ในทุกตัวอย่าง โดยที่ตัวอย่างในเลนที่ 5 และ6 เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากทั้งโพรงประสาทฟันมีการแสดงออกของCD44 น้อยเมื่อเทียบกับ GAPDH ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของCD44 ก่อนข้างสม่ำเสมอ ไม่แตกต่างกัน

เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของCD44 ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน ได้ทำการหาค่า Relative density ระหว่างCD44 กับ GAPDH โดยวัดความเข้มของแถบสว่าง CD44 และนำมาหารด้วยความเข้มของแถบสว่าง GAPDH นำมาทำแผนภูมิแท่งได้ผลดังนี้



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแท่งแสดงค่า Relative density ระหว่าง CD44 กับ GAPDH โดยที่กราฟแท่งที่ 1 – 7 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน กราฟแท่งที่ 8-14 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟัน

จากแผนภูมิแท่งในภาพที่ 6 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟันตัวอย่างที่ 1-4 มีค่า ความเข้มแสงสัมพัทธ์สูงระหว่าง 1.2- 1.4 ส่วนตัวอย่างที่ 5 และ 6 มีค่าความเข้มแสงสัมพัทธ์ต่ำที่สุดในกลุ่มตัวอย่างเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟัน (0.4-0.8) ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของซีดี29 ส่วนตัวอย่างที่ 7 การแสดงออกของซีดี44 กลับสูงขึ้น(ความเข้มแสงสัมพัทธ์ 0.95) ตรงข้ามกับแสดงออกของซีดี29 (ความเข้มแสงสัมพัทธ์ 0.15) ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของซีดี44 ใกล้เคียงกัน ใน 6 ตัวอย่าง(0.8-1.0) ยกเว้นตัวอย่างที่ 11 ที่มีค่าความเข้มแสงสัมพัทธ์ ต่ำกว่าตัวอย่างอื่น คือ 0.75 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างมีการแสดงออกของซีดี44 ไม่ค่อยแตกต่างกัน ซึ่งต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟัน

เมื่อนำค่า ความเข้มแสงสัมพัทธ์ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากโพรงประสาทฟันและเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมาทดสอบด้วยสถิติแมนวิทนียูเทส พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น .01

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

เซลล์ต้นกำเนิดหมายถึงเซลล์ใดๆก็ตามที่มีลักษณะ 2 ประการ คือ เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเองได้ (self replicate) และสามารถเจริญไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม (undergo terminal differentiation) โดยในการแบ่งเซลล์ หนึ่งในสองเซลล์จะต้องคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ก็ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ⁹

เซลล์ในโพรงประสาทฟันมีหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่ประกอบด้วย เซลล์ odontoblast ซึ่งมีรูปร่าง columnar shape และ Pulp fibroblasts²⁶ ส่วนเซลล์ในกระดูก ส่วนใหญ่ประกอบด้วย เซลล์ osteoblast และ osteocyte ซึ่งมีรูปร่าง star shape³⁸

เซลล์ที่แยกได้จากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันในการวิจัยนี้มีรูปร่างคล้ายไฟโบรบลาสต์ (fibroblastic morphology) ซึ่งอาจจะเป็น Pulp fibroblasts จึงต้องมาทำการระบุความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการตรวจหา stem cell markers โดย ถ้าเป็นเซลล์ Pulp fibroblasts จะไม่มีการแสดงออกของ stem cell markers³⁹

จากการย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay โดยใช้ Anti Stro-1 antibody พบว่าเซลล์รูปร่างคล้ายไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากโพรงประสาทฟันมีเซลล์ซึ่ง express Stro-1 จึงสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ที่แยกได้นั้นส่วนหนึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันในขณะที่เซลล์รูปร่างคล้ายไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากกระดูกเบ้าฟันไม่พบว่ามีเซลล์ซึ่ง express Stro-1 แต่จากการระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการตรวจการแสดงออกของ CD29 และ CD 44 โดยวิธี RT-PCR พบว่าเซลล์รูปร่างคล้ายไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากกระดูกเบ้าฟันนั้นมีการแสดงออกของ CD29 และ CD 44 ซึ่งเป็น stem cell markers ของเซลล์ต้นกำเนิดจึงสรุปได้ว่าเซลล์รูปร่างคล้ายไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากกระดูกเบ้าฟันนั้นมีเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Matsubara 2005⁴⁰ ที่สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของกระดูกเบ้าฟัน

การที่เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากกระดูกเบ้าฟัน ไม่สามารถตรวจพบว่ามี การ express Stro-1 ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการแสดงออกของ Stro-1 จะพบบริเวณรอบหลอดเลือดและรอบเยื่อหุ้มประสาท (perivascular and perineural sheath)⁴¹ กระดูกเบ้าฟันที่เป็นตัวอย่างในการวิจัยนี้ได้มาจากการตัดปุ่มกระดูกออกเกินเพื่อการใส่ฟันปลอม ซึ่งส่วนใหญ่เป็น compact bone ไม่มีหลอดเลือดและเส้นประสาทหล่อเลี้ยง แต่การที่ยังสามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดได้เนื่องมาจาก มีส่วนของกระดูกที่เป็น spongy bone และอาจมีส่วนของไขกระดูก (marrow) ซึ่งให้เซลล์ต้นกำเนิดติดตาม

การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดที่มีอยู่ในกระดูกมีการแสดงออกของ Stro-1 ด้วยการดูไขกระดูกจาก Iliac crest พบว่าจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่มีอยู่ในกระดูกมีการแสดงออกของ Stro-1 แตกต่างกัน

มากโดย Gronthos และคณะ , 2003 ⁴² พบน้อยมากเพียงร้อยละ 0.001 ส่วน Pierdomenico และคณะ, 2005 ⁴³ พบถึงมากถึงร้อยละ 6.50 จากเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากไขกระดูกส่วนการศึกษานี้ไม่สามารถตรวจพบเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Stro-1 จากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากกระดูกไขสันหลัง

การศึกษาของ Coppe , Zhang และ Den Besten 2009 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมมีเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Stro-1 ร้อยละ 2 ของประชากรเซลล์ทั้งหมด⁴⁴ ส่วนการศึกษาของ Shi และ Gronthos 2003 ⁴¹ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันแท้มีเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Stro-1 ถึงร้อยละ 6 แต่การวิจัยนี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันแท้มีเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Stro-1 ร้อยละ 0.04 – 0.30

ปัจจัยที่มีผลต่อการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดได้แก่ อายุ แหล่งของเนื้อเยื่อที่เก็บตัวอย่างและจำนวนเซลล์เริ่มแรกที่แยกออก⁴⁰ วิธีการคัดแยก²⁶ สภาพการเพาะเลี้ยง⁴⁵ จำนวนครั้งของการ passage⁴⁶ และการผ่านกระบวนการเก็บด้วยการแช่แข็ง (Cryopreservation)⁴⁷

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยนี้ ในส่วนของโพรงประสาทฟันกลุ่มตัวอย่างเพศหญิงมีอายุ 17,22,24, และ 25 ปี อายุเฉลี่ย 22.00 ± 3.55 ปี เพศชายอายุ 26,35 และ 41 ปี อายุเฉลี่ย 34.00 ± 7.54 ปี ในส่วนของกระดูกไขสันหลังกลุ่มตัวอย่างที่เป็นหญิงมี 1 คน อายุ 17 ปี ชายมี 2 คนอายุ 27 และ 68 ปี อายุเฉลี่ย 47.50 ± 28.99 ปี อายุที่เหมาะสมในการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดคือ 20-39 ปี⁴⁰ ในการวิจัยนี้กลุ่มตัวอย่างที่เป็นชายค่อนข้างมีอายุนานซึ่งอาจมีผลต่อการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

วิธีการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดในงานวิจัยนี้ใช้วิธี Out growth method ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกถึงแม้จะใช้เวลานานและความสำเร็จในการแยกเซลล์น้อยกว่าแต่เซลล์ที่ได้จะไม่ถูกทำลายจากเอนไซม์ดังเช่นการคัดแยกด้วยวิธี digestion method²⁶ นอกจากนี้ เซลล์ที่ได้ไม่เป็น single colony แต่จะประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิดที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด¹⁹

สภาพการเพาะเลี้ยง (Culture condition) มีผลต่อการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนส์ของเซลล์ต้นกำเนิด ในการวิจัยนี้ได้มีการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ alpha MEM ในปีแรก แต่พบว่าได้ผลไม่ดีจึงเปลี่ยนมาใช้ DMEM ซึ่งเสริมด้วย fetal bovine serum, L-Glutamine, antimycotic agents และ antibiotics เพื่อให้มีสารอาหารที่เซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตและป้องกันการติดเชื้อราและแบคทีเรีย

การวิจัยนี้ใช้เซลล์ที่แยกมาจากเนื้อเยื่อโดยตรง ไม่ได้ใช้เซลล์ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง ดังนั้นจึงไม่ได้รับผลกระทบจากกระบวนการ Cryopreservation แต่เนื่องจาก การแยกเซลล์ด้วยวิธีการ out growth method ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเซลล์ได้ จึงอาจต้องมีการ trypsin เซลล์หลายครั้งทำให้เซลล์ที่นำมาวิจัยอยู่ใน passage ที่ 3-9 ซึ่ง Yu และคณะ 2010⁴⁸ ได้ทำการศึกษาพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงจาก passage 1-9 มี proliferation rate และมีการแสดงออกของ Stro-1 ลดลงซึ่งตรงกับผลของการวิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่าเซลล์ต้นกำเนิด

ใน passage ต้น (passage ที่ 3) มีสัดส่วนของเซลล์มีการแสดงออกของ Stro-1 สูงกว่าเซลล์ต้นกำเนิดใน passage หลัง (passage ที่ 6-9) ยกเว้นในกลุ่มตัวอย่างคนที่ 7 ที่เซลล์ใน passage ที่ 5 กลับมีสัดส่วนของเซลล์มีการแสดงออกของ Stro-1 สูงกว่าเซลล์ใน passage ที่ 3 อาจเป็นเพราะในช่วงเหตุการณ์ไม่สงบของบ้านเมือง ไม่สามารถเข้ามาทำการถ่าย เซลล์ ตามกำหนดเวลาที่จะควรจะเป็น

จำต้องปล่อยให้เซลล์เจริญต่อไปจนเบียดกันและเซลล์บางส่วนที่เริ่มแก่และตายอาจมีการหลั่งสาร signaling factors เช่น Growth and differentiation (GDF), Transforming Growth factor (TGF)²⁷ ซึ่งไปกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเกิดการ differentiation^{49,50} ทำให้ถึงแม้ว่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดใน passage ที่ 3 กลับมีสัดส่วนของเซลล์มีการแสดงออกของ Stro-1 ต่ำกว่าเซลล์ต้นกำเนิดใน passage ที่ 5

ซิติ 29 (Integrin B) เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ (transmembrane protein) มีหน้าที่ควบคุมปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์และระหว่างเซลล์กับสารนอกเซลล์ (extra cellular matrix) นอกจากจะเป็นมาร์คเกอร์ของเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว ยังพบอยู่บนเซลล์มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) โดยมีคุณสมบัติช่วยให้เซลล์มะเร็งเกาะกับเยื่อช่องท้อง (Peritoneum) ช่วยให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปได้ (metastasis)⁵¹

ซิติ 44 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ของกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid receptor) และเป็นโมเลกุลที่ช่วยในการยึดติด (adhesion molecule) ที่สำคัญบนผิวเซลล์นี้ออก ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์นี้ออก⁵¹ นอกจากจะเป็นมาร์คเกอร์ของเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว ยังพบบนผิวเซลล์ตั้งต้นของเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) บริเวณส่วนที่มีการขยายตัว (zone of hypertrophy) และบริเวณที่มีการสึกกร่อน (zone of erosion) บนกระดูก⁵²

การแสดงออกของมาร์คเกอร์ของเซลล์ต้นกำเนิดนอกจากจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรมแล้ว⁵³ ยังถูกควบคุมโดยสารเคมีในสิ่งแวดล้อมรอบๆ เซลล์และจากแรงต่างๆ เช่น ไฮเปอร์กราวิตี (Hypergravity) ซึ่งเป็นแรงจำนวนมากที่กระทำต่อเซลล์ และ ไมโครกราวิตี (Microgravity) ซึ่งเป็นแรงจำนวนน้อยที่กระทำต่อเซลล์⁵⁴ การหดตัว (contractibility)⁵⁵ และแรงเฉือน (Shear stress)⁵⁶

การแสดงออกของซิติ 29 และ ซิติ 44 ในกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและการใช้งานบดเคี้ยวที่ต่างกันไปในแต่ละคน การแสดงออกของซิติ 29 ไม่แปรผันตามการแสดงออกของซิติ 44 (กลุ่มตัวอย่างที่มีการแสดงออกของซิติ 29 ต่ำ อาจมีการแสดงออกของซิติ 44 สูง) และเมื่อนำมาทดสอบทางสถิติ ก็ไม่พบความแตกต่างกันในการแสดงออกของซิติทั้งสองในระหว่างบุคคลและในระหว่างเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันกับกระดูกเบ้าฟัน

ในเด็กกลุ่มอาการดาวน์ซึ่งพบมีปัญหาเป็นโรคปริทันต์อันสัมพันธ์กับลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม หรือมีปัญหาฟันผุจากการไม่สามารถดูแลสุขภาพช่องปากได้ การใช้เซลล์ต้นกำเนิด

จากโพรงประสาทฟันในการรักษาความพิการของอวัยวะปริทันต์ หรือสร้างหรือซ่อมแซมอวัยวะที่เกิดความพิการจากโรค เช่น การทำการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันบางส่วน (partial pulp regeneration) หรือเป็นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและเนื้อฟันบางส่วน (pulp-dentine regeneration)⁵⁷ น่าจะเป็นประโยชน์แก่เด็ก

Miura และคณะ 2003 พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากฟันน้ำนม 1 ซึ่งสามารถให้ เซลล์ต้นกำเนิด 12-20 เซลล์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อ ร้อยละ 100 ของเซลล์ที่ได้สามารถสร้างเป็นกระดูกได้⁵⁸

นันทวรรณ และคณะ 2553⁵⁹ ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Mineralized tissue) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมของเด็กปกติกับเด็กกลุ่มอาการดาวน์ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมของเด็กกลุ่มอาการดาวน์มีเมตาโบลิซึม (Metabolism) และอัตราการเติบโต (Proliferation rate) รวมทั้งมีการสร้าง เนื้อเยื่อแคลเซียม (Calcified tissue) สูงกว่าเด็กปกติ จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าในอนาคตจะสามารถเก็บฟันน้ำนมของเด็กกลุ่มอาการดาวน์เพื่อมาคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดไว้ใช้สร้างกระดูกและอวัยวะปริทันต์ที่ถูกทำลายไป เนื่องจากความผิดปกติทางพันธุกรรม

สรุป (Conclusion)

สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดได้จากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมีเซลล์ซึ่งมีการแสดงออกของสโตร-1 ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกเบ้าฟันส่วนที่ออกเกินบริเวณขากรรไกรล่างด้านลิ้นไม่พบ แต่จากการระบุเซลล์ต้นกำเนิดด้วยวิธีการรีเวอร์สทรานสคริปชันโพลีเมอร์เรสเซนซ์เอ็กซ์ชัน พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากทั้งโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟันมีการแสดงออกของมาร์คเกอร์สเต็มเซลล์ ซีดี 29 และ ซีดี44

การวิจัยนี้จำกัดอยู่เพียงขั้นตอนการคัดแยกและระบุเซลล์ต้นกำเนิด การตรวจพบเซลล์ที่มีการแสดงออกของสโตร-1 ในสัดส่วนที่น้อยจากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันหรือตรวจไม่พบเซลล์ที่มีการแสดงออกของสโตร-1 จากเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากกระดูกเบ้าฟัน ไม่ได้หมายความว่าไม่มีเซลล์ต้นกำเนิด เนื่องจากสโตร-1 เป็นมาร์คเกอร์ของเซลล์ต้นกำเนิดในช่วงแรก ซึ่งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้นั้นอาจเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่เลเยาะระยะแรก (early stage) ไปแล้ว แต่ยังคงความเป็นสเต็มเซลล์อยู่จึงควรทำการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นต้นเพื่อพิสูจน์ความเป็นสเต็มเซลล์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1.Friedenstein AJ,Chailakhyan RK,and Gerasimov UV.Bone marrow osteogenic stem cells:in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.Cell Tissue Kinet 1987;20:263-272.
อ้างอิงใน คำพล ศรีวัฒนกุล.การประยุกต์ใช้ mesenchymal stem cells สำหรับการรักษาแบบ cell-based therapy.วิทยาการเซลล์บำบัด 2550;22.
- 2.กฤษณพงศ์ มโนธรรม .เสเต็มเซลล์กับโรคไตใน:สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์.วิชาการ กรมการแพทย์ STEM CELLS.กรุงเทพฯ; หจก.อุดมรัตน์การพิมพ์และดีไซน์. 2552 .หน้า 17-43.
- 3.ฤทัยรัตน์ วินิจชัย นวลจิรา ประกายรุ่งทอง วิวัฒน์ โกมลสุรเดช สายจินต์ อธิประดิษฐ์ ภูวด จารุ กำเนิดกนก.เซลล์ต้นกำเนิดบนกระจกตา ใน: สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์.วิชาการ กรมการแพทย์ STEM CELLS.กรุงเทพฯ; หจก.อุดมรัตน์การพิมพ์และดีไซน์.2552 .หน้า 67-118.
- 4.สืบสาย คงแสงดาว.แนวคิดการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิด ใน: สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์.วิชาการ กรมการแพทย์ STEM CELLS.กรุงเทพฯ; หจก.อุดมรัตน์การพิมพ์และดีไซน์.2552 .หน้า 121-187.
5. เวสราวัช เวสสโกวิท.เอกสารประกอบคำบรรยายเรื่องความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดจากผิวหนัง.25 มิถุนายน 2553; ณ.ห้องประชุมสถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.นนทบุรี; 2553.
6. วิทยา ยินดีเดช.เสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อฟัน ใน: สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์.วิชาการ กรมการแพทย์ STEM CELLS.กรุงเทพฯ; หจก.อุดมรัตน์การพิมพ์และดีไซน์.2552 .หน้า 47-66.
7. de Mendonca Costa A,Bueno DF,Martins MT,Kerkis I, Kerkis A,Fanganiello RD,Cerruti H,Alonso N,Passos-Bueno MR.Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells.The Journal of Craniofacial surgery 2008;19 (1) : 204 -10.
- 8.Gandia C. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction.Stem cells 2008;26(3):638-45.
- 9.ธีรศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง. เสเต็มเซลล์กับการพัฒนาทางทันตกรรม. ข่าวสารทันตแพทย์ 2551;21(4):10-15.
- 10.สุรพล อิศรไกรศีล.เซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด (Stem cell and stem cell therapy). แพทยสภาสาร 2550.36(1) : 17-24.

- 11.ทีมข่าวสาธารณสุข.เทคโนโลยีซ่อมมนุษย์.หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ 2553; มกราคม 1:12.
- 12.กรรณิการ์ ชูเกียรติมัน. Stem cell and dental implantation.เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 17 กรกฎาคม2552 ณ. โรงแรม มีราเคิลแกรนด์ กรุงเทพฯ: 16-50.
13. Mantesco A, Shape P. Dental stem cells for tooth regeneration and repair. Expert Opin Biol Ther 2009; 9(9):1143-54.
- 14.Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. Nat Methods 2007;4(3):227-30.
15. Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP and Yelick PC. Bioengineered Dental Tissues Grown in the Rat jaw. J Dent Res 2008; 87(8):745-50.
- 16.Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S and Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. PNAS 2009; 106(32):13475-80.
- 17.Sonoyama W, Liu Y, Fanf D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Shi S, Wang S. Mesenchymal stem cell – mediated functional tooth regeneration in swine. Plos One 2006; 20(1):e79.
- 18.Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, Matsuo O. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. Cell boil Int 2007;31(10):1191-97.
19. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang T-M, Chen J-H, Wang BB, Huang G T-J, Wang S, and Shi S. Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: a report of 3 cases. Oral Dis. 2010; 16(1): 20–28.
20. Rouabhia M and Allaire P. Gingival mucosa regeneration in athymic mice using in vitro engineered human oral mucosa. Biomaterial 2010.Apr 28 [Epub ahead of print]
21. Gronthos S, Mankani m, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A.2000; 97(25):13625-30.
- 22.Iohura K, Nakashima M, Ishikawa M, Nakashima A, Akamine A. Dentine regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2.J Dent Res 2004;83 (8) : 590-95.
23. Park CH, Rios HF, Jin Q, Bland ME, Flanagan CI, Hollisten SJ and Giannobile WV. Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth – ligament interfaces. J biomaterial 2010.04.027 Article in Press.

24. Willumeit R, Schossig M, Clemens H, Feyerabend F. In vitro interaction of human chondrocytes and mesenchymal stem cells and of mouse macrophages with phospholipids – covered metallic implant materials. *Eur Cell Mater* 2007; Mar 2; 13:11-25.
25. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Chong HW, Park JY, Chung JH. Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues. *Tissue Engineering* 2007; 13 (04):767-73.
26. Huang G T-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006; 324:225-36.
27. Bobis, S., Jarocha, D. and Majka, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006. 44(4): 215-30.
28. Trypsinization of adherent cells. Johns Hopkins University. GRCF: The Cell Center Rev.6/02 SOP Number 114. Available from: <http://cellcenter.grcf.jhmi.edu/protocols/trypsinizingadhercells.pdf> [14 Sep 2010].
29. Donaldson JG. Immunofluorescent staining- current protocols in cell biology. Wiley online library. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb0403s00/pdf> [14 Sep 10].
30. MacArthur BD, Tare RS, Please CP, Prescott P and Oreffo ROC. A non-invasive method for in situ quantification of subpopulation behaviour in mixed culture. *J.R.Soc.Interface* 2006; 3:63-69.
31. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, et al. Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis 2005; *Neoplasia*; 7(11):967-976.
32. RNA extraction kit manual. USA: Qiagen; 2002.
33. Spectrophotometers BioMate 3. Operator's manual. Rochester, NY, Thermo Spectronic; 2001.
34. Superscript III RT-PCR. California: Invitrogen; 2003.
35. Matt Lewis. Agarose gel electrophoresis (Basic method). Available from: <http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html> [23 Sep 10].
36. Bioimaging systems. User manual. Syngene, a division of Synoptics Limited ;2000.
37. Sorensen A. Scion Image guide. Sateer training. Available from: <http://www.sateesite.org>. [8 Oct 10].
38. Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M Jr, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. [Clin Oral Implants Res.](#) 2009; 20 (5):472-81.

39. Lindroos B, Maenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 368:329-35.
40. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Nishimura M, Saito M et al. Alveolar Bone Marrow as a cell source for Regenerative Medicine: Differences Between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20(3):399-409.
41. Shi S and Gronthos S. Perivascular niche of post natal mesenchymal stem cell in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704.
42. Gronthos, S. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 9): 1827-35.
43. Pierdomenico, L. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005 80(6): 836-37.
44. Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. *Pediatr Dent*. 2009 Nov-Dec; 31(7):467-71.
45. Wagner W and Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations-Comparing Apples and Oranges. *Stem Cell Rev* 2007; 3:239-248.
46. D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: From Biology to clinical applications. *Journal of experimental zoology* 2009; 312:408-15.
47. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*. 2006; 12(10):2813-23.
48. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, Shi J, Jin Y. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol*. 2010 May 8; 11:32.
49. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cell* 2006; 24:1707-18.
50. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S and Huang G T-J. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *J Endod*. 2008 February; 34(2): 166–71.
51. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T, Ueda M. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem

cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun;16(6):1891-900.

52. Pavasant P, Shizari TM and Underhill CB. Distribution of hyaluronan in the epiphyseal growth plate: turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells. *Journal of Cell Science* 1994; 107: 2669-77.

53. Li X, Mcfarland DC, and Velleman SG. Effect of Transforming Growth Factor-Beta on Decorin and Beta-1 Integrin expression during muscle development in chickens. *Poultry Science* 2006; 83:326-32.

54. Huang Y, Dai Z-Q, Ling S-K, Wan H-Y M, and Li Y-H. Gravity a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science* 2009; 16:87-104.

55. Thakar RG, Chown MG, Patel A, Peng L, Kumar S and Desai TA Contractility-dependent modulation of cell proliferation and adhesion by microscale topographical cues. *Small*. 2008 Sep;4(9):1416-24.

56. Masumura T, Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Ando J. Shear stress increases expression of the arterial endothelial marker ephrinB2 in murine ES cells via the VEGF-Notch signaling pathways.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Dec;29(12):2125-31. Epub 2009 Oct 1.

57. Huang G T-J. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med*. 2009; 4(5):697-707.

58. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG and Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 2003; 100(10):5807-12.

59. Nowwarote N, Techatharatip O, Toemthong T, Tharapiwattananon Tand Pavasant P. Osteogenic Potential of Stem Cells from deciduous teeth Obtained from Down's Syndrome Patients. การนำเสนอผลงานวิชาการในงานประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์ "The 33 rd AAT Annual Conferences of the Anatomy Society of Thailand 2010" 28-30 เมษายน 2553 ณ โรงแรม The Greenery Resort อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว จุสสรพร เดิมทอง เป็นชาวจังหวัดกรุงเทพมหานคร เกิดวันที่ 12 ตุลาคม 2513

ประวัติการศึกษา

- 2536 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2539 ประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิกชั้นสูง สาขาทันตกรรมทั่วไป
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2550 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการทำงาน

- 2536-2539 ทันตแพทย์ รพ.ศิริราช สำนักงานสาธารณสุข จังหวัดสุโขทัย
- 2540-ปัจจุบัน ทันตแพทย์ สถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข
ตำแหน่ง ทันตแพทย์ชำนาญการพิเศษ

ประสบการณ์ด้านการวิจัย

- 1.การวิจัยเรื่อง “การศึกษาการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ ในการดูแลทันตสุขภาพของเด็ก และสภาวะทันตสุขภาพของเด็กในหอผู้ป่วยสถาบันราชานุกูล จากการซักโครงการส่งเสริมสุขภาพช่องปากเด็กในหอผู้ป่วย(2546)
2. ผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2 ในผู้ป่วยปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (2550)
- 3.ผลของโปรแกรมดนตรีและศิลปะ ที่มีต่อการลดพฤติกรรมก้าวร้าวของเด็กบกพร่องด้านพัฒนาการและสติปัญญาระดับรุนแรงเพศหญิง สถาบันราชานุกูล (2553)
- 4.การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเขี้ยวฟัน (2553)

ประวัติผู้วิจัย

นางสาววินิรมล ศรีวัฒนา เป็นชาวจังหวัดชลบุรี เกิดวันที่ 04 ธันวาคม 2512

ประวัติการศึกษา

- 2538 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2541 ประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก สาขาศัลยศาสตร์ช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2544 ฝึกอบรมทันตแพทย์ประจำบ้านสาขาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟ
เชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2544 วุฒิบัตรสาขาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล ทันตแพทยสภา

ประวัติการทำงาน

- 2538-2539 ทันตแพทย์ ศูนย์พัฒนาการเด็กภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่
- 2540-2551 ทันตแพทย์ สถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข
ตำแหน่ง ทันตแพทย์ชำนาญการพิเศษ
- 2551-ปัจจุบัน ทันตแพทย์ โรงพยาบาลสงฆ์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ตำแหน่ง ทันตแพทย์ชำนาญการพิเศษ

ประสบการณ์ด้านการวิจัย

- 1.การวิจัยเรื่อง “การศึกษาการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ ในการดูแลทันตสุขภาพของเด็ก
และสภาวะทันตสุขภาพของเด็กในหอผู้ป่วยสถาบันราชานุกูล จากการจัดโครงการส่งเสริมสุขภาพ
ช่องปากเด็กในหอผู้ป่วย(2546)
- 2.การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันและกระดูกเบ้าฟัน (2553)

ประวัติผู้วิจัย

นายธันยภัทร วณิชชานนท์ เป็นชาวจังหวัดสงขลา เกิดวันที่ 8 เมษายน 2523

ประวัติการศึกษา

2545 วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2550 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการทำงาน

2546-ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต กระทรวง
สาธารณสุข ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

ประสบการณ์ด้านการวิจัย

1. การวิจัยเรื่อง “การศึกษากลไกการเกิด Mesomelic dysplasia Kantaputra type”
2. เป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการการศึกษาพันธุกรรมของ Post Traumatic Stress Disorder ในผู้รอดชีวิตจากชนาไม
3. เป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการการศึกษาพันธุกรรมของโรคซึมเศร้า
4. การตรวจ Gross rearrangement ในผู้ป่วย Rett syndrome ด้วยวิธี Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification Assay (MLPA)

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว มัทนา จงกา เป็นชาวจังหวัดเพชรบูรณ์ เกิดวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2527

ประวัติการศึกษา

2548 การศึกษาระดับบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2551 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประวัติการทำงาน

2552-ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันรามาธิบดี
กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข

ประสบการณ์ด้านการวิจัย

- มัทนา จงกา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข. 2552. ดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุพืชสกุล *Alpinia* Roxb. ใน: การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12 (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). หน้า 1403-1412 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- มัทนา จงกา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข. 2552. ยีน *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ในการนำมาใช้เป็น DNA barcode: การประเมินเบื้องต้นโดยการตรวจสอบความผันแปรภายใน *Alpinia galanga*. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 37(2) 173-182.
- นำเสนอผลงานวิจัย เรื่อง “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมต้นแบบ 2 ยีน ที่มีผลต่อการตอบสนองต่อยา” ในงานการนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2553 ระหว่างวันที่ 26-30 สิงหาคม ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว ณิชกาน ม่วงกล่อม เป็นชาวจังหวัดกาญจนบุรี เกิดวันที่ 3 เมษายน 2523

ประวัติการศึกษา

2545 ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง สาขาคอมพิวเตอร์ธุรกิจ พาณิชยการสุโขทัย

ประวัติการทำงาน

2545-ปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย สถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข

ประสบการณ์ด้านการวิจัย

1.การวิจัยเรื่อง “การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและเภสัชในพันธุกรรมของโรคซึมเศร้า
ในคนไทย(2550)